Aus dem Deutschen Diabetes Zentrum

Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institut für Klinische Diabetologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Die Bedeutung des hepatischen Energiestoffwechsels und der Insulinsensitivität für die postprandiale Fettspeicherung in der Leber

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefanie Zimmermann

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Roden

Zweitgutachter: Prof. Dr. Johannes G. Bode

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns."

Richard P. Feynman

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

Fritsch, M., Koliaki, C. Livingstone, R., Phielix, E., Bierwagen, A., Meisinger, M., Jelenik, T., Strassburger, K., Zimmermann, S., Brockmann, K., Wolff, C., Hwang, J. H., Szendroedi, J., Roden, M., *Time course of postprandial hepatic phosphorus metabolites in lean, obese, and type 2 diabetes patients.* Am J Clin Nutr, 2015. **102**(5): p. 1051-8.

Zusammenfassung

Das Ausmaß der Speicherung von hepatozellulären Lipiden (HCL) ist mit Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) assoziiert. Ein gesteigerter Lebertriglyzeridgehalt ist, nach Ausschluss anderer Ursachen, ein Kennzeichen der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) und ein unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation eines T2DM sowie für kardiale Mortalität. Die Einnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit ist bei insulinresistenten Menschen mit erniedrigter Glukoseaufnahme im Skelettmuskel und mit einem Anstieg der HCL assoziiert. Die postprandiale Umleitung der Glukose vom insulinresistenten Muskel hin zur Leber, die gesteigerte Stimulation der Lipogenese, oxidativer Stress und eine Verminderung der hepatischen Lipidoxidation könnten dabei die Entwicklung von NAFLD verursachen.

Diese Arbeit prüft folgende Hypothesen: HCL und Insulinresistenz korrelieren nach der Einnahme einer definierten Mahlzeit negativ (i) mit der Mitochondrienfunktion und (ii) dem Anstieg energiereicher Phosphormetabolite in der Leber. Wir untersuchten 10 junge, schlanke, glukosetolerante Insulinsensitive (CON), 10 adipöse, glukosetolerante Insulinresistente von vergleichbarem Alter (OBE) und 10 adipöse, ältere Patienten mit T2DM (T2DM).

Die Insulinsensitivität (M-Wert) wurde mittels hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps ermittelt. Zusätzlich wurden Metabolite, Hormone sowie Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen im Plasma (TBARS) als Marker des systemischen oxidativen Stresses vor und nach Verabreichung einer standardisierten Mahlzeit (*mixed meal test*, MMT) gemessen. Die Konzentrationen von Gamma Adenosintriphosphat (γATP) und anorganischem Phosphat (Pi) in der Leber sowie HCL wurden mit Phosphor- und Protonen-Magnetresonanzspektroskopie (MRS) vor sowie 160 min und 240 min nach der Testmahlzeit bestimmt.

OBE und T2DM waren im Vergleich zu CON gleichermaßen insulinresistent ($p<0.01$) und hatten 12- bzw. 17-fach ($p<0.01$) höhere HCL als CON. Trotz vergleichbarer hepatischer γATP-Konzentrationen unter Nüchternbedingungen war der maximale postprandiale Anstieg von γATP in OBE 6-fach ($p<0.05$), aber in T2DM nur tendenziell höher ($p=0.09$) als in CON. Während im Nüchternzustand die Plasma-TBARS zwischen den Gruppen vergleichbar waren, wiesen T2DM 180 min nach der Testmahlzeit einen transienten Anstieg der Plasma-TBARS um 24% ($p<0.05$) auf.

Zusammenfassend können adipöse, glukosetolerante Menschen ihren postprandialen hepatischen Energiestoffwechsel steigern, wohingegen Patienten mit T2DM diese Adaptation nicht zeigen. Patienten mit T2DM entwickeln allerdings postprandial Hinweise auf sytemischen oxidativen Stress, was zur Entwicklung der NAFLD beitragen könnte.

Häufig verwendete Abkürzungen

γATP	Gamma Adenosintriphosphat
^{1}H MRS	^{1}Protonen-Magnet-resonanzspektroskopie
^{31}P MRS	^{31}-Phosphor-Magnet-resonanzspektroskopie
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
AUC	*Area under the curve*
BIA	Bioimpedanzanalyse
BMI	*Body mass index*
BSA	Körperoberfläche
BG	Blutglukosespiegel
ChREBP	*Carbohydrate regulatory element binding protein-1*
CON	Kontrollpopulation
D-[6,6-$^{2}H_2$]-Glukose	Deuterierte Glukose
DAG	Diacylglycerol
dEGP	Delta endogene Glukoseproduktion basal vs. insulinsupprimiert
EGP	Endogene Glukoseproduktion
fATP	ATP-Syntheseflux
FFS	Freie Fettsäuren
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
foxO1	*Forkhead box protein O1*
G-6-P	Glukose-6-phosphat
GC-MS	Gaschromatographie Massenspektrometrie
GINF	Glukose-Infusionsrate
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLUT	Glukosetransporter
GNG	Glukoneogenese
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HbA1c	Hämoglobin A 1 c
HCL	Hepatozelluläre Lipide
HDL	*High density Lipoprotein*
HGH	Wachstumshormon
iEGP	Insulinsupprimierte endogene Glukoseproduktion
IMCL	Intramyozelluläre Lipide
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
MMT	*Mixed meal test*
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
M-Wert	Ganzkörperinsulinsensitivität
NADH	Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
NAFL	Nicht-alkoholische Fettleber
NAFLD	Nicht- alkoholische Fettleber-Erkrankung
NASH	Nicht-alkoholische Fett-leberhepatitis/ Steatohepatitis
NF-κB	*Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*
NO	Stickoxid
n.s.	Nicht signifikant
OBE	Adipöse junge Glukosetolerante Probanden
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PCr	Phosphocreatinin
PDE	Phosphodiester
Pi	Anorganisches Phosphat
PKC	Proteinkinase C
PME	Phosphomonoester
R	Pearson-Korrelationskoeffizient
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RQ	Respiratorischer Quotient
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SREBP-1c	*Sterol regulatory element-binding protein-1c*
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TCA	Tricarbonsäurezyklus
T2DM	(Patienten mit) Diabetes mellitus Typ 2
TG	Triglyzeride
UDPG	Uridindiphosphatglukose
VLDL	*Very- low density lipoprotein*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Stand der Forschung 1
1.1.1 Adipositas und Insulinresistenz 1
1.1.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und Insulinresistenz 1
1.1.3 Erhöhte Verfügbarkeit von freien Fettsäuren und der hepatische Energiestoffwechsel 2
1.1.4 Die Regulation des hepatischen Glukosestoffwechsels 3
1.1.5 Die Bedeutung der mitochondrialen Funktion für die hepatische Insulinresistenz 7
1.2. Ziele und Hypothesen 12
2. Methoden 12
2.1 Probanden 12
2.2 Studiendesign 13
2.2.1 Versuchstag 1 13
2.2.2 Versuchstag 2 13
2.3 Versuchsablauf 14
2.3.1 Studienprotokoll I 14
2.3.2 Studienprotokoll II 16
2.4 Analytik 16
2.4.1 Blutabnahmen 16
2.4.2 Analyseverfahren 16
2.4.3 In vivo Isotopenverdünnungsanalyse 17
2.4.4 Oraler Glukosetoleranztest 17
2.4.5 Magnetresonanzspektroskopie 18
2.5. Berechnungen und Statistik 18
3. Ergebnisse 19
3.1 Studienteilnehmer 19
3.2 Glukosestoffwechsel bei Insulinstimulation 20
3.3 *mixed meal test* 21
3.3.1 Metabolite und Hormone vor und nach dem *mixed meal test* 21
3.3.2 Resultate der ^{31}P- und ^{1}H-MRS-Messungen in der Leber 26
4. Diskussion 33
4.1. Ganzkörperinsulinsensitivität 33
4.2. Nüchternmessungen 33
4.3. *mixed meal test* 34
4.4. HCL 35
4.5. Hepatische Mitochondrienfunktion 36

4.6. Reaktive Sauerstoffspezies 37
4.7. ATP und Pi in der Leber 38
4.8. Limitationen der Studienergebnisse 42
4.9. Schlussfolgerung 44
Referenzen 46

1. Einleitung

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Adipositas und Insulinresistenz

Übergewicht und Adipositas betreffen Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge weltweit etwa 440 Millionen Menschen (~9.8%) [1] und sind mit Insulinresistenz sowie zahlreichen Komorbiditäten, wie T2DM, Hypertonie, kardiovaskulären Erkrankungen, Dyslipidämie, Schlafapnoe und degenerativen Skeletterkrankungen, verbunden. Infolgedessen ist die Mortalität im Vergleich zur Normalbevölkerung auf das 6- bis 12-fache erhöht. Die Kosten der Adipositas-assoziierten Begleiterkrankungen werden weltweit auf 117 Milliarden US-Dollar/Jahr geschätzt. [2]

Das gemeinsame Auftreten von Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Insulinresistenz, abdominelle Fettleibigkeit, Dyslipidämie und Hypertonie, wird als metabolisches Syndrom bezeichnet. [3, 4] Patienten, die am metabolischen Syndrom leiden, haben nicht nur ein erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit, sondern auch für Schlaganfälle und periphere vaskuläre Erkrankungen. [5] Perry et al. fanden bei der Untersuchung geschädigter Darmbakterien in Ratten eine, durch das parasympathische Nervensystem aktivierte, erhöhte Azetatproduktion, die zu erhöhter Glukose-stimulierter Insulin- und Ghrelinsekretion, Hyperphagie, Adipositas sowie sekundären Erkrankungen führt. [6]

Allerdings erfolgte bisher kein Beweis einer gemeinsamen Pathogenese der Faktoren des metabolischen Syndroms. Des Weiteren wurde ein Mehrwert des metabolischen Syndroms gegenüber dem prädiktiven Wert der Einzelfaktoren bislang nicht gezeigt. Aus diesem Grund wird seine klinische Relevanz aktuell diskutiert. [5] Eine hepatische Komponente wurde bislang nicht in die aktuell geltenden Definitionen aufgenommen.

1.1.2 Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und Insulinresistenz

Fettleber (NAFL, Steatose), Steatohepatitis (NASH) und die „kryptogene“ Leberzirrhose werden, nach Ausschluss anderer Ursachen, als NAFLD zusammengefasst. Diese kann letztlich zu Leberzirrhose führen. Es handelt sich dabei mittlerweile um die häufigste Lebererkrankung bei Jugendlichen und Erwachsenen mit Adipositas. Sie ist durch einen hepatischen Gehalt an HCL von über 5.5% sowie einem täglichen Alkoholkonsum von unter 20 g bei Frauen und unter 30 g bei Männern definiert. [7-10] NAFLD umfasst verschiedene hepatische Veränderungen, die allerdings histologische Ähnlichkeiten mit jenen einer alkoholtoxischen Schädigung aufweisen.

Etwa 70-95% der adipösen Patienten, die über viele Jahre einen *body mass index* (BMI) von >30 kg/m² aufweisen [6] und ungefähr 70% der Patienten mit T2DM bzw. 55% der übergewichtigen Kinder leiden an einer hepatischen Steatose. [11]
In der Allgemeinbevölkerung der westlichen Industrienationen wird die Prävalenz, an einer NAFLD zu erkranken, auf 20-25% geschätzt. [12, 13].
Die Insulinresistenz hängt eng mit der ektopen Speicherung von Triglyzeriden (TG) in der Skelettmuskulatur (intramyozelluläre Lipide (IMCL)) und der Leber zusammen. [7] Insbesondere HCL sind stark negativ mit der Insulinsensitivität assoziiert [7, 14] und könnten zur Entstehung von T2DM und kardiovaskulären Erkrankungen beitragen. [15-17] Durch eine reduzierte Synthese von Leberglykogen ist die hepatische Insulinresistenz, vor allem für erhöhte Nüchternblutglukosespiegel (BG), aber auch für hohe postprandiale BG-Spiegel, verantwortlich.
Eine Verminderung der HCL verbessert die Glukoseaufnahme des Gesamtkörpers und folglich die Glykämie. [18] Daher ist die Therapie der NAFLD, unabhängig von der Verhinderung einer Progression zur Leberzirrhose, für die Behandlung und Prognose des T2DM von klinisch-therapeutischer Relevanz.
NASH ist eine Steatose mit entzündlichen Veränderungen der Leber, die zu Leberfibrose und -zirrhose führen kann. [19, 20] In der Allgemeinbevölkerung der westlichen Industrienationen wird die Inzidenz, an einer NASH zu erkranken, auf 2-3% geschätzt. [12, 13] Von den oben genannten 70-95% der Patienten mit Fettleber entwickeln 9-30% eine NASH und 7-16% eine Leberzirrhose. [21] Für die Entstehung einer NASH gelten Insulinresistenz, ein gestörter TG-Stoffwechsel, eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion, oxidativer Stress und eine Dysregulation der Produktion von Hormonen aus dem Fettgewebe (Adipokine) als Schlüsselfaktoren.
Die Ursachen für die Entwicklung von einer Steatose zu NASH und Zirrhose sowie die Rolle der Leber in der Entstehung einer Insulinresistenz des Menschen sind noch nicht im Detail geklärt. Allerdings sind die HCL nicht nur Marker für die Insulinresistenz auf Ebene der Leber, sondern auch des Skelettmuskels.

1.1.3 Erhöhte Verfügbarkeit von freien Fettsäuren und der hepatische Energiestoffwechsel

Erhöhte Verfügbarkeit von Lipiden, gemessen als erhöhte Plasmaspiegel freier Fettsäuren (FFS), ist typisch für insulinresistente Kollektive, wie Patienten mit T2DM oder Adipositas. [22] Die Erhöhung der Plasma-FFS ist einerseits bedingt durch eine fettreiche, hochkalorische Diät bei geringer körperlicher Aktivität, andererseits durch gesteigerte Lipolyse-Raten, die zu einer vermehrten Freisetzung von FFS aus dem Fettgewebe führen.

Der gesteigerte FFS-Fluss zur Leber kann die endogene Glukoseproduktion (EGP) zum einen durch die Bereitstellung von Glyzerol und zum anderen durch die Produktion von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) bei vermehrter β-Oxidation der FFS in der Leber stimulieren. Neben der gesteigerten Zufuhr von FFS stimulieren auch erhöhte Plasmaspiegel von Insulin und Glukose die de novo Synthese von Fettsäuren und TG. Die übermäßige selektive Aktivierung des Insulinsignalweges in der Leber führt letztendlich zur Stimulation der Lipogenese. Übersteigt die Aufnahme und Synthese von Lipiden in der Leber die Rate des Lipidabbaus durch mitochondriale Oxidation, wird die Entwicklung einer Steatose begünstigt. [23] Die Wechselwirkung zwischen einer Steatose der Leber und der Insulinsensitivität des Muskels ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt.

Proteine, die in der Leber synthetisiert und sezerniert werden und ihre systemische Wirkung entfalten (Hepatokine), sollen bei dieser Wechselwirkung eine wichtige Rolle spielen (z.B. FGF-2, Fetuin A, Selenoprotein P). [24]

Patienten mit NAFLD weisen eine herabgesetzte Aktivität der Enzymkomplexe der Atmungskette in der Leber auf. [24] Allerdings werden erst mit der Entwicklung einer NASH auch Dysmorphologien der Mitochondrien sichtbar. [14]

Szendroedi et al. demonstrierten, dass Phosphormetabolite bei Patienten mit T2DM in der Leber vermindert sind und dass diese Reduktion mit der hepatischen Insulinresistenz zusammenhängt. Sie wiesen den negativen Zusammenhang zwischen hepatischem ATP und Pi sowie der hepatischen Insulinsensitivität nach. [23]

Szendroedi und Schmid et al. zeigten, dass übergewichtige Patienten mit T2DM eine reduzierte ATP-Syntheserate in der Leber haben, die negativ mit Körperfett und HCL, jedoch positiv mit der hepatischen Insulinsensitivität, korreliert. [23, 25] Die Daten unterstützen die Hypothese, dass der hepatozelluläre mitochondriale Energiestoffwechsel eine Schlüsselrolle in der Progression der einfachen NAFL zur NASH spielt: Störungen der Mitochondrienfunktion, Schädigung mitochondrialer Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Proteine durch oxidativen Stress könnten die Aktivierung zytotoxischer Prozesse und schließlich die Progression einer NAFL zur Leberfibrose nach sich ziehen. [26]

1.1.4 Die Regulation des hepatischen Glukosestoffwechsels in insulinsensitiven und insulinresistenten Menschen

Menschen mit T2DM, aber auch Menschen mit Risikofaktoren für T2DM, sind durch muskuläre und hepatische Insulinresistenz charakterisiert. [27]

Die muskelspezifische Insulinresistenz, die durch reduzierte insulinstimulierte muskuläre Glukoseaufnahme und Glykogensynthese gekennzeichnet ist, könnte postprandial Glukose und Lipide vom Muskel zur Leber leiten.
Dies wiederum führt möglicherweise zu einer Steigerung der dortigen de novo Lipogenese. Diese Umstände können eine Dyslipoproteinämie und die Entwicklung einer NAFLD begünstigen. [5]
Eine gestörte Insulinsuppression der EGP reflektiert die hepatische Insulinresistenz bei Patienten mit NAFLD. Bei Insulinsensitiven hält die Leber hingegen die Glukosehomöostase, nach der Nahrungsaufnahme durch Glukoseaufnahme und dauerhafte Glykogensynthese sowie während der Fastenperiode, durch Kontrolle der Glykogenolyse und EGP aufrecht. Während anhaltenden Fastens steigert die Leber von Gesunden allmählich die Glukoneogenese (GNG) aus Laktat, Pyruvat, Glyzerol und verzweigtkettigen Aminosäuren, um die EGP aufrechtzuerhalten. [28, 29]
In der postprandialen Phase stimuliert die Hyperglykämie die Insulinsekretion. Diese hemmt die GNG und die Glykogenolyse, woraus eine verminderte EGP resultiert. Zusätzlich führt eine gesteigerte Glykogensynthese zu einer schnellen Normalisierung der BG-Werte nach Nahrungsaufnahme. [9, 30, 31] Die GNG-Raten können auch bei adipösen Glukosetoleranten erhöht sein. Dies kann eine Folge gesteigerter FFS-, Azetat-, und Glyzerolplasmakonzentrationen sein. Im Gegensatz dazu bleibt die EGP durch eine intakte Hemmung der Glykogenolyse infolge der reaktiven Hyperinsulinämie noch normal. [32]
Bei T2DM ist hauptsächlich die Leber für den Anstieg der Nüchternglukosewerte verantwortlich. Diese werden durch eine vermehrte basale EGP [9] infolge einer erhöhten GNG sowie Glykogenolyse verursacht. [30, 33] Nach der Nahrungsaufnahme kommt es bei T2DM zu einer beeinträchtigten Hemmung der EGP, wodurch weiter steigende Plasmaglukosekonzentrationen mit einer verminderten Glykogensynthesekapazität verbunden sind. [9, 30] Demzufolge verursacht eine hepatische Insulinresistenz sowohl nüchtern als auch postprandial die Entstehung einer Hyperglykämie. Demnach ist die Leber für die Entwicklung glukosesenkender Therapieoptionen von großem Interesse.
Konzepte für die Entwicklung einer hepatischen Insulinresistenz basieren auf einem Ungleichgewicht zwischen dem Verzehr von Lebensmitteln und dem Energieverbrauch, was zu einer ektopen Lipidspeicherung in der Leber führt. Die Insulinresistenz verursacht einen gesteigerten Fluss von FFS und Glyzerol vom Fettgewebe zur Leber sowie eine verminderte Glykogenspeicherungskapazität in Leber und Muskel, wohingegen die stimulierende Wirkung von Insulin auf die Lipogenese weiterhin erhöht ist. [34-36]

Dabei kommt es im Plasma allmählich zu steigenden Glukose- und Insulinkonzentrationen, die durch Aktivierung von *Sterol regulatory element binding protein-1* und *Carbohydrate regulatory element binding protein-1* (ChREBP-1/SREBP-1) zu einer Stimulation der hepatischen de novo Lipogenese führen. [37]
Die beeinträchtigte insulinvermittelte Hemmung der hormonsensitiven Lipase steigert wiederum die Abgabe von zirkulierendem Glyzerol und FFS im Fettgewebe insulinresistenter Individuen. [38] Dies ist sowohl mit steigenden HCL als auch mit der Insulinresistenz der Leber eng assoziiert. [30, 39] FFS werden nicht nur im Fettgewebe, sondern in Form von TG in Leber und Muskel gespeichert. (Abbildung 1 (Abb.))

