

Aus dem
Deutschen Diabetes Zentrum
Leibniz-Zentrum für Diabetes-Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Klinische Diabetologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Roden

Der Einfluss von zwei unterschiedlichen
Ernährungsmodifikationen
auf die Insulinsensitivität
bei Typ 2 Diabetes mellitus

Dissertation

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

vorgelegt von
Parnian Firouzi

2018

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolay Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Stephan vom Dahl

*Dedicated to my beloved
cousin in heaven
Dr. Sanaz Yazdani*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Nowotny B, Zahiragic L, Bierwagen A, Kabisch S, Groener JB, Nowotny PJ, Fleitmann AK, Herder C, Pacini G, Erlund I, Landberg R, Haering HU, Pfeiffer A, Nawroth P, Roden M **(2015)** Low-energy diets differing in fibre, red meat and coffee intake equally improve insulin sensitivity in type 2 diabetes: a randomised feasibility trial. *Diabetologia* 58:255-264.

Nowotny B, Zahiragic L, Bierwagen A, Kabisch S, Groener JB, Nowotny PJ, Fleitmann AK, **Firouzi P**, Herder C, Pacini G, Erlund I, Landberg R, Haering HU, Pfeiffer A, Nawroth P, Roden M **(2016) Erratum to:** Low-energy diets differing in fibre, red meat and coffee intake equally improve insulin sensitivity in type 2 diabetes: a randomised feasibility trial. *Diabetologia* 59:1329.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1. Definition und Diagnosekriterien des Diabetes mellitus.....	1
1.2. Epidemiologie des Typ 2 Diabetes mellitus.....	1
1.3. Glukosehomöostase	2
1.4. Langzeiteffekte von Insulin	10
1.5. Insulinresistenz	11
1.6. Ursachen der Insulinresistenz.....	12
1.7. Messung der Insulinresistenz.....	14
1.8. Einfluss des Lebensstils auf die Insulinresistenz.....	18
1.9. Ziel der Arbeit und Hypothese	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Infusions- und Nährlösungen	20
2.2. Verbrauchsmaterialien.....	20
2.3. Geräte