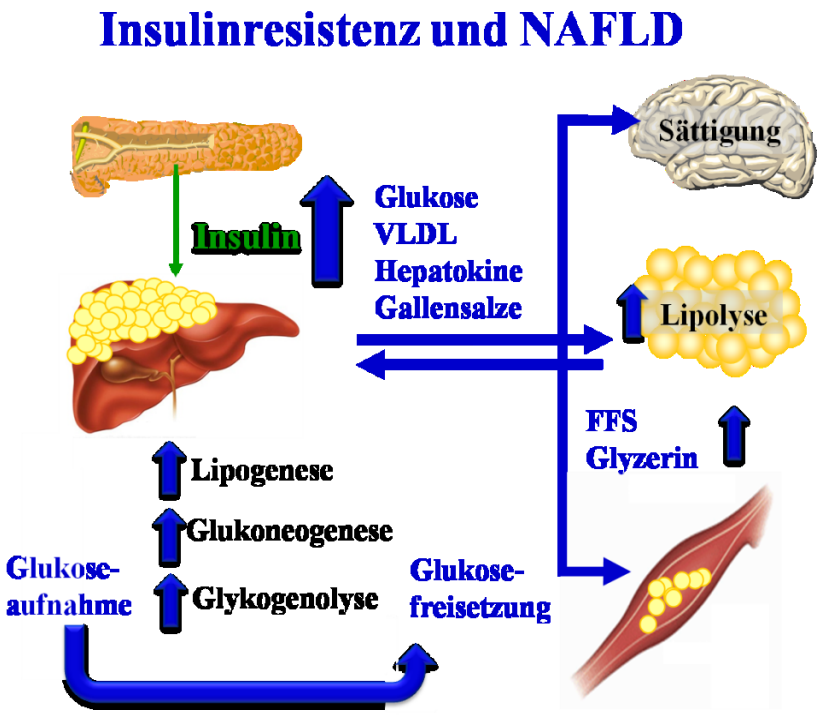

Abb. 1: Insulinresistenz und NAFLD

NAFLD: Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung; FFS: freie Fettsäuren; VLDL: *very-low density lipoprotein*

Nach einer Kohlenhydrataufnahme könnte der insulinresistente Muskel durch die Reduktion der Glykogensynthese und die vermehrte de novo Lipogenese der Leber eine atherogene Lipidstörung hervorrufen. [40, 41] (Abb. 2)

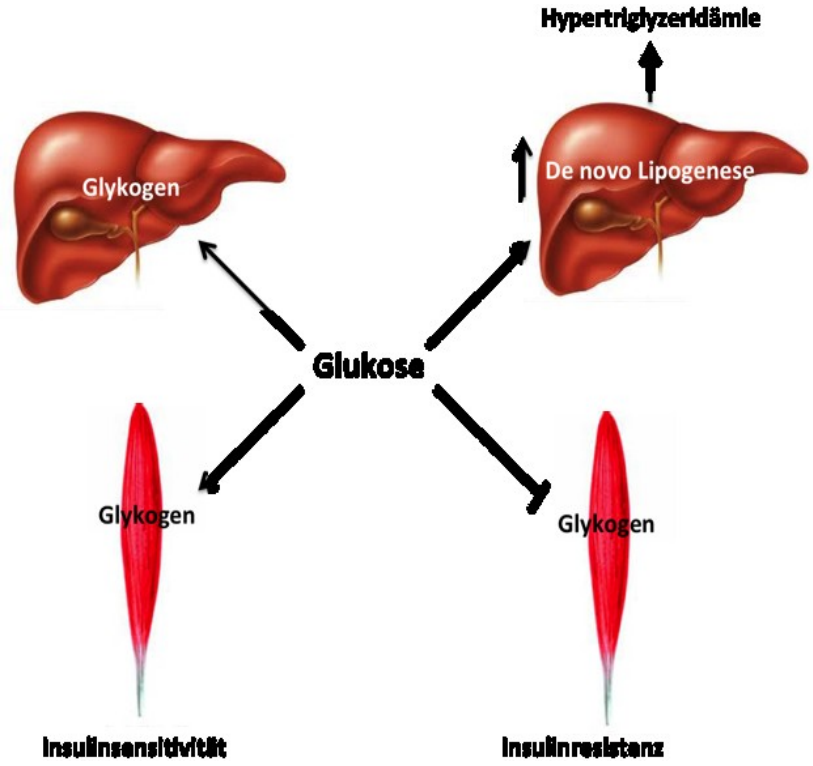

Abb. 2: Aufnahme einer kohlenhydratreichen Mahlzeit bei Insulinsensitivität und –resistenz (modifiziert nach: [40])

Wenn die Aufnahme und die Synthese der Lipide in der Leber deren Abbaurate durch die mitochondriale Oxidation übersteigt, begünstigt dies die Entstehung einer Steatose. Somit würden die Verbesserung der hepatischen Lipidoxidation und die Hemmung der Lipolyseraten des Fettgewebes eine geringere GNG und eine verbesserte glukometabolische Kontrolle nach sich ziehen. Des Weiteren scheint ein verminderter Lipid- bzw. Glyzerolfluss vom Fettgewebe zur Leber zu einer Reduktion der HCL und zur Verbesserung der NAFL zu führen.

Laut Petersen et al. verursacht die Aufnahme von zwei kohlenhydratreichen Mahlzeiten eine 60-prozentige Reduktion der Glykogensynthese im Muskel und einen zweifachen Anstieg der HCL bei schlanken, insulinresistenten Menschen im Vergleich zu Insulinsensitiven. Dies könnte ein Resultat der Umlenkung der Glukose vom insulinresistenten Muskel zur Leber, gefolgt von einer gesteigerten Stimulation der Lipogenese durch hohe postprandiale Insulinspiegel oder von einer Reduktion der hepatischen Lipidoxidation, sein. [40]

1.1.5 Die Bedeutung der mitochondrialen Funktion für die hepatische Insulinresistenz

Bei der Verwendung neuer Methoden zur nicht-invasiven Bestimmung des hepatischen Energiemetabolismus mittels Phosphor-Magnetresonanzspektroskopie (^{31}P MRS) hat die Gruppe von Roden et al. gezeigt, dass Patienten mit T2DM geringere absolute hepatische Konzentrationen von ATP und Pi als Gesunde haben. [23] Koliaki et al. untersuchten weiterhin den hepatischen Energiestoffwechsel in verschiedenen Stadien der NAFLD. Sie überprüften die Anpassung des hepatischen Energiestoffwechsels an erhöhte Lipid- und Glukosespiegel bei Adipositas durch vermehrte oxidative Kapazität. [42]

NAFLD-Patienten haben eine gesteigerte mitochondriale β-Oxidation. [14, 43, 44] Die Fähigkeit ihrer Leber, ATP nach der Fruktoseinjektion zu resynthetisieren, ist verringert und negativ mit dem BMI assoziiert. (Abb. 3) [45]

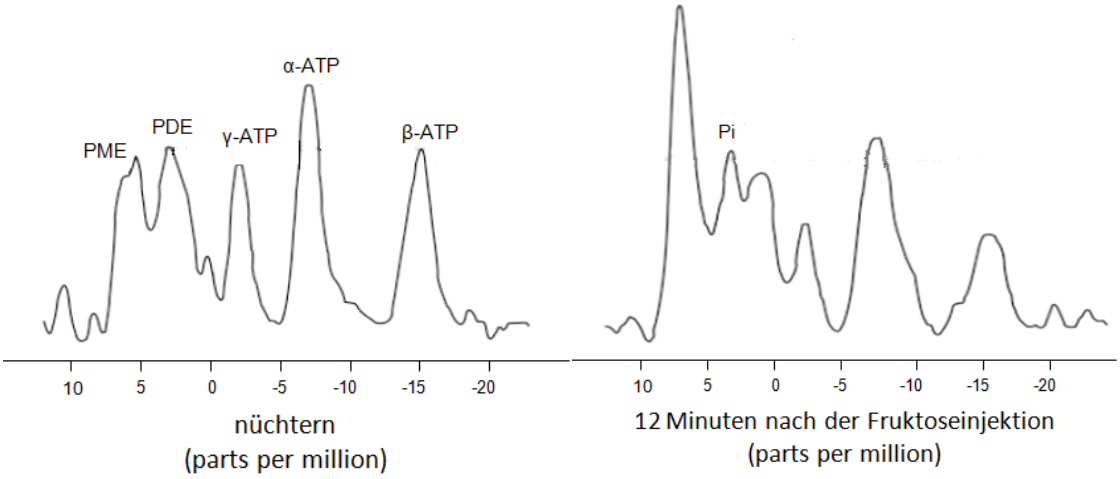

Abb. 3: Hepatische ATP-Homöostase bei nichtalkoholischer Steatohepatitis (modifiziert nach: [45])

PME: Phosphormonoester, PDE: Phosphordiester, ATP: Adenosintriphosphat, Pi: anorganisches Phosphat

Cortez-Pinto et al. erkannten außerdem, dass der BMI der stärkste Prädiktor für die ATP-Resynthese ist und dass diese hepatische Fähigkeit nach der Fruktoseinjektion bei den Patienten mit T2DM im Vergleich zu den Kontrollen verringert sowie negativ mit dem BMI verbunden ist. [45] Abb. 4 fasst die mögliche Rolle der mitochondrialen Funktion in der ektopen Lipidablagerung und der Insulinresistenz zusammen.

Samuel et al. zeigten in einer Untersuchung an Ratten und Mäusen, dass die hepatische Steatose mit einer verminderten, durch die Insulinrezeptorkinase vermittelten, IRS-2-Tyrosinphosphorylierung assoziiert ist, was die insulinaktivierte hepatische Glykogensynthese und die hepatische Glukoseproduktion hemmt. [46]

Bei Übergewichtigen und Patienten mit T2DM könnte die Lipidakkumulation durch die verstärkte Lipidverfügbarkeit und die Begrenzung der mitochondrialen Oxidation verursacht werden. Eine gesteigerte Verfügbarkeit der FFS führt zu einem Anstieg von Metaboliten des Lipidstoffwechsels, wie z.B. Diazylglyzerole (DAG) und Ceramide. Der steigende DAG-Gehalt ist zum einen durch ein gesteigertes Angebot an Chilomikronresten begründet, das durch die vermehrte Nahrungsaufnahme oder in Abhängigkeit der Nahrungszusammenstellung, wie z.B. bei fettreicher Ernährung, hervorgerufen wird. Zum anderen besteht die Möglichkeit der hepatischen DAG-Akkumulation bei gesteigerter FFS-Freisetzung durch die Adipozyten.

Außerdem kann es bei bestehender skelettmuskulärer Insulinresistenz zu einer de novo Lipogenese kommen, die zu einem hepatischen DAG-Anstieg führt. Abschließend kann auch eine verminderte Mitochondrienfunktion in einer DAG-Akkumulation resultieren. [47] Insgesamt reflektiert der DAG-Gehalt das Gleichgewicht zwischen der Lipogeneserate, der mitochondrialen Fettsäureoxidation und der Umwandlung von DAG zu TG. Es besteht somit die Möglichkeit des Zusammenhangs zwischen einer geringeren mitochondrialen Oxidationsrate im Vergleich zur hepatischen Lipogenese und der DAG-Akkumulation bzw. der hepatischen Insulinresistenz. [48-51]

Die DAG können den Insulinsignalweg durch eine Aktivierung neuer Proteinkinase C-Isoformen (PKC), darunter v.a. PKCε, beeinflussen. [46] PKCε besitzt eine deutlich höhere DAG-Affinität. [52] Die Aktivierung des PKCε bei hepatischer Insulinresistenz geschieht durch eine direkte Bindung bzw. Hemmung der Insulinrezeptorkinaseaktivität. [53, 54] Das wiederum führt zu einer Hemmung der insulinstimulierten Tyrosinphosphorylierung des IRS 1 und 2 [55, 56], was in einer verminderten Aktivierung von 1-Phosphoinositol 3-Kinase (PI-3Kinase) und Akt2 resultiert. Letzteres führt wiederum zu einer Reduktion von Glykogensynthese und GNG-Hemmung, wodurch wiederum ein Glukoseangebot mittels Glukosetansporter 2 entsteht. [47]

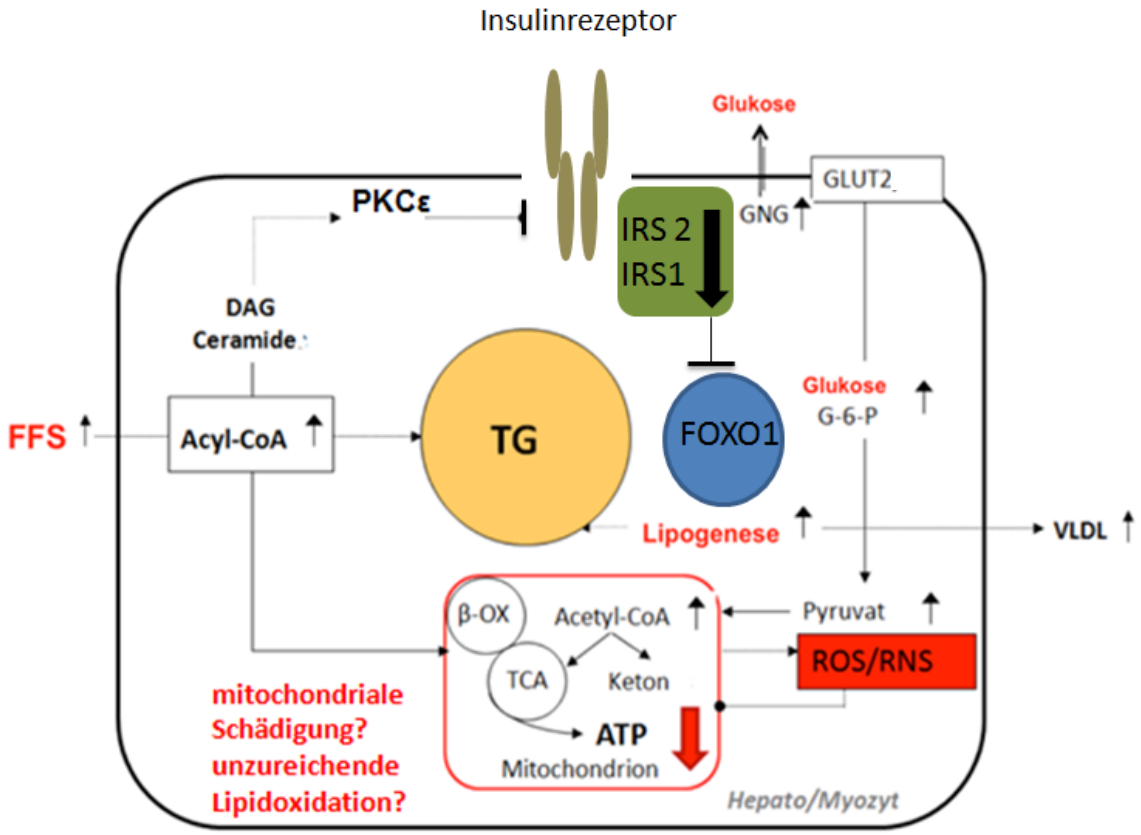

Abb. 4: Insulinresistenz und mitochondriale Funktion (modifiziert nach: [57])

Acyl-CoA: Acyl-Coenzym A; FFS: freie Fettsäuren; DAG: Diacylglycerol; PKCε: Proteinkinase C epsilon; IRS: Insulinrezeptorsubstrate; GNG: Glukoneogenese; GLUT: Glukosetransporter; G-6-P: Glucose-6-phosphat; VLDL: *very-low density lipoprotein*; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; RNS: reaktive Stickstoffspezies; β-Ox: Beta-Oxidation; TCA: Tricarbonsäurezyklus; FOXO1: *forkhead box protein O1*

Dysmorphologien der Mitochondrien gehen häufig mit NASH einher. [14] Patienten mit NAFLD weisen im Rahmen der gestörten Mitochondrienaktivität eine verminderte Aktivität der Enzymkomplexe der Atmungskette auf. [24] Es kommt durch das erhöhte Lipidangebot zu einer gesteigerten β-Oxidation, die den Citratzyklus und die OXPHOS-Kapazität übersteigt, was zu einer inkompletten Fettsäureoxidation führt. Dies wiederum verursacht eine intrazelluläre Ansammlung von lipotoxischen Stoffwechselprodukten, die den intrazellulären Signaltransduktionsweg stören und zur Insulinresistenz beitragen. [22] Reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) steigen. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass der hepatozelluläre mitochondriale Energiestoffwechsel eine Schlüsselrolle in der Progression der NAFLD zur NASH spielt.

Der verstärkte Substratfluss zur Leber könnte auch zu einer gesteigerten Lipidoxidation mit einer Produktion von ROS und einer Induktion von oxidativem Stress führen [58], wodurch die mitochondriale Funktion beeinträchtigt und Entzündungsprozesse hervorgerufen werden können, die die Entwicklung der NASH fördern.

ROS aktivieren stressaktivierte Proteine, wie Serin/Threonin-Kinasen (z.B. c-Jun N-terminale Kinasen), die eine Insulinsignaltransduktion durch die Phosphorylierung der IRS-Proteine hemmen. [59] Des Weiteren resultieren erhöhte ROS in einer Reduktion der hepatischen ATP-Konzentration und -Produktion. Lipidmetabolite stimulieren über die Aktivierung des CHREBP und SREBP die Lipogenese. Dies wiederum steigert die TG- und die VLDL-Produktion.

ROS sind als Mediatoren jedoch auch in vielen physiologischen zellulären Prozessen unverzichtbar. Allerdings können eine exzessive Produktion und/oder ein inadäquater antioxidativer Schutz eine Lipidperoxidation auslösen und eine oxidative DNA-Zerstörung verursachen. [60, 61] Möglicherweise führt eine fettreiche Ernährung anfangs zu einer gesteigerten mitochondrialen Biogenese und Verbesserung der oxidativen Kapazität. Dadurch wiederum wird oxidativer Stress ausgelöst. Demzufolge ist eine mitochondriale Funktionsstörung eher eine Konsequenz als eine primäre Ursache der Überernährung. Die Verschiebung des Redoxgleichgewichts und der reduzierten Insulinsensitivität könnte somit ein Versuch sein, das metabolische Gleichgewicht wiederherzustellen.

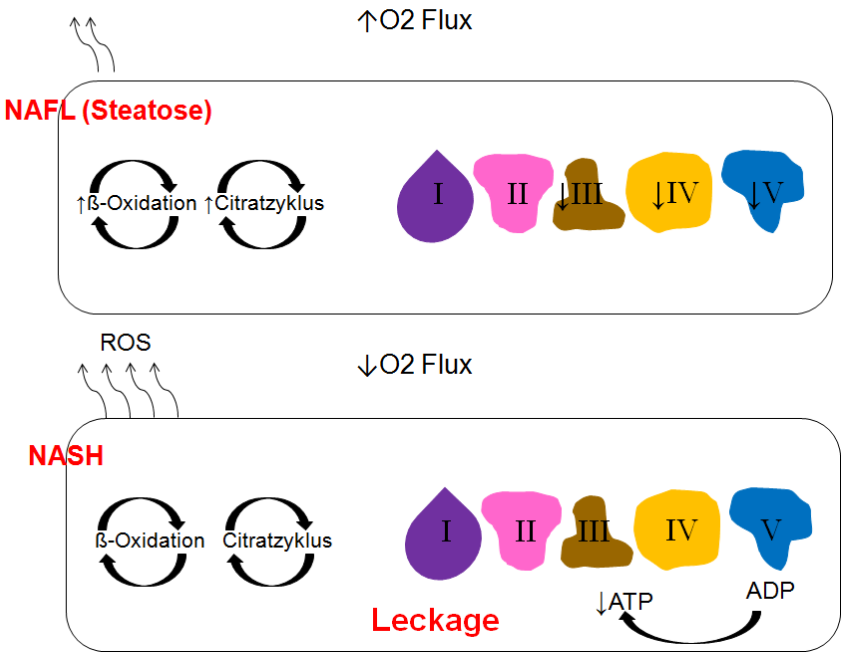

Abb. 5: Die Auswirkung der Insulinresistenz auf die hepatische Mitochondrienfunktion (modifiziert nach: [62])

ADP: Adenosindiphosphat; ATP Adenosintriphosphat; NAFL: nichtalkoholische Fettleber; NAFLD: nichtalkoholische Fettlebererkrankung; NASH: nichtalkoholische Steatohepatitis; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

Der Insulinsignalweg unterhält den Elektronentransportweg durch die Unterdrückung des Transkriptionsfaktors *forkhead box O1* (FOXO1) und dessen Zielgene, v.a. Hämooxygenase 1 (*HMOX1),* der die Komplexe III und IV des Elektronentransporters behindert. Es kommt zu einer Verminderung des Verhältnisses vom oxidierten zum reduzierten Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+:NADH) in den hepatischen Mitochondrien, was wiederum zur Aktivierung NAD^+-abhängiger Sirtuine führt. Diese deacetylieren bzw. aktivieren *PPARγ-coactivator 1α* (PGC-1α), welches der Haupttranskriptionsfaktor der mitochondrialen Biogenese ist. [56] (Abb. 6)

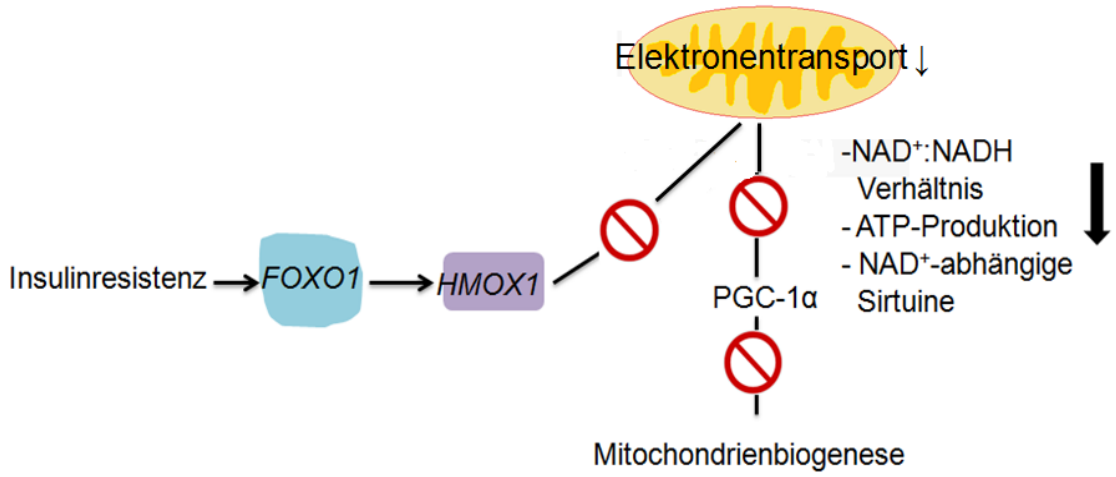

Abb. 6: FOXO1- Aktivierung bei Insulinresistenz

FOXO1: *forkhead box O1; HMOX1:* Hämooxygenase 1; NAD^+:NADH: Verhältnis zwischen oxidiertem und reduziertem Nicotinamidadenindinukleotid; ATP: Adenosintriphosphat; PGC1α: *PPARγ-coactivator 1α*

Somit könnte die Unterdrückung der Freisetzung von Lipiden und Glyzerol und des Flusses zur Leber die hepatische mitochondriale Funktion verbessern und sie vor der oxidativen Schädigung und der Progression der NAFLD zur NASH schützen.
Vorherige Studien, wie die von Rabol et al., demonstrierten den positiven Einfluss einer Bewegungseinheit auf die postprandiale muskuläre Glykogensynthese, die verminderte postprandiale de novo Lipogenese und die hepatische TG-Synthese. Rabol zeigte, dass eine intensive Bewegungseinheit nach einer kohlenhydratreichen Nahrung in jungen, gesunden, schlanken, insulinresistenten Probanden zu einem Anstieg des muskulären Glykogengehalts und einer Reduktion des Leberfettgehalts um ungefähr 40% führt.

Nach der Durchführung der Bewegungseinheit steigt die Glykogensynthese im Skelettmuskel an und hat eine verminderte Lipogenese und reduzierte HCL zur Folge. [5]

1.2 Ziele und Hypothesen

Die vorgestellte Studie zielte darauf ab, die folgenden Hypothesen zu testen:

- HCL und Insulinresistenz korrelieren negativ mit der Mitochondrienfunktion in der Leber
- nach Einnahme einer Mahlzeit korreliert der Anstieg von ATP und Pi mit der Insulinsensitivität

Die Ziele dieser Studie waren nicht invasive Messungen von

- HCL (^{1}H MRS)
- Phosphormetaboliten: ATP, Pi (^{31}P MRS)

jeweils vor und nach einer standardisierten Mahlzeit,
sowie die Bestimmung der:

- hepatischen und muskulären Insulinsensitivität (Clamptest)

bei Probanden mit Adipositas und Patienten mit T2DM im Vergleich zu gesunden Probanden.

2. Methoden

2.1 Probanden

Die Charakteristika der Teilnehmer werden in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt. Wir untersuchten insgesamt 30 Probanden. Darunter waren 10 übergewichtige, ältere Patienten mit T2DM und 10 junge, insulinresistente, glukosetolerante Übergewichtige (OBE) von gleichem BMI. Als Kontrollen dienten 10 junge, normalgewichtige, insulinsensitive Probanden (CON). Alle Teilnehmer waren zwischen 20 und 70 Jahre alt. Zusätzlich wurde eine balancierte Geschlechterratio (50:50) eingehalten.
Die Patienten mit T2DM wurden in der Ambulanz der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert. Die anderen Probanden wurden über öffentliche Aushänge und Zeitungsanzeigen auf die Studie aufmerksam gemacht.
Alle Teilnehmer, die zur Screeninguntersuchung eingeladen wurden, legten ihre komplette Krankengeschichte offen und wurden einer körperlichen Untersuchung und Labortests unterzogen, um kardiovaskuläre, Leber-, Nieren- und Schilddrüsenerkrankungen auszuschließen.

T2DM-Patienten mit Insulintherapie, Inselzellantikörpern oder diabetesbezogenen Komplikationen wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen. Die Ausschlusskriterien beinhalteten zudem Rauchen, eine Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) bzw. *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS), Malignome, andere chronische Krankheiten, Autoimmunerkrankungen, Allergien, Anämie und psychische Störungen.

Die Teilnehmer wurden gewogen und ihre Körpergröße wurde bestimmt.

Zusätzlich erfolgten zweimalige Blutdruckmessungen (OMRON 705 IT; Omron Healthcare Europe B.V., Hoofddorp, Niederlande) und ein Elektrokardiogramm (GE medical system, Software Version 1.0, Freiburg, Deutschland). Im Anschluss daran wurden körperliche Untersuchungen und Blutabnahmen durchgeführt. Außerdem wurde eine Körperimpedanzmessung (BIA) gemacht, um den Körperfettanteil zu bestimmen. Daraufhin unterzogen sich die Teilnehmer, mit Ausnahme der Patienten mit T2DM, einem oralen Glukosetoleranztest (OGTT) mit 75 g Glukose. [63]

Bei CON durfte die Familienanamnese keine Diabeteserkrankungen beinhalten. Die normale Glukosetoleranz wurde durch den OGTT gesichert.

Das Studienprotokoll wurde vom Ethikkomitee der Heinrich Heine Universität unter dem Aktenzeichen 3157 auf Antrag von Prof. Dr. Michael Roden geprüft und stimmte mit den ethischen Richtlinien der Erklärung von Helsinki von 1975 überein. Jeder potentielle Teilnehmer wurde über den Zweck, den Hintergrund und mögliche Komplikationen der Studie informiert. Im Anschluss daran unterschrieb jeder Teilnehmer die Einverständniserklärung.

2.2 Studiendesign

Die Probanden wurden an zwei Tagen untersucht.

2.2.1. Versuchstag 1

Für die Beurteilung der basalen EGP wurde die Isotopenverdünnungstechnik mit Verabreichung von deuterierter Glukose (*D-[6,6-$^{2}H_{2}$]-Glukose)* im nüchternen Zustand verwendet. In einer hyperinsulinämisch-euglykämischen Clampuntersuchung wurden die hepatische und die muskuläre Insulinsensitivität untersucht.

2.2.2. Versuchstag 2

Im zweiten Teil der Studie tranken die Teilnehmer eine standardisierte Mahlzeit. Die Nahrungszufuhr diente der Stimulation und Messung der Änderung der HCL und der hepatischen Phosphormetabolite. Multinukleäre MRS ($^{1}H/^{31}P$ MRS) wurde für die Messungen der Phosphormetabolite (ATP, Pi, PME, und PDE) und der HCL durchgeführt.

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Studienprotokoll I

Die Probanden wurden angewiesen, an den letzten drei Tagen vor dem Studientag eine isokalorische Diät einzuhalten und auf körperliche Anstrengungen zu verzichten. Glukosesenkende Medikamente sollten an den letzten drei Tagen vor Studienbeginn nicht genommen werden. Zusätzlich sollten sie 12 Stunden vor dem Versuchsbeginn Nahrungskarenz einhalten. [23]

Der Studientag startete um 7.00 Uhr mit dem Legen zweier Venenverweilkanülen (Vasofix; Braun, Melsungen, Deutschland) in die Ellenbeugen beider Arme, um darüber Blut abzunehmen und die Infusionen zu verabreichen.

Zur Bestimmung der basalen EGP wurden 3.6 g D-[6.6-$^2H_2$] Glukose (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) zu 367.5 ml 0.9% NaCl gegeben, um ein Infusat mit 8.0 mg/ml herzustellen. Diese Infusionslösung wurde in den ersten fünf Minuten in Form eines Bolus verabreicht, dessen Tropfgeschwindigkeit sich wie folgt berechnete:

Formel 1: Berechnung des Bolus

$$3.6\ mg/kg \times _kg\ Körpergewicht \times _mg\ /dl\ \text{Nüchternblutzucker} \div 90\ \text{mg/dl} = _\text{mg}$$
$$Bolus = _mg \div 8.0\ mg/ml = _ml\ Infusat \times 60 \div 5 = _ml/h\ für\ 5\ min$$

Die restliche Zeit wurde die Lösung als kontinuierliche Infusion bis zur Beendigung der Clampuntersuchung verabreicht. Die entsprechende Tropfgeschwindigkeit berechnete sich folgendermaßen:

Formel 2: Berechnung der Infusionsrate

$$0.036\ mg/kg \times _kg\ Körpergewicht \div _min = _mg/min$$
$$Infusionsrate = _kg\ Körpergewicht \times 0.036 \times 60 \times 8.0 = _kg\ Körpergewicht \times 0.27$$
$$= _ml\ /h$$

Die Clampuntersuchung zur Bestimmung der insulinsupprimierten EGP wurde als Maß der hepatischen Insulinsensitivität sowie zur Erhebung der muskulären Insulinsensitivität nach den basalen Messungen um 11.30 Uhr gestartet. Das Ziel lag darin, die Blutglukosewerte konstant auf etwa 90 mg/dl einzustellen.

Eine 20-prozentige Dextroseinfusion wurde mit 99% angereicherter D-[6.6-$^2H_2$] Glukose zu 2% angereichert und in regelmäßigen Abständen, dem Hot-Glukose-Infusionsprotokoll (GINF) entsprechend, zur Aufrechterhaltung euglykämischer Bedingungen verabreicht. [64] Wir bereiteten die Infusion wie folgt vor:

Formel 3: Clamp (*hot*-GINF)-Vorbereitung

$$98\ g\ Glukose\ (490\ ml\ Glukoselösung\ 20\%) =$$
$$519.4\ g\ Glukoselösung\ 20\% + 2.0\ gDD - Glukose\ (5\ ml\ Lösung\ enthalten\ 2.0\ g\ DD - Glukose) + 5.0\ g\ NaCl\ 0.9\%\ Lösung\ (= 5.0\ ml\ NaCl\ 0.9\%\ Lösung)$$
$$Gesamtgewicht = 530\ g = 100\ g\ Glukose\ (98\ g\ Glukose + 2.0\ g\ DD - Glukose = 2\%\ angereichert) in\ 500\ ml\ gelöst$$

Die Ganzkörperinsulinsensitivität wurde mithilfe der Glukoseinfusionen während des Gleichgewichtzustandes (M-Wert) in den letzten 30 Minuten der 150-minütigen Clampuntersuchung beurteilt. Des Weiteren wurde Insulin (Actrapid; Novo, Bagsvaerd, Dänemark) als kontinuierliche Infusion
[40 mU.(m Körperoberfläche)$^{-2}$.min^{-1}] von Minute 0 bis 150 verabreicht.
Um in den ersten 10 Minuten der Clampuntersuchung hyperinsulinämische Bedingungen mit ungefähr 500 pmol/l zu kreieren, wurde eine Insulininfusion in Form eines Bolus mit 40 ml/h gegeben. Im Anschluss daran wurde dies zum Erhalt euglykämischer Bedingungen mit ungefähr 90 mg/dl als kontinuierliche Infusion mit einer Pumprate von 20 ml/h bis zur Beendigung der Clampuntersuchung fortgeführt. Um die entsprechende Insulininfusion vorbereiten zu können, musste zuvor die Körperoberfläche (BSA) in Quadratmeter (m^2) berechnet werden:

Formel 4: Körperoberfläche (BSA) berechnen

$$BSA\ (m^2) = (_kg\ Körpergewicht) \times _cm \div 3600)^{0.5}$$

Formel 5: Vorbereitung des "Clamp"-Insulins

$$Anzahl\ der\ Insulineinheiten = (Insulin\ 40\ mU/m^2\ /min \times _m^2\ BSA \times 60\ min \times 100\ ml) \div (20\ ml/h \times 1000\ mU)\ _m^2\ BSA \times 12 = _IE\ Insulin\ ActrapidHMU\ 40 + 96\ ml\ NaCl\ 0.9\% + 4\ ml\ Probandenblut$$

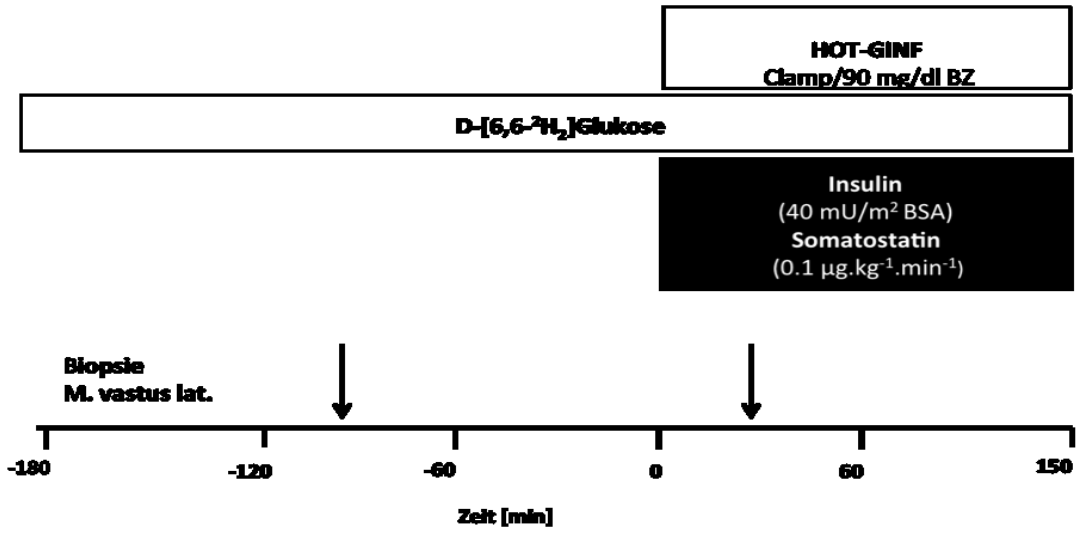

Abb. 7: Studienprotokoll

Hot-GINF: *Hot*-Glukose-Infusion; BZ: Blutglukose; D-[6,6-$^{2}H_2$]-Glukose: 99% angereicherte deuterierte Glukose; BSA: Körperoberfläche; M. vastus lat.: Musculus vastus lateralis

2.3.2 Studienprotokoll II

Nach erneuter zwölfstündiger Nahrungskarenz und dreitägigem Absetzen der glukosesenkenden Medikation wurden die Teilnehmer zum wiederholten Mal gewogen. Zusätzlich wurden die Maße von Taille und Hüfte mit einem Maßband bestimmt. Um 8.00 Uhr unterzogen sich die Teilnehmer einer MRS-Untersuchung, bei der ^{31}P MRS- und ^{1}H MRS-Messungen durchgeführt wurden, um Phosphormetabolite und HCL zu bestimmen. Anschließend wurde ein Venenverweilkatheter gelegt und um 9.30 Uhr eine standardisierte Mahlzeit (*mixed meal test*, MMT) mit 652 Kilokalorien- zusammengesetzt aus 55% Kohlenhydraten, 15% Proteinen und 30% Fett- verabreicht. [9] Die Probanden mussten 6 ml Boost/kg Körpergewicht innerhalb von fünf Minuten verzehren, wobei das Maximum bei 360 ml lag.

Blut wurde 15 Minuten vor, sowie 0, 15, 30, 60, 90, 120, 160, 180 und 240 Minuten nach der Nahrungsaufnahme aus dem Venenverweilkatheter entnommen, um FFS, TG, Inkretine, Glukagon, Immunmediatoren und C-Peptide zu bestimmen. Parallel wurden zu diesen Zeitpunkten die Blutglukosespiegel bestimmt. Zwischen den Blutentnahmen wurde der Venenverweilkatheter jeweils mit NaCl 0.9% gespült. Um eine Verdünnung zu verhindern, wurde dies vor jeder Blutentnahme pausiert. Nach 160 und nach 240 Minuten wurden die ^{31}P MRS (Pi, ATP-Synthese) und ^{1}H MRS-Messungen wiederholt.

2.4 Analytik

2.4.1 Blutabnahmen

Bei Inklusion wurden Blutproben zu klinisch-chemischen Untersuchungen entnommen. Zur Evaluation des Glukose- und Fettstoffwechsels wurden Messungen von Glukose (mg/dl), FFS (µmol/l), Insulin (µU/ml), C-Peptid (mmol/l), TG (mg/dl), Glukagon (pmol/l) und Glyzerol (mg/l) unter basalen Bedingungen und in regelmäßigen Abständen während der Untersuchungen vorgenommen. Auch andere Parameter wie Zytokine und Adipokine wurden bestimmt.

2.4.2 Analyseverfahren

Die Plasmaglukose wurde mithilfe der Glukoseoxidasemethode (Glukose Analyzer II, Beckman Instr., Inc., Fullerton, CA) gemessen. Das venöse Blut wurde dazu luftblasenfrei in eine 20 µl Kapillare gefüllt, woraufhin überschüssiges Blut entfernt wurde. Anschließend wurde die Kapillare in ein vorgefülltes Reaktionsgefäß überführt.

Die Blutglukose wurde mithilfe der EKF-Maschine (Biosen C-line, Barleben, Deutschland) analysiert.
Zur Bestimmung der FFS diente die mikrofluorimetrische Methode (Wako Chem USA Inc., Richmond, VA). Die TG wurden durch eine Peroxidase-gekoppelte Kalorimetrie ermittelt (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).
Einer in vitro Lipolyse wurde durch Aufbewahrung des Blutes in Orlistat-enthaltenden Phiolen entgegengewirkt. [65]
Plasmakonzentrationen von Insulin, C-Peptid und Glukagon wurden durch ein doppeltes Antikörperimmunassayverfahren bestimmt. Plasmalaktatkonzentrationen wurden enzymatisch ermittelt. (Roche) [65, 66]

2.4.3 In vivo Isotopenverdünnungsanalyse

Die Anreicherung der Plasmaglukose mit D-[6.6-$^{2}H_{2}$]Glukose wurde mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) ermittelt. [23, 67]

2.4.4 Oraler Glukosetoleranztest

Der OGTT wurde im Rahmen der Screenings nach einer dreitägigen kohlenhydratreichen Ernährung und einer anschließenden Fastenperiode von 12 Stunden durchgeführt. Er diente der Detektion einer gestörten Glukosetoleranz. Der OGTT ist bei akuten Erkrankungen, gastrointestinalen Störungen oder bei Patienten mit T2DM kontraindiziert. Zu Beginn wurde die Nüchternblutglukose bestimmt.
75 g Glukose, aufgelöst in Flüssigkeit (Dextrose O.G-T., Accu Check®, Roche, Deutschland), wurde von den Teilnehmern in Form von 300 ml Saft innerhalb von fünf Minuten getrunken. Die Analysen von Blutglukose, Insulin und C-Peptid erfolgte bei Minute 0, 30, 60, 90 und 120 vor bzw. nach Einnahme des Getränkes. Die Ergebnisse des OGTT wurden entsprechend der WHO- Richtlinien interpretiert:

Nüchternblutglukose	**Blutglukose ‘120**	**Diagnose**
≥100; ≤126 mg/dl		gestörte Nüchternglukose
<126 mg/dl	≥ 140; ≤199 mg/dl	gestörte Glukosetoleranz
≥126 mg/dl	≥ 200 mg/dl	Typ 2 Diabetes mellitus

Tabelle 1: Grenzwerte des OGTT's [68]

2.4.5 Magnetresonanzspektroskopie

Die Teilnehmer lagen während der Messungen im 3.0-T Scanner (Philipps, Deutschland) in Rückenlage. Sie wurden langsam in die MR-Röhre geschoben, um Schwindel vorzubeugen.

Die MRS ist eine nicht-invasive und nicht-ionisierende Methode, die eine Untersuchung genau festgelegter Bereiche sowie die direkte und quantitative in vivo Messung biochemischer Flussraten und intrazellulärer Metabolite ermöglicht. [69]

Die Sicherheit der Studienteilnehmer war durch die Einhaltung der Leitlinien des *US Food and Drug Administration's Center for Devices and Radiological Health* (*Premarket Nostrifications for MR-Diagnostic Devices*) gewährleistet.

Das statische Feld war auf 3 T und die Lautstärke auf unter 40 dB limitiert. Der Gradientenwechsel wurde auf weniger als 20 T/sec eingestellt. Die Radiofrequenz lag weit unter den zulässigen Grenzwerten und wurde durch einen kalibrierten Leistungsmessfühler aufgezeichnet.

2.4.5.1 ^{31}P MRS /^{1}H MRS der Leber

Die Probanden wurden in Rückenlage untersucht, wobei eine 10x10 cm linear polarisierte Oberflächenspule für die ^{31}P MRS/^{1}H MRS-Messungen unter den lateralen Anteil der Leber positioniert wurde.

Die ^{31}P-dreidimensionale *k-space*–gewichtete MRS-*Imaging* (MRSI)-Lokalisations-Technik (13x13x13 Matrix; untersuchtes Feld: 20 cm x 20 cm x 20 cm; Wiederholungszeit: 1 Sekunde) ISIS wurde mit einem diabatischen Exzitationspuls zur Gewinnung der ^{31}P-Spektren verwendet. Das Protokoll inklusive Setup dauerte 45 Minuten. [70, 71]

^{1}H MRS wurde, wie zuvor beschrieben, für die Messungen der HCL verwendet. [72] Die Daten wurden unter der Anwendung der Formel von Longo et al. in absoluten Konzentrationen als Prozent Fett pro Volumen angegeben. [71, 73] Die hepatische Lipidvolumenfraktion (HLVF) wurde als HCL (1.138-0.339 HCL) berechnet. [73] Die gemessenen Konzentrationen an Phosphormetaboliten wurden für das von Liposomen der Hepatozyten eingenommene Volumen korrigiert. Dabei wurde die, für Leberfett adaptierte, Formel $[Pa]=[P]*(1-HLVF)^{-1}$ verwendet.

2.5. Berechnungen und Statistik

Die *Area under the curve* (AUC) wurde mithilfe der trapezoidalen Methode berechnet. Die Daten wurden, falls nicht anders verzeichnet, in den Tabellen und den Abbildungen stets als Mittelwert ± SEM angegeben.

Die statistischen Vergleiche zwischen Studiengruppen erfolgten durch ANOVA und die wiederholten Messungen, wenn nötig, durch ANOVA mit Bonferroni-*post hoc* Tests. Nicht normal verteilte Variablen (Insulin, TG, M-Wert und HCL) wurden logarithmisch transformiert.

Beim MMT wurden Schätzungen und entsprechende p-Werte für die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Gruppen zum jeweiligen Zeitpunkt sowie Unterschiede zwischen den Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe durch das Einfügen in *PROC MIXED* (SAS 9.3, Cary, USA) hergeleitet. Diese Methode entspricht einem generalisierten zweiseitigen ANOVA unter Berücksichtigung der Abhängigkeit zwischen den Beobachtungen zu den einzelnen Zeitpunkten.

Die Korrelationen nach Pearson und die entsprechenden p-Werte, die auf der Probengesamtheit basierten, wurden berechnet. Die nach Bonferroni angepassten p-Werte dienten als Kontrolle der Mehrfachvergleiche.

Partielle Korrelationen nach Pearson, die den Gruppeneffekten entsprechend angepasst wurden, wurden hergeleitet, um die Bedeutung der Gruppenzugehörigkeit als Störfaktor zu bestimmen.

Alle Analysen wurden mithilfe der SPSS 20.0-Software (SPSS Inc., Chicago, IL) oder SAS 9.3 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Studienteilnehmer

Die Teilnehmercharakteristiken sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt.

OBE und T2DM hatten einen höheren BMI ($p<0.001$), einen größeren Taillenumfang ($p<0.001$), ein höheres Taillen-Hüft-Verhältnis ($p<0.05$) und einen höheren Körperfettanteil als CON ($p<0.001$). Die Patienten mit T2DM waren im Vergleich zu OBE und CON älter und hatten höhere BG-Werte.

Während der Körperfettanteil zwischen OBE und T2DM vergleichbar war ($p=0.5$), war der BMI bei ersteren geringfügig höher ($p=0.04$). OBE zeigten im Vergleich zu CON höhere Serumkonzentrationen der Alanin-Aminotransferase (ALT) ($p=0.02$). Jedoch lagen die ALT-Werte aller Studienteilnehmer, mit Ausnahme zweier Probanden, die gering erhöhte ALT-Werte hatten (51 und 56 U/l), im Normbereich.

	CON	**OBE**	**T2DM**
n (männlich/weiblich)	10 (6/4)	10 (6/4)	10 (6/4)
Alter [Jahre]	28.0 ± 0.8*	31.0 ± 2.0*	61.3 ± 2.2

BMI [kg/m^2]	23.2 ± 0.5$^{\#}$*	34.3 ± 0.5*	32.0 ± 0.8
Taillenumfang [cm]	79.9 ± 2.1$^{\#}$*	113.3 ± 2.4	108.8 ± 3.4
Taillen-Hüft-Verhältnis	0.8 ± 0.0$^{\#}$*	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
Fettanteil [%]	22.1 ± 1.8$^{\#}$*	36.2 ± 1.9	39.6 ± 1.3
Glukose [mg/dl]	75.0 ± 2.0*	79.0 ± 3.0*	138.0 ± 14.0
HbA1c [%]	5.1 ± 0.1*	5.3 ± 0.1*	7.2 ± 0.4
ALT [U/L]	16.0 ± 2.0$^{\#}$	35.0 ± 5.0	24.0 ± 3.0
FFS [µmol/l]	353.0 ± 54.0*	502.0 ± 29.0	571.0 ± 61.0
M-value [mg kg^{-1} min^{-1}]	9.3 ± 1.0$^{\#}$	3.6 ± 0.4	2.5 ± 0.7

Tabelle 2: Studienteilnehmer

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. CON steht für junge, schlanke, insulinsensitive Glukosetolerante, OBE sind insulinresistente Übergewichtige und T2DM sind Probanden mit Typ 2 Diabetes.

n (Anzahl (männlich/ weiblich)); BMI, *body mass index* [kg/m^2]; HbA1c, Hämoglobin A1c [%].

# p<0.05 im Vergleich zu OBE, *p<0.05 im Vergleich zu T2DM.

3.2 Glukosestoffwechsel bei Insulinstimulation

Die Ganzkörperinsulinsensitivität, die als M-Wert angegeben wird, war bei OBE und bei T2DM 61% bzw. 73 % niedriger als bei CON (p<0.01) (Abb. 8).

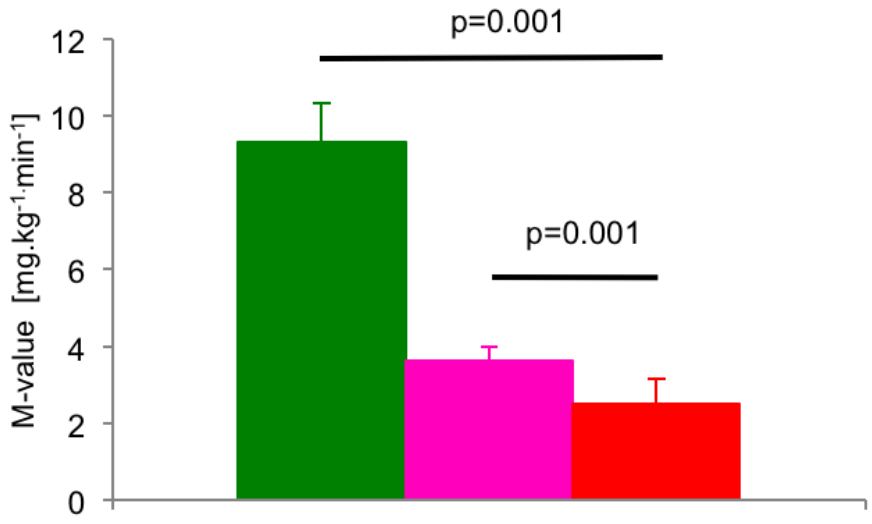

Abb. 8: Insulinsensitivität

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grüne Balken; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pinkfarbene Balken; n=10) und Patienten mit T2DM (rote Balken; n=10); *M-value:* Ganzkörperinsulinsensitivität. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Die hepatische Insulinsensitivität wurde in Form der insulinsupprimierten, endogenen Glukoseproduktion (iEGP) und der delta-EGP (basal vs. insulinstimuliert, dEGP) angegeben. Die iEGP war unter Nüchternbedingungen bei OBE mit 0.3 $mg.kg^{-1}.min^{-1}$ 72% niedriger als bei CON mit 1.2 $mg.kg^{-1}.min^{-1}$ (p=0.003). CON hatten um 57% höhere iEGP als T2DM (0.5 $mg.kg^{-1}.min^{-1}$) (Abb. 9).

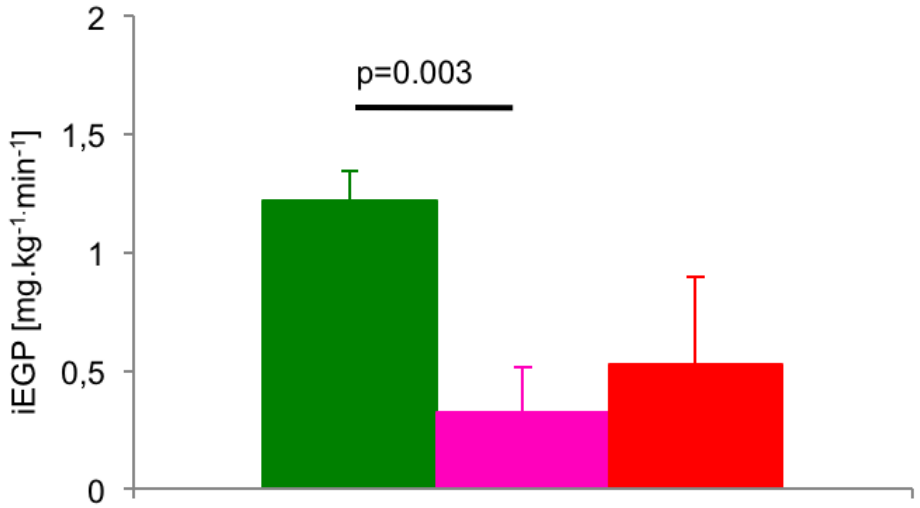

Abb. 9: insulinsupprimierte endogene Glukoseproduktion

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grüne Balken; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pinkfarbene Balken; n=10) und Patienten mit T2DM (rote Balken; n=10). iEGP: insulinsupprimierte endogene Glukoseproduktion [$mg.kg^{-1}.min^{-1}$]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Die dEGP war bei OBE niedriger als bei CON. Beim Vergleich zwischen CON und den T2DM wurde eine Differenz von 51% deutlich (p=0.02).

3.3 *mixed meal test*

3.3.1 Metabolite und Hormone vor und nach dem *mixed meal test*

Die Plasmaglukosekonzentrationen waren zu Beginn der Untersuchung unter Nüchternbedingungen bei T2DM 45% höher als bei CON und 42% höher als bei OBE. Allerdings ging die Signifikanz der Unterschiede nach der Korrektur für Mehrfachvergleiche verloren (p=0.12 und p=0.10). Die Spiegel blieben bei T2DM auch nach dem Verzehr der standardisierten Mahlzeit konstant erhöht.

Sie erreichten nach 120 Minuten ihren Spitzenwert von 234 ± 24 mg/dl und fielen danach wieder langsam ab, bis sie in Minute 260 bei 161 ± 26 mg/dl lagen.
Im Gegensatz dazu erreichten sowohl OBE als auch CON ihren jeweiligen Spitzenwert nach 30 Minuten. Dieser lag bei OBE bei 116 ± 8 mg/dl und bei den schlanken Insulinsensitiven bei 105 ± 9 mg/dl. Bei Minute 260 beendeten CON den Versuch im Mittel mit 76 ± 1 mg/dl und OBE mit 70 ± 2 mg/dl (Abb. 10).

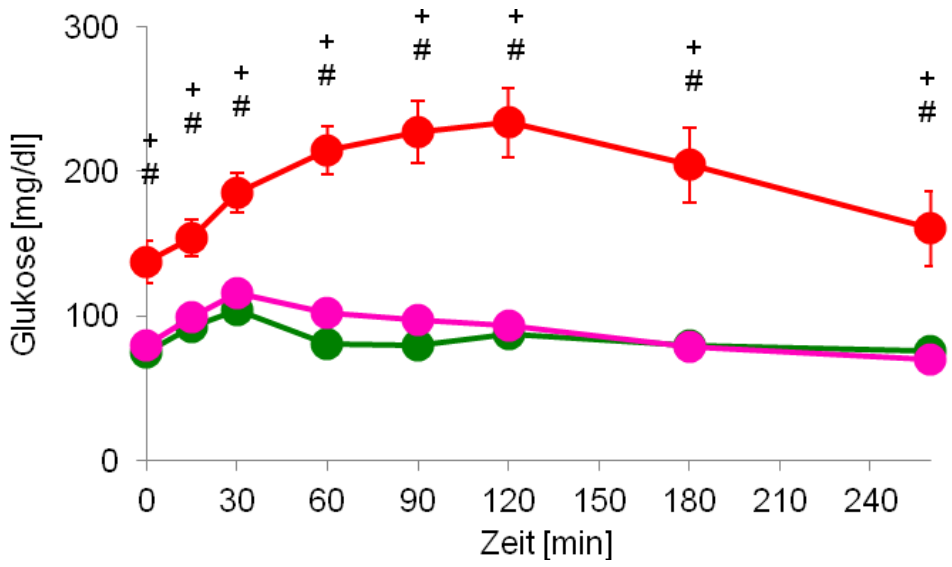

Abb. 10: Plasmaglukose während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse, Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.
+ CON vs. OBE $p<0.05$; # OBE vs. T2DM $p<0.05$

Das basale Plasmainsulin war bei T2DM und OBE 2.4- bzw. dreimal höher als bei CON ($p<0.05$). Außerdem waren die Insulinkonzentrationen bei Minute 30, 60, 90 und 120 bei OBE höher als bei T2DM. In diesem Vergleich fällt bei OBE postprandial auch der ausgeprägtere Spitzenwert von 169 ± 24 µU/ml auf, den diese im Mittel bei Minute 30 erreichten. Anschließend sanken die Konzentrationen des Plasmainsulins konstant, bis sie bei Minute 260 bei 18 ± 2 µU/ml lagen. Auch CON lagen bei Minute 30 bei ihrem Spitzenlevel mit 64 ± 9 µU/ml. Bei Minute 260 konnten Insulinkonzentrationen von 11 ± 3 µU/ml gemessen werden. Im Vergleich dazu erreichten T2DM nach 120 Minuten mit durchschnittlich 91 ± 20 µU/ml ihre höchsten Konzentrationen und fielen bis Minute 260 auf 27 ± 3 µU/ml zurück.
Insgesamt ergab sich bei OBE nach dem MMT im Vergleich zu CON eine 2.6-fach höhere Insulinausschüttung (AUC Insulin$^{0\text{-}260}$; Insulin angegeben in mU.ml^{-1}.min^{-1}: 8.8 ± 1.8 vs. OBE 22.8 ± 2.3 vs. T2DM 15.8 ± 3.2 ($p=0.002$ und $p=0.21$) (Abb. 11).

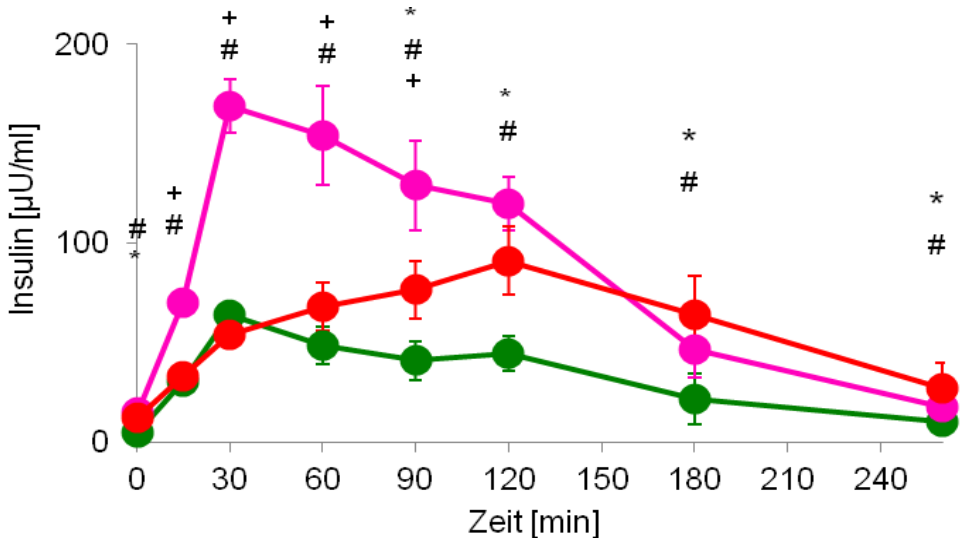

Abb. 11: Plasmakonzentrationen des Insulins während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. # CON vs. OBE p<0.05; * CON vs. T2DM p<0.05; + OBE vs. T2DM p<0.05

Im nüchternen Zustand waren die FFS-Konzentrationen im Plasma bei CON 30% geringer als bei OBE bzw. 38% geringer als bei T2DM. Nach der Zufuhr der standardisierten Mahlzeit sanken die FFS aller drei Teilnehmergruppen. Allerdings kam es bei CON innerhalb von 120 Minuten zur schnellsten Reduktion (p<0.001). Minimalwerte der FFS wurden sowohl bei CON als auch bei OBE nach 120 Minuten erreicht. Im Gegensatz dazu konnten die Minimalwerte der T2DM erst nach 180 Minuten bestimmt werden. (Abb. 12)

Die AUC der FFS war bei CON im Vergleich zu OBE und T2DM 50% geringer (p=0.03).

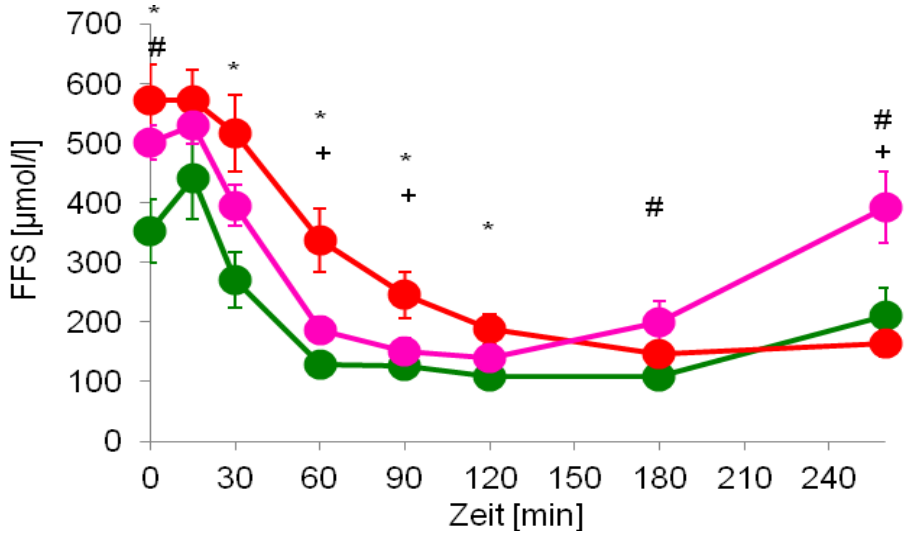

Abb. 12: Plasmakonzentrationen der freien Fettsäuren während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). FFS: freie Fettsäuren [µmol/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

CON vs. OBE p<0.05; * CON vs. T2DM p<0.05; + OBE vs. T2DM p<0.05

Die Messungen der TG-Konzentrationen ergaben nach dem Mehrfachvergleich sowohl nüchtern als auch postprandial zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede (T2DM: 131 ± 16 mg/dl; OBE: 144 ± 29 mg/dl; CON: 75 ± 13 mg/dl; p=0.25 und p=0.17). Nach 180 Minuten waren die Serumkonzentrationen bei T2DM im Vergleich zu CON höher. Eine ähnliche Tendenz konnte auch bei OBE beobachtet werden (T2DM: 209 ± 27 mg/dl; OBE: 196 ± 45 mg/dl; CON: 98 ± 23 mg/dl; p=0.04 und p=0.14). (Abb. 13)

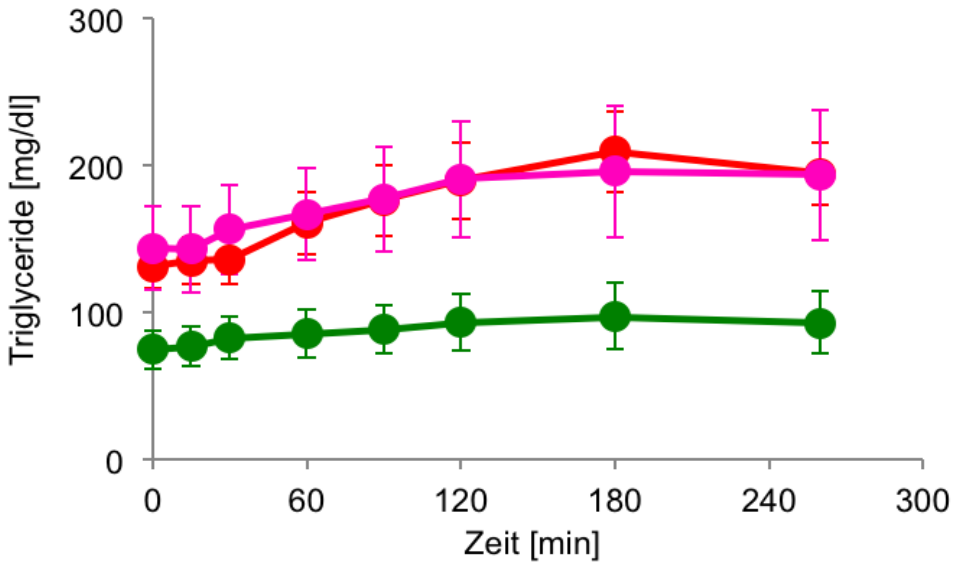

Abb. 13: Plasmakonzentrationen der Triglyzeride während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Die Plasmakonzentrationen des GIP stiegen nach der Zufuhr einer standardisierten Mahlzeit. Die Plasmaspiegel des GLP-1 waren postprandial bei T2DM ebenfalls erhöht. Eine ähnliche Tendenz war bei CON und OBE zu verzeichnen. Die GIP-Spiegel, die 260 Minuten nach der Zufuhr der standardisierten Mahlzeit gemessen wurden, waren bei OBE 60% geringer als bei T2DM, wohingegen die restlichen GIP-, GLP-1 und Glukagonspiegel sich zwischen den einzelnen Gruppen ähnelten.

	CON	OBE	T2DM
Anzahl	9	9	9
GLP1 [pg/ml]	3.9 ± 0.8	3.6 ± 1.6	2.2 ± 0.4
Anzahl	10	10	10
GIP [pmol/l]	84.3 ± 14.5	87.5 ± 46.0	72.1 ± 9.3
Anzahl	10	10	10
Glucagon [pg/ml]	98.6 ± 7.4	94.3 ± 6.6	99.7 ± 13.6

Tabelle 3: Inkretin und Glukagogenkonzentrationen während des *mixed meal test*

Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) angegeben. CON steht für junge, schlanke, insulinsensitive Glukosetolerante, OBE sind insulinresistente Übergewichtige und T2DM sind Probanden mit Typ 2 Diabetes. GLP1: Glucagon-like peptide 1 [pg/ml]; GIP: Glukoseabhängiges insulino-tropes Peptid [pmol/l].

Die unter Nüchternbedingungen im Plasma gemessenen TBARS waren bei allen drei Teilnehmergruppen vergleichbar. 180 Minuten nach der Zufuhr des MMT stiegen die TBARS-Spiegel im Plasma der T2DM um 18% an (p=0.047) (Tabelle 4, Abb. 14).

	CON	OBE	T2DM
Anzahl	8	7	8
TBARS 0 min [µmol/l]	2.6 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.6 ± 0.1
120 min [µmol/l]	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.7 ± 0.1
180 min [µmol/l]	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.5	3.2 ± 0.2#
260 min [µmol/l]	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.2

Tabelle 4: Plasma-TBARS während des *mixed meal test*

CON steht für die jungen, schlanken, insulinsensitiven Kontrollen, OBE sind die insulinresistenten Übergewichtigen und T2DM die Probanden mit Typ 2 Diabetes. TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

TBARS Minute 0 vs. TBARS Minute 180: $p<0.05$

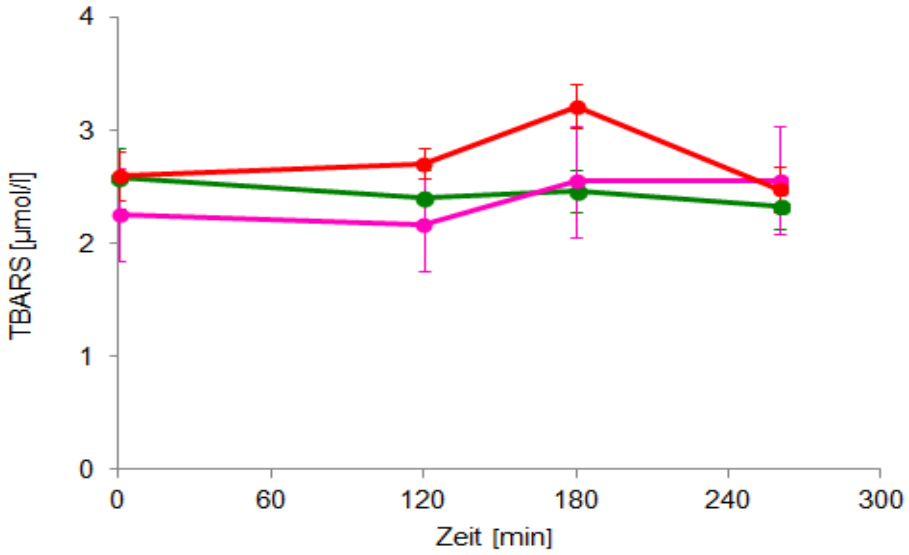

Abb. 14: Plasma-TBARS während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). TBARS: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen [uM/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Der höchste Maximalanstieg der TBARS wurde bei T2DM mit 0.7 ± 0.2 uM/l gemessen, wohingegen OBE um 0.4 ± 0.2 uM/l und CON um 0.02 ± 0.1 uM/l (p=0.08) anstiegen.

3.3.2 Resultate der ^{31}P MRS und ^{1}H MRS-Messungen in der Leber

Die basale ATP-Konzentration war zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar. Vor allem bei CON blieben die ATP-Spiegel bis zum Ende der Untersuchung bei Minute 240 mit 2.3 ± 0.1 mmol/l konstant auf diesem Level (p=0.97).

Im Vergleich dazu stiegen die Konzentrationen bei OBE um 27% auf 2.4 ± 0.1 mmol/l (p=0.009). Bei T2DM war ein Anstieg um 21% (p=0.03) zu verzeichnen (Abb. 15). Die basalen ATP-Werte werden in der unten stehenden Tabelle 5 noch einmal zusammenfassend dargestellt.

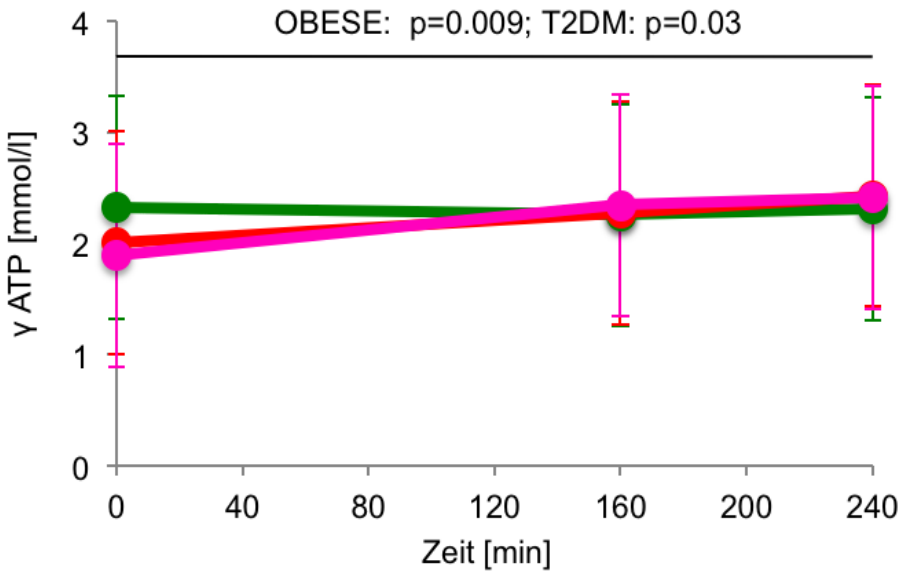

Abb. 15: Hepatisches γATP während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). γATP: Gamma-Adenosintriphosphat [mmol/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Entsprechend war der postprandiale Maximalanstieg des ATP bei OBE im Vergleich zu CON sechsmal höher (p=0.03). Ähnliche Tendenzen zeigten sich beim Vergleich der Werte zwischen T2DM und CON (p=0.08) (Abb. 16).

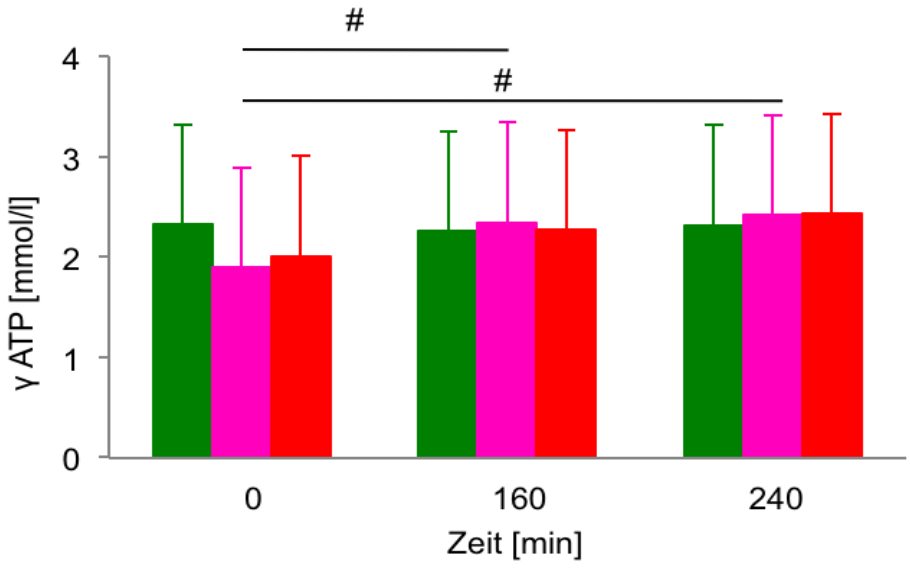

Abb. 16: Hepatisches γATP während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grüne Balken; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pinkfarbene Balken; n=10) und Patienten mit T2DM (rote Balken; n=10). γATP: Gamma Adenosintriphosphat [mmol/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

ANOVA für wiederholte Messungen: # p<0.05.

Bei CON lagen Pi-Konzentrationen basal 41% über den OBE (p=0.02). Bei Minute 160 erreichten CON 2.1 ± 0.1 mmol/l und bei Minute 240 2.3 ± 0.1 mmol/l. Zum Zeitpunkt 160 lag die Serumkonzentration der OBE bei 1.4 ± 0.2 mmol/l. Bis Minute 240 stieg ihr Pi auf 1.7 ± 0.1 mmol/l.

T2DM waren basal 32% niedriger als CON. 160 Minuten nach der Zufuhr der standardisierten Mahlzeit lag die Konzentration bei 1.6 ± 0.2 mmol/l und zum Zeitpunkt 240 bei 1.7 ± 0.2 mmol/l (Abb. 17). Die Pi-Werte werden in der unten stehenden Tabelle 5 noch einmal zusammenfassend dargestellt.

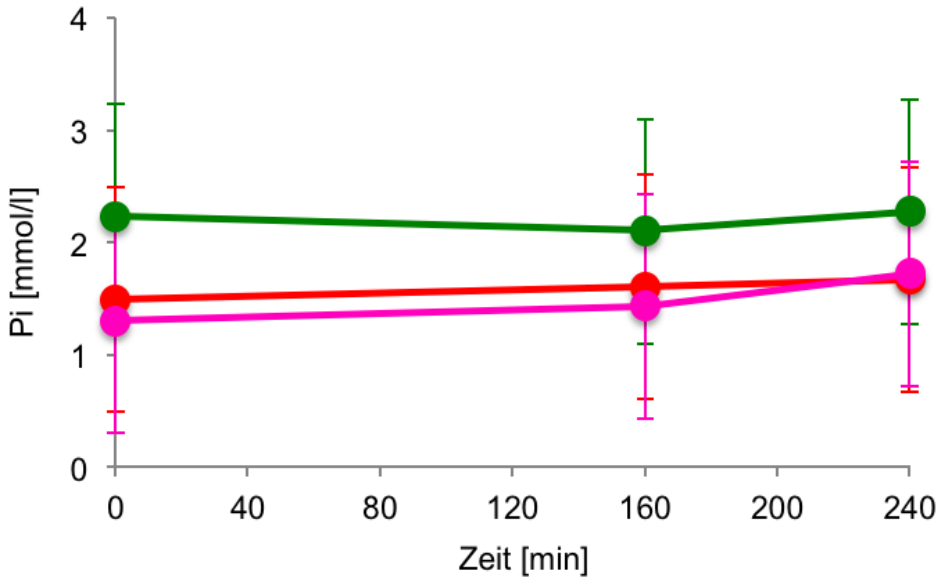

Abb. 17: Hepatisches anorganisches Phosphat während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). Pi: anorganisches Phosphat [mmol/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

Der Vergleich der Maximalanstiege zwischen den einzelnen Gruppen ergab keine Unterschiede. Der Vergleich der Mittelwerte des Pi zwischen OBE und CON ergab eine Differenz von 40.9%. Zwischen CON und T2DM lagen 31.8% (Abb. 18).

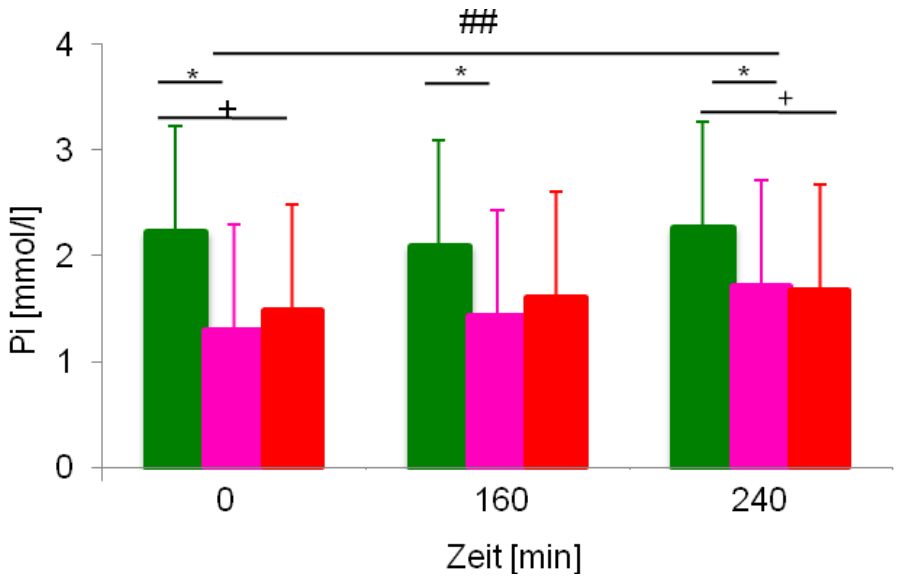

Abb. 18: Hepatisches anorganisches Phosphat während des *mixed meal test*

Grün: junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (n=10); pink: junge, adipöse Insulinresistente (n=10); rot: Patienten mit T2DM (n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. Pi: anorganisches Phosphat [mmol/l].

ANOVA einmalig verwendet: * CON vs. OBE $p<0.05$, + CON vs. T2DM $p<0.05$, ANOVA bei wiederholten Messungen: # $p<0.05$; ## $p=0.051$ bei OBE

Der Quotient des γATP/Pi war bei OBE 31% höher als bei CON. (Abb. 19). Die γATP/Pi-Quotienten werden in der unten stehenden Tabelle 5 noch einmal zusammenfassend dargestellt.

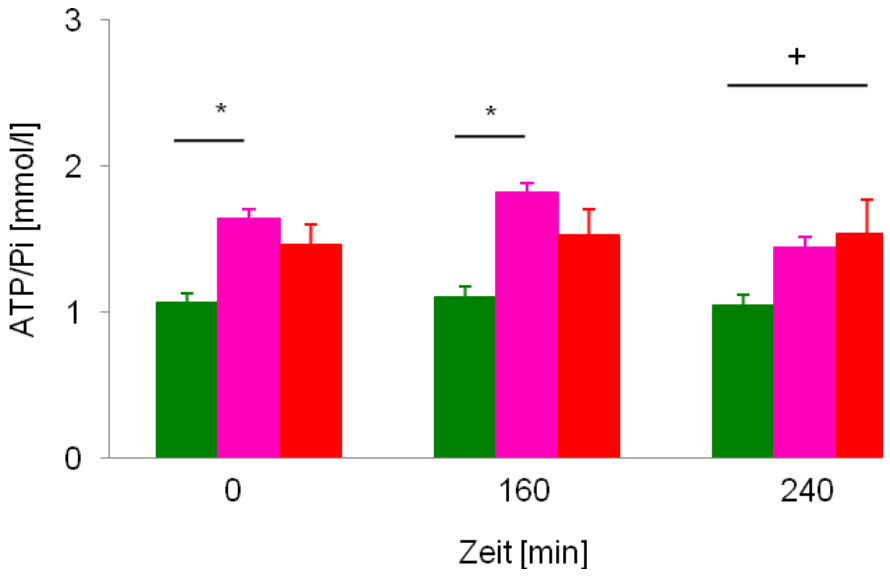

Abb. 19: Mittelwerte des Quotienten aus hepatischem ATP und anorganischem Phosphat

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grüne Balken; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pinkfarbene Balken; n=10) und Patienten mit T2DM (rote Balken; n=10). ATP/Pi: Adenosintriphosphat/anorganisches Phosphat [mmol/l]. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.
ANOVA einmalig verwendet: * CON vs. OBE p<0.05, + CON vs. T2DM p<0.05.

Abb. 20 fasst die maximalen Anstiege des Quotienten aus hepatischem ATP und anorganischem Phosphat (γATP/Pi) infolge des MMT zusammen.

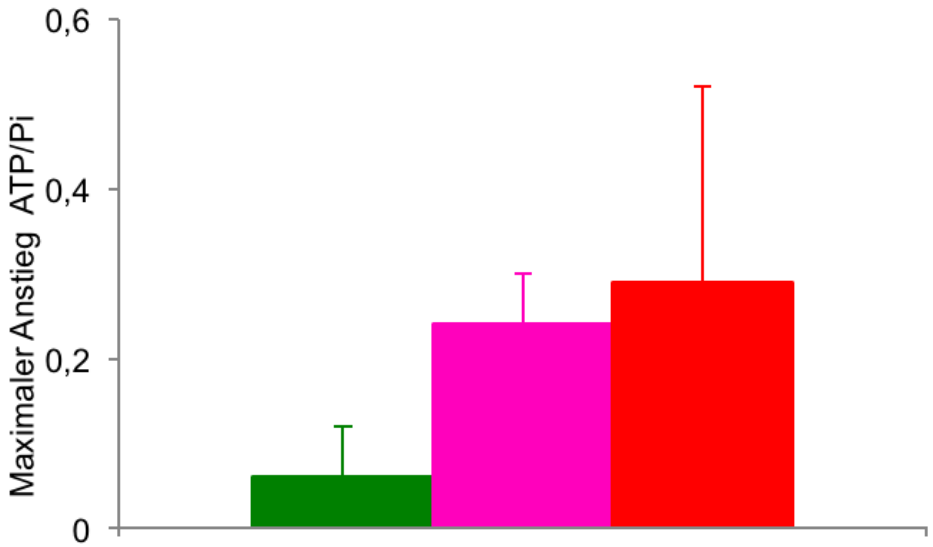

Abb. 20: Maximale Anstiege des Quotienten aus γATP und anorganischem Phosphat
Die maximalen Anstiege des hepatischen Adenosintriphosphats (γATP) infolge des *mixed meal test* wurden in jungen, schlanken, insulinsensitiven Kontrollen (grün; n=10), jungen, adipösen Insulinresistenten (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10) verglichen. ATP/Pi: Adenosintriphosphat/anorganisches Phosphat. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben. ANOVA für wiederholte Messungen.

	CON	**OBE**	**T2DM**
n	10	10	10
γATP [mmol/l]	2.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2
Pi [mmol/l]	2.2 ± 0.2$^{\#*}$	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1
γATP/Pi	1.1 ± 0.1$^{\#}$	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1

Tabelle 5: Basale Phosphormetabolite
CON steht für die jungen, schlanken, insulinsensitiven Kontrollen, OBE sind die insulinresistenten Übergewichtigen und T2DM die Probanden mit Typ 2 Diabetes.

n (Anzahl), γATP: basales hepatisches ATP [mmol/l]; Pi: anorganisches Phosphat [mmol/l]; γATP/Pi. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.
CON vs OBE p<0,05; * CON vs. T2DM p<0.05

Die HCL lagen vor der Zufuhr der standardisierten Mahlzeit bei T2DM bei 10.8% ± 3.2. Damit waren sie im Vergleich zu CON mit 0.6% 17-mal höher (p=0.00008). Die HCL der OBE waren mit 7.6% ± 2.7 12-mal höher (p=0.04). Allerdings konnten wir keine durch den MMT induzierten Veränderungen feststellen (Abb. 21).

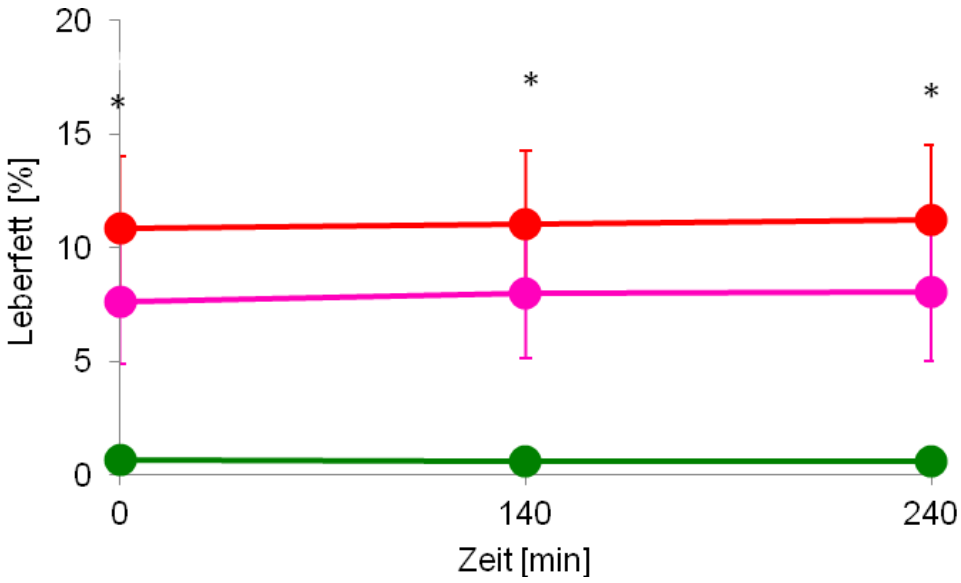

Abb. 21: Leberfett während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grün; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pink; n=10) und Patienten mit T2DM (rot; n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.
* CON vs. T2DM p<0.05

Hepatische Steatose trat bei sieben Patienten mit T2DM und bei vier OBE auf, aber nicht bei CON. Das Lebervolumen war sowohl bei T2DM mit 2023 ± 164 ml als auch bei OBE mit 2299 ± 160 ml höher als bei CON mit 1496 ± 87 ml (p=0.003 und p=0.04) Der maximale postprandiale Anstieg der HCL zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (T2DM: 0.7 ± 0.4%; OBE: 0.9 ± 0.4%; CON: 0.03 ± 0.1%; p=0.16) (Abb. 22).

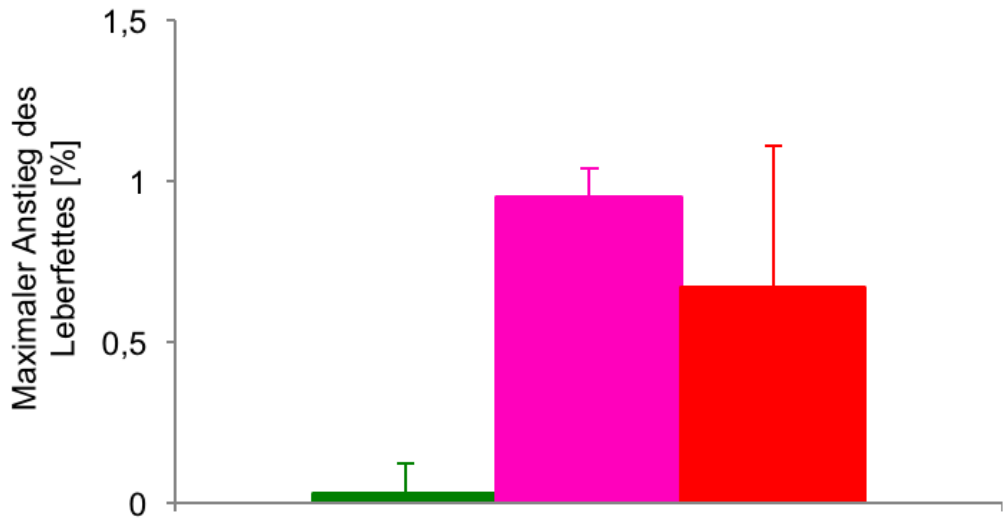

Abb. 22: Maximaler Anstieg des Leberfettes während des *mixed meal test*

Junge, schlanke, insulinsensitive Kontrollen (grüne Balken; n=10); junge, adipöse Insulinresistente (pinkfarbene Balken; n=10) und Patienten mit T2DM (rote Balken; n=10). Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM angegeben.

3.3.2.1 Korrelationen mit ATP

Die Berechnungen der Korrelationen ergaben eine negative Korrelation zwischen dem basalen hepatischen ATP und dem Hüftumfang (p=0.04).

3.3.2.2 Korrelationen mit anorganischem Phosphat (Pi)

Wir konnten einen negativen Zusammenhang zwischen dem basalen Pi und dem BMI (p=0.001), dem Taillenumfang (p=0.008), dem Hüftumfang (p=0.004), den FFS (p=0.005), den TG (p=0.03) sowie den basalen HCL (p=0.03) feststellen. Des Weiteren korrelierte das hepatische Pi positiv mit dem M-Wert (p<0.008).

Die positive Korrelation zwischen dem basalen hepatischen ATP und dem basalen und postprandialen Pi bei Minute 240 blieb auch nach der Anpassung für die Gruppeneffekte bestehen (basales Pi: r=0.62, p<0.001, postprandiales Pi: r=0.41, p=0.03).

Die negativen Korrelationen zwischen dem basalen Pi und dem BMI, dem Taillenumfang und dem HCL sowie der positive Zusammenhang mit dem M-Wert verschwanden nach der Anpassung.

Das postprandiale Pi bei Minute 160 korrelierte auch nach den Anpassungen negativ mit den HCL (r=-0.6, p=0.002) und TG (r=0.4; p=0.048).

3.3.2.3 Korrelationen mit dem Leberfett

Zwischen HCL und dem BMI ($p<0.004$), dem Taillenumfang ($p=0.001$), dem Taillen/Hüft-Verhältnis ($p=0.01$), dem Insulin ($p=0.01$), dem C-Peptid ($p=0.01$) und den TG ($p<0.001$) bestand ein positiver Zusammenhang. Zusätzlich korrelierte HCL negativ mit dem M-Wert ($p<0.001$).

4. Diskussion

Diese Studie ergab, dass junge, adipöse, insulinresistente Glukosetolerante auf die Zufuhr einer standardisierten hochkalorischen Kost mit einem Anstieg der hepatischen Konzentrationen von ATP und Pi reagierten. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt bei den jungen, gesunden, insulinsensitiven Kontrollpersonen und den älteren, adipösen Patienten mit T2DM nicht festgestellt werden.

4.1. Ganzkörperinsulinsensitivität

Die Ganzkörperinsulinsensitivität, gemessen an der Glukoseaufnahme des Gesamtkörpers, war bei OBE 61% und bei T2DM 73% geringer als bei CON. Dies entspricht tendenziell den Ergebnissen früherer Studien. Bei Schmid et al. lag der M-*value* bei T2DM allerdings nur 29% unterhalb der Kontrollen. [25] Somit bestanden in der vorliegenden Studie sowohl bei T2DM als auch bei OBE eine ausgeprägtere Insulinresistenz. Diese ist sehr häufig mit NAFLD oder NASH, sogar unabhängig vom T2DM, assoziiert und kann zumindest bei T2DM mit einer Beeinträchtigung der hepatischen Mitochondrienfunktion einhergehen. [14]

4.2. Nüchternmessungen

Die basalen Plasmaglukosekonzentrationen waren in unserer Studie bei T2DM 45% höher als bei CON und 42% höher als bei OBE. Dies stimmt tendenziell mit Resultaten früherer Studien überein.

Singhal et al. ermittelten eine Differenz von 29% zwischen CON und T2DM. [61]

Bei Schmid et al. hatten T2DM 67% höhere Plasmaglukosekonzentrationen. [25, 74]

Bei Insulinsensitiven hält die Leber die Glukosehomöostase vor allem unter Nüchternbedingungen unter Kontrolle von Insulin und Glukagon stabil. Während Insulin die Glykogensynthese fördert und die Glykogenolyse sowie GNG hemmt, wirkt Glukagon in die entgegengesetzte Richtung. Bei T2DM ist vor allem die Leber für den Anstieg der Nüchternglukosewerte verantwortlich. Diese werden durch eine vermehrte basale EGP [9] infolge einer erhöhten GNG verursacht. [30, 33] Infolgedessen war das basale Plasmainsulin bei OBE drei- und bei T2DM zweimal höher als bei CON. [25, 74]

Erhöhte Glukose- und Insulinspiegel stimulieren wiederum *CHREBP-1* und *SREBP-1*. Diese aktivieren Schlüsselenzyme der Lipogenese in der Leber und führen dort zu einer vermehrten Fettspeicherung. [37] Bei einem gesunden Glukosestoffwechsel wird eine Lipolyse durch Insulin mittels Hemmung der hormonsensitiven Lipase reguliert, allerdings ist dieser Mechanismus bei Insulinresistenz ebenfalls beeinträchtigt. Es folgt eine vermehrte Freisetzung von Glyzerol und FFS aus dem Fettgewebe insulinresistenter Individuen. [38], was sich auch in der Differenz von 30 bzw. 38% zwischen den basalen FFS-Plasmakonzentrationen von CON und OBE bzw. T2DM in unserer Studie zeigt und mit früheren Studien übereinstimmt.

Bei Singhal et al. lagen zwischen CON und T2DM 30%. [74] Eine erhöhte Verfügbarkeit von Lipiden ist typisch für insulinresistente Kollektive, wie Patienten mit T2DM oder Adipositas. Die Erhöhung der Plasma-FFS ist neben den zuvor genannten Ursachen zusätzlich durch eine fettreiche, hochkalorische Diät bei geringer körperlicher Aktivität bedingt. [22]

Überflüssige FFS werden in Form von TG in Leber und Muskel gespeichert. Dies ist mit steigenden HCL und Insulinresistenz der Leber eng assoziiert. [30, 39]

Insgesamt kann gesagt werden, dass ein Überangebot an Lipidmetaboliten in der Leber, hervorgerufen durch fettreiche Ernährung [46] oder Lipidinfusionen [38], eine hepatische Insulinresistenz hervorruft. [75]

4.3. *mixed meal test*

Die Plasmaglukose blieb bei den Patienten mit T2DM infolge des *mixed meal tests* im Vergleich zu den anderen Gruppen nach dem Verzehr der standardisierten Mahlzeit erhöht. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren überein. Bei Singhal et al. stiegen die Glukosekonzentrationen bei T2DM postprandial um 48% und sanken nicht wieder auf ihre Ausgangskonzentrationen. [74] Eine gesteigerte Glykogensynthese führt bei Gesunden nach Nahrungsaufnahme zu einer schnellen Normalisierung der BG-Werte, dies ist bei T2DM beeinträchtigt. [9, 30, 31]

GNG-Raten können allerdings auch bei adipösen Nichtdiabetikern erhöht sein, was eine Folge gesteigerter FFS- und Glyzerolplasmakonzentrationen sein könnte. Die fehlende Normalisierung bei T2DM ist auf die Insulinresistenz von Leber und Skelettmuskel sowie der damit verbundenen eingeschränkten Hemmung der EGP und der verminderten Kompensation durch die Beta-Zellfunktion zurückzuführen. Zusätzlich tragen die verminderte Glykogensynthesekapazität und die gestörte Glukoseaufnahme zur postprandialen Hyperglykämie bei. [9, 30]

OBE hatten zudem postprandial im Vergleich zu CON 2.6-fach bzw. im Vergleich zu T2DM 1.4-fach erhöhte Plasmainsulinkonzentrationen, die auf eine ausgeprägte Adaptation der Beta-Zellfunktion an die Insulinresistenz hinweisen.

Eine frühere Studie präsentierte prostprandiale Anstiege der Insulinkonzentrationen um 85% bei T2DM und um 92% bei der Kontrollgruppe. [74] In der postprandialen Phase stimuliert der steigende BG-Spiegel die Insulinsekretion. Insulin hemmt wiederum die GNG und die Glykogenolyse, was postprandial eine verminderte EGP bewirkt. Patienten mit T2DM hatten unter Insulinsuppression eine 57% höhere EGP als CON. In der Studie von Szendroedi et al. lag iEGP bei T2DM bei 0.23 $mg.kg^{-1}.min^{-1}$ und bei der Kontrollgruppe bei 0.22 $mg.kg^{-1}.min^{-1}$. [76] Dies weist auf eine ausgeprägtere hepatische Insulinresistenz bei T2DM in den vorliegenden Versuchen hin. [28, 29, 76] Die iEGP war hingegen bei OBE nicht erhöht.

Adipöse Insulinresistente haben aufgrund der noch intakten Beta-Zellfunktion sehr häufig eine kompensierende Hypersekretion von Insulin. Dadurch bleibt die EGP durch eine intakte Hemmung der Glykogenolyse infolge der Hyperinsulinämie bei Insulinresistenz häufig noch normal. [32]

Bei der dEGP lagen zwischen OBE und CON 32.8%. Beim Vergleich zwischen CON und T2DM wurde eine Differenz von 51% deutlich.

Nach Zufuhr der standardisierten Mahlzeit sanken die FFS aller drei Teilnehmergruppen ab. Allerdings sanken die Werte der CON am schnellsten. Frühere Studien zeigten zudem, dass der Rückgang der FFS der CON am längsten anhält. [74] Die Patienten mit T2DM erreichten erst nach 180 Minuten ihren Minimalspiegel. In der Studie von Iozzo et al. hatten die adipösen Glukosetoleranten eine 100% höhere hepatische FS-Oxidation als die Schlanken. [77] Eine Studie zeigt gleiche Raten der hepatischen Lipidoxidation zwischen Übergewichtigen mit Steatose und gesunden Menschen unter basalen und insulinstimulierten Bedingungen. [78, 79]

Nach der Zufuhr des MMT kam es bei T2DM zum stärksten Anstieg der TG-Plasmakonzentrationen. Eine ähnliche Tendenz konnte auch bei OBE beobachtet werden.

Infolge einer beeinflussten postprandialen Energiespeicherung kommt es bei Insulinresistenz sowohl zu einer gesteigerten hepatischen de novo Lipogenese, als auch zu einer vermehrten hepatischen TG-Synthese. Folglich führt dies zu Hypertriglyzeridämie, reduzierten Plasma-HDL-Konzentrationen und NAFLD. [5]

4.4. HCL

Die HCL waren vor der Zufuhr der standardisierten Mahlzeit bei T2DM im Vergleich zu CON 17-mal höher. Das Leberfett der OBE war 12-mal höher. Allerdings konnten wir keine durch den MMT induzierten Veränderungen feststellen. In ähnlichen Studien wurden infolge eines MMT durch ^{1}H-MRS ebenfalls weder in insulinsensitiven Kontrollen und insulinresistenten Adipösen, noch in Patienten mit T2DM Veränderungen im Lipidgehalt gemessen. [80]

Im Gegensatz dazu gab es in anderen Studien bei der Veränderung der HCL Variationen zwischen 0.2 und 0.4% in jungen Insulinsensitiven und jungen Insulinresistenten als Reaktion auf zwei hochkalorische MMT. [40]

Eine kürzlich durchgeführte Studie an adipösen Probanden mit Steatose zeigte, dass Adipöse mit einem durch ^{1}H-MRS gemessenen Leberfett über 6%, eine doppelt so hohe hepatische oxidative Kapazität besitzen wie diejenigen mit einem Fettgehalt unter 6%, was mit einer höheren hepatischen Insulinresistenz zusammenhängt. [79] Das heißt, Menschen mit Steatose haben einen 100% höheren Citratzyklus, 50% höhere Auffüllreaktionen und 25% höhere GNG-Raten als die ohne Steatose. Dies wurde als eine Anpassung der Lebermitochondrien an den chronischen Fettüberhang und den gesteigerten Energiebedarf der Fettleber interpretiert. [79]

Allerdings gab es auch Messungen, die einen Zusammenhang zwischen Leberfettgehalt und sowohl oxidativem als auch nicht oxidativem Mitochondrienstoffwechsel präsentierten.[79]

Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte in einem Anschlusspaper in Versuchen mit Ratten, dass der gesteigerte oxidative Stoffwechsel und die anaplerotischen Reaktionen bei Adipositas und NAFLD mit erhöhtem oxidativen Stress und Inflammation einhergehen. [81]

4.5. Hepatische Mitochondrienfunktion

Bei Insulinresistenten, wie Patienten mit T2DM oder NAFLD sind die Daten zur hepatischen Mitochondrienfunktion knapp und widersprüchlich. [42] Die meisten Studien fanden Unterschiede in der hepatischen Mitochondrienfunktion zwischen Adipösen und Kontrollen. Die Daten zeigen entweder eine verminderte [23, 24, 82] oder eine verstärkte hepatische Mitochondrienfunktion. [44, 77, 79] Allerdings berichtete eine Studie auch von ähnlichen Raten der hepatischen Lipidoxidation zwischen Über- und Normalgewichtigen sowohl unter basalen als auch insulinstimulierten Bedingungen. [83]

Der mitochondriale Gehalt in der Leber (bestimmt durch Citratsyntheseaktivität) war zwischen Patienten mit Steatose und den Kontrollen tendenziell nicht höher. [24] Patienten mit NASH und NAFLD weisen allerdings eine verminderte Aktivität der Enzymkomplexe der Atmungskette auf. [24] Die abnorme Mitochondrienfunktion kann zu Entzündungen und Zelltod [84-87] sowie zu einer Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen, wie Adipositas, T2DM und NASH führen. [14, 43, 44, 88-90] Veränderungen in den mitochondrialen Kompartimenten, die durch Zuführen einer fettreichen Diät entstanden sind, induzieren die Entwicklung von Insulinresistenz und ektoper Fettspeicherung in der Leber. [91]

Frühere Daten zeigen, dass adipöse insulinresistente Menschen auf eine chronische Fettzufuhr mittels Anpassung der mitochondrialen Funktion und Steigerung der oxidativen Kapazität reagieren, wohingegen die Patienten mit T2DM diese Fähigkeit zunehmend verlieren, was zu einer Produktion von ROS und einer gestörten mitochondrialen Funktion führt. [42] Eine beeinträchtigte hepatische Mitochondrienfunktion ist eine Schlüsselrolle in der Progression einer einfachen Steatose zu NASH und Zirrhose. [92]

Des Weiteren ist das Genexpressionsprofil in der Leber von Patienten mit T2DM zu dem der normalen Leber verschieden und die Gene des oxidativen Phosphorylierungsweges (OXPHOS-Weges) und der GNG in der diabetischen Leber hochreguliert. [93] Fettleibigkeit führt zu einer weiteren Steigerung der Genexpression des hochregulierten OXPHOS-Weges bei T2DM mit Insulinresistenz. [94] Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass diese chronischen Veränderungen zu dem beobachteten postprandialen Anstieg des hepatischen ATP führen.

Es gab keinen ähnlichen Effekt bei nicht-diabetischen Patienten, was darauf hindeutet, dass die mitochondriale Dysfunktion eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des T2DM spielt. [51, 94]

Ergebnisse von Tierstudien unterstützen das Konzept der gesteigerten Mitochondrienfunktion bei Adipositas und Steatose durch den gesteigerten Citratzyklus und die vermehrte ß-Oxidation in Modellen der, durch Diät induzierten, hepatischen Insulinresistenz und Steatose, die weiterhin mit gesteigertem hepatischen oxidativen Stress assoziiert sind. [95, 96] Dies lässt annehmen, dass der Mitochondrienstoffwechsel bei Steatose als Anpassungsmechanismus infolge eines chronischen Fettüberhangs gesteigert werden kann.

4.6. Reaktive Sauerstoffspezies

Die unter Nüchternbedingungen im Plasma gemessenen TBARS waren bei allen drei Teilnehmergruppen vergleichbar. 180 Minuten nach der Zufuhr des MMT stiegen die TBARS-Spiegel im Plasma bei T2DM an. Der höchste Maximalanstieg wurde bei T2DM gemessen.

In einer früheren Studie reagierten die Patienten mit T2DM auf einen MMT mit einem höheren Anstieg der Marker der Leberschädigung und des oxidativen Stresses im Vergleich zu, vom Alter und BMI passenden, insulinsensitiven CON. [80] ROS sind als Mediatoren in vielen normalen zellulären Prozessen unverzichtbar. Oxidativer Stress wird durch vermehrte ß-Oxidation und einen hochregulierten Citratzyklus bei Adipositas und hepatischer Insulinresistenz als Zeichen einer gesteigerten hepatischen Mitochondrienaktivität hervorgerufen. [81, 95, 96]

Adipöse glukosetolerante Probanden verfügen im Vergleich zu schlanken Kontrollen über eine 100% höhere Oxidationsrate von hepatischen Fettsäuren. [77] Allerdings können eine exzessive ROS-Produktion und/oder ein inadäquater antioxidativer Schutz eine Lipidperoxidation auslösen und eine oxidative DNA-Zerstörung verursachen. [60, 61]

4.7. ATP und Pi in der Leber

Daten aus humanen Studien zum Energiestoffwechsel sind rar und nicht eindeutig. Sie zeigen bei Insulinresistenz im Vergleich zur Kontrollgruppe zum einen verminderte und zum anderen erhöhte bzw. unveränderte hepatische Mitochondrienfunktionen. [42, 82] Sie zeigten einerseits verminderte [82], andererseits erhöhte [79] hepatische Energiestoffwechsel bei insulinresistenten Menschen. In der vorliegenden Studie war das basale ATP zwischen den einzelnen Gruppen völlig vergleichbar, was zu den vorausgegangenen Studien konträr ist. [82]

Interessanterweise fand die aktuelle Studie auch keine Unterschiede zwischen jungen insulinresistenten Adipösen und Schlanken, wohingegen Nair et al. einen reduzierten hepatischen ATP-Gehalt bei übergewichtigen und adipösen Personen nachwiesen. [82]

Szendrödi et al. und Schmid et al. zeigten, dass Patienten mit T2DM im Vergleich zu den Glukosetoleranten im vergleichbaren Alter und BMI ein 23-26% geringeres hepatisches γ-ATP haben, [23, 25] genauso wie junge Schlanke. [23, 25] Die Reduktion der hepatischen ATP-Spiegel [23] oder des Syntheseflusses [25] wurde nur bei Alters- und BMI-*gematchten* Patienten mit T2DM und CON beschrieben. Während einige Determinanten des hepatischen Energiestoffwechsels, wie Alter, langfristige glykämische oder lipidämische Einstellung oder HCL, bei der aktuellen sowie bei vorherigen Studien bei T2DM vergleichbar waren, war die Nüchternglukose bei T2DM in früheren Studien höher. [14]

Die Glukosetoxizität scheint demzufolge für den geringeren hepatischen ATP-Synthesefluss bei diesen Patienten zu sorgen. Weiterhin scheint die eher kurzzeitige Bekanntheit des T2DM in der aktuellen Studie (5.7Jahre) auf die kürzere Exposition zur Hyperglykämie zu verweisen und damit die Abwesenheit von geringerem Nüchtern-ATP zu erklären.

Der Vergleich der Pi-Spiegel erbringt in der vorliegenden Studie keine wesentlichen Differenzen zwischen den einzelnen Teilnehmergruppen bzw. prä- und postprandial.

Vergleicht man allerdings die Mittelwerte der einzelnen Teilnehmergruppen, so entsprechen diese tendenziell den Ergebnissen der vorangegangenen Studien.

OBE hatten im Vergleich zu CON ein 19% geringeres γ-ATP und ein 41% geringeres Pi, was auf eine verminderte Mitochondrienfunktion hindeutet. Die Patienten mit T2DM lagen 14% bzw. 33% unterhalb der CON.

Diese Resultate stimmen mit früheren Studien überein, in denen insulinresistente Kohorten eine Reduktion von 20-30% [23, 25] oder von 30-50% bei alkohol- oder Hepatitis C-verwandten Leberkrankheiten zeigten. [97, 98] Diese Ergebnisse entsprechen auch früheren in vitro Beobachtungen. [98] Der Rückgang des yATP bei viraler und alkoholischer Hepatitis [97, 99] sowie bei Adipositas [82] wurde allgemein als "Energiedefizit" oder beeinträchtigte "ATP-Homöostase" interpretiert.

Das reduzierte yATP könnte durch eine hepatozelluläre Erschöpfung, aufgrund einer Limitation der hepatozellulären Phosphatausbreitung oder einer erhöhten ATP-Nutzung, durch energieaufwändige Verfahren, wie die Na^+/K^+-Adenosin-Triphosphatasen, die Lipogenese oder die GNG, verursacht werden.

Infolge des MMT stiegen die ATP-Pegel bei OBE um 27%, wohingegen bei T2DM ein Anstieg um 21% zu verzeichnen war. Beim Pi stiegen die Blutkonzentrationen der OBE um 24% und bei den Patienten mit T2DM um 12%.

Diese Ergebnisse entsprechen denen von Szendroedi et al. und Schmid et al.. In ihren Studien lagen die hepatischen Pi-Konzentrationen bei T2DM 28-31% unterhalb der anderen Teilnehmergruppen. [23, 25]

Die Anpassung der Mitochondrien ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen dem Energiebedarf und dem Nahrungsangebot, wobei Veränderungen im Aufbau der Mitochondrien als Anpassung an den metabolischen Bedarf gesehen werden. [100]

Die höheren Insulin- und Lipidspiegel bewirken wiederum eine Stimulation der Lipogenese, die zum Energieverbrauch führt. Dies scheint zu einer Aufregulierung der mitochondrialen Funktion bei Adipösen zu führen, wohingegen die intakte Energiehomöostase bei Schlanken nicht zu Nettoveränderungen der Phosphormetabolite führt, wodurch die schlanken CON weder Veränderungen im ATP noch im Pi zeigen.

Insgesamt liegen die, in dieser Studie gemessenen, absoluten Konzentrationen entsprechend vorheriger Studien in dem Intervall zwischen 1.4 und 2.8 mmol/l für das Pi sowie zwischen 1.6 und 3.8 mmol/l für das hepatische ATP. [23]

Die großen interindividuellen Schwankungen zwischen verschiedenen Studien können durch einen unterschiedlichen Ernährungsstatus sowie Differenzen im Alter und BMI erklärt werden. Um dieses Risiko bestmöglich zu minimieren, haben wir die Kontrollen dem Alter und BMI entsprechend ausgewählt.

Die Ergebnisse implizieren, dass v.a. der Energiestoffwechsel der Adipösen auf die hochkalorische Kost reagiert.

Vorübergehende postprandiale Anstiege von Insulin- und FFS-Transport in die Leber infolge einer beeinträchtigten Unterdrückung der Lipolyse scheinen zusammen die postprandiale hepatische ATP-Synthese bei adipösen, hyperinsulinämischen Menschen zu fördern. Im Gegensatz dazu zeigten frühere Studien, dass Adipöse nach Fruktosegabe eine verminderte [45] oder normale [82] hepatische ATP-Sättigung erreichen können. Zu beachten ist, dass ältere, adipöse Menschen mit T2DM, trotz eines ähnlichen Grades an Insulinresistenz und Suppression der Lipolyse wie die jungen Adipösen, keine Veränderungen der postprandialen hepatischen ATP-Spiegel zeigten.

Unsere Studie belegt somit, dass adipöse, stark insulinresistente Patienten mit einer gestörten Suppression der Lipolyse dazu fähig sind, ihre ATP-Produktion als Reaktion auf eine hochfettige Mahlzeit zu steigern. Sie scheinen sich in einer Phase der Anpassung an die erhöhte Lipidverfügbarkeit zu befinden.

Langanhaltende Hyperglykämie und Hyperinsulinämie sowie gesteigerte hepatische Lipidverfügbarkeit unter den Bedingungen einer chronischen Insulinresistenz könnten die hepatische mitochondriale Flexibilität infolge von Mechanismen, die mit Glukolipotoxizität und oxidativem Stress verbunden sind, verschlechtern [101, 102], was in unserer Studie mit einem Anstieg der indirekten Messungen der ROS, bestimmt durch TBARS, assoziiert sein könnte. [42]

Allerdings ist es nicht auszuschließen, dass die mitochondriale ATP-Synthese durch eine beeinträchtigte Glykolyse, Fettoxidation oder O2-Verbrauch verringert ist. [23] Der reduzierte Energiestoffwechsel könnte durch den Verlust der funktionellen Hepatozyten, die Reduktion der mitochondrialen Inhalte und/oder der sportlichen Aktivität begründet sein. [96] Nichtsdestotrotz wurden die Verringerungen der absoluten Pi und yATP-Konzentrationen v.a. bei T2DM und nicht in alters- und geschlechtsentsprechenden schlanken CON gemessen.

Die Berechnungen der Korrelationen ergaben beim basalen Pi einen positiven Zusammenhang zur Ganzkörperinsulinsensitivität, der allerdings nach der Anpassung für die Gruppeneffekte verschwand.

Es gab keine Korrelation zwischen dem basalen hepatischen ATP und der Ganzkörperinsulinsensitivität. Vorangegangene Studien zeigten, abhängig vom Fettgehalt der Leber [23], Zusammenhänge mit der hepatischen, aber nicht mit der peripheren Insulinsensitivität. [23, 72] Andere wiederrum wiesen positive Zusammenhänge sowohl mit der peripheren als auch mit der hepatischen Insulinsensitivität nach. [25, 42, 76]

So bestand bei Schmid et al. eine 42%ige Reduktion des hepatischen ATP-Syntheseflusses, die positiv mit der peripheren und der hepatischen Insulinsensitivität und negativ mit dem Taillenumfang und dem BMI korrelierte. [25]
Unter ähnlichen Studienbedingungen korrelierte das myozelluläre fATP negativ mit der peripheren Insulinempfindlichkeit, die vor allem durch die Skelettmuskulatur bestimmt wird, aber nicht mit der hepatischen Insulinsensitivität assoziiert ist. [103] Dies deutet daraufhin, dass das hepatische fATP ein besserer Indikator für die Gesamtinsulinresistenz ist als das myozelluläre fATP. Im Skelettmuskel wurden Störungen der fATP-Synthese nicht nur bei manifestem T2DM [103, 104], sondern auch in ihren nicht-diabetischen Verwandten ersten Grades mit erhöhtem Risiko für T2DM gefunden. [51]
Unsere Erkenntnisse, dass keine Assoziation mit dem HCL besteht, stimmen mit früheren überein. [23, 42, 72]
Die fehlende Korrelation von fATP und den TG oder FFS im Plasma legt nahe, dass eine erhöhte Lipidverfügbarkeit den Mangel an hepatischem fATP nicht erklären kann. [25, 76]
In früheren Studien wurden Faktoren, wie der Harnstoffspiegel im Serum, die den diätischen Fruktosekonsum [105] widerspiegeln sowie die basalen FFS nicht untersucht.
Die höheren FFS bei den älteren T2DM-Patienten scheinen zu einer Steigerung der hepatischen mitochondrialen β-Oxidation, der ATP-Synthese sowie der ATP-Spiegel unter Nüchternbedingungen und damit zu einer Maskierung jeglicher Verminderung der ATP-Synthese zu führen. Schmid et al. wiesen eine negative Korrelation zwischen hepatischem ATP-Synthesefluss und Nüchternglukose bzw. HbA1c bei gut eingestelltem T2DM nach, was einen gestörten hepatischen Energiemetabolismus durch eine schlechte metabolische Kontrolle bei T2DM wiederspiegelt. [25] Patienten mit einem metabolisch gut kontrollierten T2DM zeigten eine eingeschränkte hepatische ATP-Konzentration, die mit der hepatischen Insulinresistenz, unabhängig vom Leberlipidgehalt, zusammenhängt. [23] Diese Daten legen nahe, dass eine fortgeschrittene Einschränkung des Leberenergiestoffwechsels und der Insulinresistenz der Leber die Entwicklung der NASH bei T2DM stimuliert.
Weiterhin korrelierte das γATP negativ mit dem Hüftumfang.
Es hat sich gezeigt, dass ein hoher Fruktosekonsum (>15g pro Tag) zu stark dezimierten ATP-Speichern und eine intravenöse Fruktosegabe zu einer beeinträchtigten ATP-Regeneration bei adipösen Patienten mit T2DM führen. [48, 96] Dies weist darauf hin, dass eine hohe Fruktosezufuhr zu einer weiteren Progression einer veränderten hepatischen Energiehomöostase bei T2DM führt.

Dies wiederum kann eine Entwicklung oder Progression einer NAFLD nach sich ziehen. [106, 107] Bei Nair et al. gab es hingegen bei der hepatischen ATP-Regeneration nach intravenöser Fruktosegabe keine Unterschiede zwischen Adipösen und Schlanken. [82]

Wir konnten einen negativen Zusammenhang zwischen dem basalen Pi und dem BMI [82], dem Taillenumfang [25], dem Hüftumfang, den FFS, den TG sowie den basalen HCL feststellen. Die negative Korrelation mit dem HCL legt nahe, dass ein höherer postprandialer hepatischer Mitochondrienstoffwechsel vor einer Verschlimmerung einer Steatose schützt bzw. dass Lipidmetabolite die mitochondriale Anpassung an den postprandialen Substratfluss zur Leber reduzieren. Nichtsdestotrotz kann eine Hyperinsulinämie den Anstieg des postprandialen Pi erklären, da gezeigt wurde, dass Insulin in kultivierten Hepatozyten zu hepatischer Pi-Aufnahme führt. [108]

Die negative Korrelation zwischen dem basalen Pi und dem BMI, dem Taillenumfang und dem HCL verschwand allerdings nach der Anpassung.

Die positive Korrelation zwischen dem basalen hepatischen ATP und dem basalen und postprandialen Pi bei Minute 240 blieb auch nach der Anpassung für die Gruppeneffekte bestehen. Das postprandiale Pi bei Minute 160 korrelierte auch nach den Anpassungen negativ mit den HCL und TG.

Weiterhin gab es in früheren Studien eine negative Korrelation zwischen der hepatischen ATP-Synthese und den Parametern, die die kurz- und langfristige Blutglukosekontrollen überwachen, wie Nüchternglukose und das HbA1c [42], was darauf hinweist, dass ein gestörter hepatischer Energiemetabolismus eine schlechte metabolische Kontrolle bei T2DM widerspiegelt [25, 42] und dass sogar eine geringfügige Hyperglykämie über längere Zeit eine gestörte Mitochondrienfunktion bewirken könnte. [25] Unter Miteinbeziehung der altersabhängigen Abnahme der Ganzkörperinsulinsensitivität in den Gruppen legen diese Daten einen diabetesassoziierten oder sogar diabetesspezifischen Effekt nahe, der die Reduktion der Pi und yATP verursacht. [23]

4.8. Limitationen der Studienergebnisse

Da die bisherigen Ergebnisse aus menschlichen Studien sehr begrenzt sind, sind zusätzliche Studien, wie unsere nötig, die in vivo und ex vivo *state-of-the-art*-Methoden vereinen, um den Energiestoffwechsel der Leber in gut phänotypisierten gesunden und insulinresistenten Kohorten zu untersuchen.

Die akuten in vivo Auswirkungen einer standardisierten Mahlzeit auf die ATP-Homöostase bei Menschen mit unterschiedlichen Graden der Insulinsensitivität und der hepatischen Steatose wurden, wie oben beschrieben, durch $^{1}H/^{31}P$-MRS bestimmt.

Das nukleäre MRS ist eine nicht invasive und nicht radioaktive Methode, die eine Untersuchung von genau festgelegten Bereichen und die direkte und quantitative in vivo Messung biochemischer Flussraten und intrazellulärer Metabolite ermöglicht. [69]
Keinerlei frühere Studien zeigten ATP- oder Pi-Verläufe unter vergleichbaren physiologischen Bedingungen infolge einer Zufuhr eines *mixed meal test*. Die wenigen vorherigen dynamischen Studien am humanen hepatischen Energiestoffwechsel untersuchten den ATP-Stoffwechsel mit der ^{31}P-MRS während einer intravenösen Fruktosezufuhr. [45, 82, 105] Die Verwendung dieser Methode zeigte keine veränderte ATP-Neubildung infolge des fruktoseinduzierten ATP-Verbrauchs bei Adipösen [82] und führte zu reduzierten Werten bei Patienten mit fortgeschrittener NAFLD. [45]
Einige Grenzen der Studie müssen allerdings genannt werden: Wir untersuchten pro Teilnehmergruppe nur 10 Probanden, die alle kaukasischen Ursprungs waren. Obwohl die jungen Insulinresistenten und die Patienten mit T2DM aufmerksam ausgewählt wurden, waren die Patienten mit T2DM im Durchschnitt 61 Jahre alt, wohingegen CON 28 und OBE 31 Jahre alt waren. Das Alter könnte bei T2DM zu einem geringeren fATP-Gehalt führen. Allerdings war das basale ATP zwischen den Teilnehmergruppen vergleichbar und lag in dem Intervall zwischen 1.6 und 3.8 mmol/l, der auch in anderen Studien vorkam. [23] Weiterhin hatten die Patienten mit T2DM einen minimal geringeren BMI. Der Fettanteil, bestimmt durch BIA als präzisere Messung des Ganzkörperfettes, war jedoch zwischen den Gruppen vergleichbar.
Eine weitere mögliche Limitation besteht in den unterschiedlichen postprandialen Glukose- und Hormonspiegeln sowie Lipidprofilen der Vergleichsgruppen durch abweichende Insulinsekretion und/oder muskuläre Insulinsensitivität. Während dies einerseits die metabolische Vielfältigkeit der Gruppen widerspiegelt, scheinen Veränderungen des Substratangebots andererseits die Glukose- und Lipidoxidation zu beeinflussen, was den mitochondrialen Tricarbonzyklus und OXPHOS für die ATP-Synthese fördern kann. [109]
Trotz höherer Glukose- und Lipidverfügbarkeit bei T2DM im Vergleich zu OBE steigen die hepatischen ATP- und Pi-Spiegel lediglich bei OBE moderat an. Dies zeigt, dass ein veränderter Substratfluss den postprandialen hepatischen Energiemetabolismus kritisch beeinflusst.
Die beobachteten Veränderungen bei OBE sind eher unter- als überschätzt.

Schlussendlich könnten Veränderungen im portalen Blutfluss zu postprandialen Veränderungen geführt haben, was allerdings eher unwahrscheinlich ist, da der portale Blutfluss bei Minute 30-45 gipfelte und innerhalb von 120 Minuten nach der Mahlzeitzufuhr auf das Niveau präprandialer Blutspiegel zurückfällt. [110] Wir rekrutierten gesunde Probanden für diese Studie, die allerdings nicht durch Leberbiopsien auf Leberkrankheiten untersucht wurden.
Wegen der geringen Sensitivität der Leberenzyme konnten diese nicht ausgeschlossen werden. Demzufolge ist es möglich, dass die vorliegenden Ergebnisse nicht die hepatische ATP-Homöostase bei Adipösen mit Steatose oder NASH widerspiegeln.
Weitere klinische Studien mit größeren Teilnehmergruppen und einer Kombination von in vivo und ex vivo Methoden sind notwendig, um den Energiestoffwechsel der Leber zu untersuchen und neue Marker für die Verschlechterung des Leberenergiestoffwechsels und Prädiktoren der Progression der NAFLD bei Adipositas und T2DM zu identifizieren. Es wäre möglich, adipöse Probanden mit dokumentierter Steatose zu untersuchen, um zu entscheiden, ob eine adipositasassoziierte Fettleber den hepatischen Energiestoffwechsel beeinflusst. Weiterhin wäre es wegen der induzierten Hyperinsulinämie unter Nomoglykämie interessant, das heaptische ATP und die Lipogenese während einer Clampuntersuchung zu messen. Dadurch könnte man auch die kurzfristigen Auswirkungen evaluieren.

4.9. Schlussfolgerung

Zusammenfassend reagieren adipöse insulinresistente Personen auf einen MMT durch Anpassung der mitochondrialen Funktion und Steigerung der oxidativen Kapazität mit höheren hepatischen ATP-Konzentrationen, was auf einen postprandial erhöhten hepatischen Energiestoffwechsel schließen lässt, der bei T2DM nicht besteht. Bei Letzteren wird eine oxidative Stressreaktion verursacht. Dies zeigt, dass eine adipositasassoziierte Anpassung der hepatischen Mitochondrienfunktion im manifesten T2DM verloren geht. Diese Erkenntnisse unterstützen die Annahme einer unterschiedlichen und gewebespezifischen Regulation des Energiestoffwechsels bei den jeweiligen Insulinresistenzstadien.
Insgesamt hat sowohl die Studie als auch das Literaturstudium gezeigt, dass die Insulinresistenz des weißen Fettgewebes zu hohen Lipolyseraten führt und eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des T2DM spielt.
Die Steuerung der Verfügbarkeit von Plasma-FFS könnte eine Behandlungsstrategie sein, um die NAFLD zu therapieren und damit eine Möglichkeit der Behandlung mit einer verbesserten Prognose des T2DM zu erreichen.

Durch erhöhte Glukose- und Insulinspiegel kommt es durch die Hochregulation der Lipogenesegene zu einer Stimulation der hepatischen de novo Lipogenese. [37] Die beeinträchtigte insulinvermittelte Hemmung der hormonsensitiven Lipase steigert die Abgabe von zirkulierendem Glyzerol und FFS im Fettgewebe insulinresistenter Individuen. [38]

Würde man das Überangebot an Lipiden in der Leber durch verminderte Substratzufuhr, eine Lipasesteigerung, ein vermehrtes Abfangen oder eine forcierte Ausscheidung der überschüssigen Lipide minimieren, könnte man eventuell einer Anpassung der Lebermitochondrien an das chronische Fettüberangebot und den gesteigerten Energiebedarf der Fettleber und damit einer Dekompensation der Mitochondrien mit anschließender hepatischer Insulinresistenz und einer mitochondrialen Oxidation mit nachfolgenden Schäden an Mitochondrien entgegenwirken.

Referenzen

1. WHO. *Obesity and overweight*. Retrieved April 8th, 2009.
2. WHO, *World Health Report. Available at: http://www.iotf.org. .* 2002.
3. Reaven, G.M., et al., *Lowering of plasma glucose in diabetic rats by antilipolytic agents.* Am J Physiol, 1988. **254**(1 Pt 1): p. E23-30.
4. Grundy, S.M., et al., *Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. e13-8.
5. Rabol, R., et al., *Reversal of muscle insulin resistance with exercise reduces postprandial hepatic de novo lipogenesis in insulin resistant individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(33): p. 13705-9.
6. Perry, R.J., et al., *Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome.* Nature, 2016. **534**(7606): p. 213-7.
7. Anderwald, C., et al., *Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle.* Diabetes, 2002. **51**(10): p. 3025-32.
8. Pagano, G., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association.* Hepatology, 2002. **35**(2): p. 367-72.
9. Krssak, M., et al., *Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes.* Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3048-56.
10. Browning, J.D., et al., *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity.* Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1387-95.
11. P., A., *Nonalcoholic fatty liver disease.* N Engl J Med, 2002. **346**: p. 1221-1231.
12. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study.* Hepatology, 2005. **42**(1): p. 44-52.
13. Neuschwander-Tetri, B.A., et al., *Improved nonalcoholic steatohepatitis after 48 weeks of treatment with the PPAR-gamma ligand rosiglitazone.* Hepatology, 2003. **38**(4): p. 1008-17.
14. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities.* Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
15. Thamer, C., et al., *Elevated serum GGT concentrations predict reduced insulin sensitivity and increased intrahepatic lipids.* Horm Metab Res, 2005. **37**(4): p. 246-51.
16. Vozarova, B., et al., *High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes.* Diabetes, 2002. **51**(6): p. 1889-95.
17. Loria, P., A. Lonardo, and G. Targher, *Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis.* Clin Sci (Lond), 2008. **115**(1): p. 1-12.
18. Petersen, K.F., et al., *Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes.* Diabetes, 2005. **54**(3): p. 603-8.
19. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease.* Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
20. Bacon, B.R., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity.* Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1103-9.
21. Clark, J.M., F.L. Brancati, and A.M. Diehl, *Nonalcoholic fatty liver disease.* Gastroenterology, 2002. **122**(6): p. 1649-57.
22. Samuel, V.T., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism.* Lancet, 2010. **375**(9733): p. 2267-77.
23. Szendroedi, J., et al., *Abnormal hepatic energy homeostasis in type 2 diabetes.* Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1079-86.
24. Perez-Carreras, M., et al., *Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology, 2003. **38**(4): p. 999-1007.

25. Schmid, A.I., et al., *Liver ATP synthesis is lower and relates to insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care, 2011. **34**(2): p. 448-53.
26. Robertson, G., I. Leclercq, and G.C. Farrell, *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(5): p. G1135-9.
27. DeFronzo, R.A. and E. Ferrannini, *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease.* Diabetes Care, 1991. **14**(3): p. 173-94.
28. Rothman, D.L., et al., *Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with 13C NMR.* Science, 1991. **254**(5031): p. 573-6.
29. Staehr, P., et al., *Hepatic autoregulation: response of glucose production and gluconeogenesis to increased glycogenolysis.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(5): p. E1265-9.
30. Roden, M. and E. Bernroider, *Hepatic glucose metabolism in humans--its role in health and disease.* Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2003. **17**(3): p. 365-83.
31. Taylor, R., et al., *Direct assessment of liver glycogen storage by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects.* J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 126-32.
32. Anderwald, C., et al., *Mechanism and effects of glucose absorption during an oral glucose tolerance test among females and males.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(2): p. 515-24.
33. Hundal, R.S., et al., *Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes.* Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2063-9.
34. Roden, M., et al., *The roles of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glycogen synthesis and turnover in humans.* J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 642-8.
35. Roden, M., et al., *Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans.* Diabetes, 2000. **49**(5): p. 701-7.
36. Roden, M., *Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes--pathogenesis and clinical relevance.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(6): p. 335-48.
37. Kersten, S., B. Desvergne, and W. Wahli, *Roles of PPARs in health and disease.* Nature, 2000. **405**(6785): p. 421-4.
38. Lam, T.K., G. van de Werve, and A. Giacca, *Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(2): p. E281-90.
39. Roden, M., et al., *Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.* J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2859-65.
40. Petersen, K.F., et al., *The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12587-94.
41. Petersen, B.L., et al., *A whey protein supplement decreases post-prandial glycemia.* Nutr J, 2009. **8**: p. 47.
42. Koliaki, C. and M. Roden, *Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease.* Mol Cell Endocrinol, 2013. **379**(1-2): p. 35-42.
43. Chalasani, N., et al., *Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis.* Hepatology, 2003. **37**(3): p. 544-50.
44. Miele, L., et al., *Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test.* Am J Gastroenterol, 2003. **98**(10): p. 2335-6.
45. Cortez-Pinto, H., et al., *Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study.* JAMA, 1999. **282**(17): p. 1659-64.
46. Samuel, V.T., et al., *Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease.* J Biol Chem, 2004. **279**(31): p. 32345-53.
47. Jornayvaz, F.R. and G.I. Shulman, *Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 574-84.

48. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance.* Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.
49. Befroy, D.E., et al., *Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients.* Diabetes, 2007. **56**(5): p. 1376-81.
50. Morino, K., et al., *Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3587-93.
51. Petersen, K.F., et al., *Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes.* N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 664-71.
52. Dries, D.R., L.L. Gallegos, and A.C. Newton, *A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production.* J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 826-30.
53. Samuel, V.T., et al., *Inhibition of protein kinase Cepsilon prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease.* J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 739-45.
54. Frangioudakis, G., et al., *Diverse roles for protein kinase C delta and protein kinase C epsilon in the generation of high-fat-diet-induced glucose intolerance in mice: regulation of lipogenesis by protein kinase C delta.* Diabetologia, 2009. **52**(12): p. 2616-20.
55. Kumashiro, N., et al., *Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(39): p. 16381-5.
56. Cheng, Z., et al., *Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver.* Nat Med, 2009. **15**(11): p. 1307-11.
57. Szendroedi, J. and M. Roden, *Ectopic lipids and organ function.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(1): p. 50-6.
58. Nakamura, S., et al., *Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria.* J Biol Chem, 2009. **284**(22): p. 14809-18.
59. Evans, J.L., et al., *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.* Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 599-622.
60. Mantena, S.K., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases.* Free Radic Biol Med, 2008. **44**(7): p. 1259-72.
61. Mantena, S.K., et al., *High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo.* Biochem J, 2009. **417**(1): p. 183-93.
62. Koliaki, C. and M. Roden, *Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus.* Annu Rev Nutr, 2016. **36**: p. 337-67.
63. Mellitus, E.C.o.t.D.a.C.o.D., *Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* Diabetes Care, 1999. **22**: p. S5–S19.
64. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a 1H NMR spectroscopy study.* Diabetologia, 1999. **42**(1): p. 113-6.
65. Krebs, M., et al., *Prevention of in vitro lipolysis by tetrahydrolipstatin.* Clin Chem, 2000. **46**(7): p. 950-4.
66. Hojlund, K., et al., *Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH2-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes.* Diabetes, 2003. **52**(6): p. 1393-402.
67. Bernroider, E., et al., *The role of intramyocellular lipids during hypoglycemia in patients with intensively treated type 1 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(10): p. 5559-65.
68. Zentrum, D.D., *Standard Operating Procedure Oraler Glukosetoleranztest.*
69. Phielix, E., J. Szendroedi, and M. Roden, *Mitochondrial function and insulin resistance during aging: a mini-review.* Gerontology, 2011. **57**(5): p. 387-96.
70. Naressi, A., et al., *Java-based graphical user interface for the MRUI quantitation package.* MAGMA, 2001. **12**(2-3): p. 141-52.

71. Schmid, A.I., et al., *Quantitative ATP synthesis in human liver measured by localized 31P spectroscopy using the magnetization transfer experiment.* NMR Biomed, 2008. **21**(5): p. 437-43.
72. Szendroedi, J., et al., *Impaired mitochondrial function and insulin resistance of skeletal muscle in mitochondrial diabetes.* Diabetes Care, 2009. **32**(4): p. 677-9.
73. Longo, R., et al., *Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis.* J Magn Reson Imaging, 1995. **5**(3): p. 281-5.
74. Singhal, P., et al., *Regulation of endogenous glucose production after a mixed meal in type 2 diabetes.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **283**(2): p. E275-83.
75. Zhang, D., et al., *Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17075-80.
76. Szendroedi, J., et al., *Skeletal muscle phosphodiester content relates to body mass and glycemic control.* PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21846.
77. Iozzo, P., et al., *Fatty acid metabolism in the liver, measured by positron emission tomography, is increased in obese individuals.* Gastroenterology, 2010. **139**(3): p. 846-56, 856 e1-6.
78. Kotronen, A., et al., *Liver fat and lipid oxidation in humans.* Liver Int, 2009. **29**(9): p. 1439-46.
79. Sunny, N.E., et al., *Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease.* Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 804-10.
80. Khoo, E.Y., et al., *Elevation of alanine transaminase and markers of liver fibrosis after a mixed meal challenge in individuals with type 2 diabetes.* Dig Dis Sci, 2012. **57**(11): p. 3017-25.
81. Satapati, S., et al., *Mitochondrial metabolism mediates oxidative stress and inflammation in fatty liver.* J Clin Invest, 2015. **125**(12): p. 4447-62.
82. Nair, S., et al., *Hepatic ATP reserve and efficiency of replenishing: comparison between obese and nonobese normal individuals.* Am J Gastroenterol, 2003. **98**(2): p. 466-70.
83. Kotiadis, V.N., M.R. Duchen, and L.D. Osellame, *Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(4): p. 1254-65.
84. Browning, J.D. and J.D. Horton, *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury.* J Clin Invest, 2004. **114**(2): p. 147-52.
85. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
86. Diehl, A.M., et al., *Cytokines and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.* Gut, 2005. **54**(2): p. 303-6.
87. Pessayre, D. and B. Fromenty, *NASH: a mitochondrial disease.* J Hepatol, 2005. **42**(6): p. 928-40.
88. Kelley, D.E., B.H. Goodpaster, and L. Storlien, *Muscle triglyceride and insulin resistance.* Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 325-46.
89. Morino, K., K.F. Petersen, and G.I. Shulman, *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction.* Diabetes, 2006. **55 Suppl 2**: p. S9-S15.
90. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.
91. Lionetti, L., et al., *Skeletal muscle subsarcolemmal mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats exhibiting impaired glucose homeostasis.* Int J Obes (Lond), 2007. **31**(10): p. 1596-604.
92. Begriche, K., et al., *Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it.* Mitochondrion, 2006. **6**(1): p. 1-28.

93. Misu, H., et al., *Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes.* Diabetologia, 2007. **50**(2): p. 268-77.
94. Takamura, T., et al., *Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(12): p. 2601-9.
95. Satapati, S., et al., *Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver.* J Lipid Res, 2012. **53**(6): p. 1080-92.
96. Raffaella, C., et al., *Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance.* Obesity (Silver Spring), 2008. **16**(5): p. 958-64.
97. Meyerhoff, D.J., et al., *Alcoholic liver disease: quantitative image-guided P-31 MR spectroscopy.* Radiology, 1989. **173**(2): p. 393-400.
98. Butterworth, M., D.G. Upshall, and G.M. Cohen, *A novel role for carboxylesterase in the elevation of cellular cysteine by esters of cysteine.* Biochem Pharmacol, 1993. **46**(7): p. 1131-7.
99. Rajanayagam, V., et al., *Quantitative P-31 MR spectroscopy of the liver in alcoholic cirrhosis.* J Magn Reson Imaging, 1992. **2**(2): p. 183-90.
100. Liesa, M. and O.S. Shirihai, *Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure.* Cell Metab, 2013. **17**(4): p. 491-506.
101. Jelenik, T. and M. Roden, *Mitochondrial plasticity in obesity and diabetes mellitus.* Antioxid Redox Signal, 2013. **19**(3): p. 258-68.
102. Liu, H.Y., et al., *Prolonged exposure to insulin suppresses mitochondrial production in primary hepatocytes.* J Biol Chem, 2009. **284**(21): p. 14087-95.
103. Szendroedi, J., et al., *Muscle mitochondrial ATP synthesis and glucose transport/phosphorylation in type 2 diabetes.* PLoS Med, 2007. **4**(5): p. e154.
104. Kelley, D.E., et al., *Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes.* Diabetes, 2002. **51**(10): p. 2944-50.
105. Abdelmalek, M.F., et al., *Higher dietary fructose is associated with impaired hepatic adenosine triphosphate homeostasis in obese individuals with type 2 diabetes.* Hepatology, 2012. **56**(3): p. 952-60.
106. Abdelmalek, M., Suzuki, A., Guy, C., Unalp-Arida, A., Colvin, R., Johnson, RJ., & Diehl, *Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 2010. **51**: p. 1961-1971.
107. Ouyang, X., et al., *Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2008. **48**(6): p. 993-9.
108. Butterworth, P.J. and M.J. Younus, *Uptake of phosphate by rat hepatocytes in primary culture: a sodium-dependent system that is stimulated by insulin.* Biochim Biophys Acta, 1993. **1148**(1): p. 117-22.
109. Szendroedi, J., et al., *Reduced basal ATP synthetic flux of skeletal muscle in patients with previous acromegaly.* PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3958.
110. Pazahr, S., et al., *Magnetic resonance imaging of the liver: apparent diffusion coefficients from multiexponential analysis of b values greater than 50 s/mm2 do not respond to caloric intake despite increased portal-venous blood flow.* Invest Radiol, 2014. **49**(3): p. 138-46.

Danksagung

Eine Dissertation beruht nie auf der Arbeit einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bei den Menschen bedanken, die zu deren Erstellung beigetragen haben.
Ich danke meinem Doktorvater Professor Roden, der mir mit seinem Fachwissen zur Seite stand.
Weiterhin danke ich ganz besonders Frau Doktor Julia Szendrödi, die mir stets eine Ansprechpartnerin war und diese Arbeit durch ihre Unterstützung, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik erst ermöglichte.
Auch möchte ich Frau Doktor Maria Fritsch für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Studie sowie der Analyse der Daten bedanken. Frau Doktor Chrysi Koliaki danke ich für die Zusammenarbeit bei der Datensammlung.
Des Weiteren gilt den Studienteilnehmern sowie Myrko Esser, Kai Tinnes, Andrea Nagel und Nicole Achterath mein Dank für die hervorragende technische Assistenz bei den euglykämischen Clampuntersuchungen und der MRS-Studie.
Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie und meine Freunde. Meinen Eltern gilt ganz besonderer Dank. Sie mussten meine zeitweilig schlechte Laune und überstrapazierten Nerven ertragen und standen mir trotzdem stets mit Ermutigungen und Ansporn zum Weitermachen zur Seite. Ohne sie hätte vielleicht sowohl das Studium als auch diese Dissertation kein gutes Ende genommen.
Gleiches gilt für meine Freunde, die erfolgreich für regelmäßige Abwechslung sorgten. Dabei möchte ich vor allem Katharina Brockmann hervorheben. Die gemeinsame Arbeit für diese Studie und an unserer jeweiligen Dissertation hat uns noch enger zusammengeschweißt. Ohne einander wäre das nicht möglich gewesen.

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.

19. Dezember 2017, Stefanie Zimmermann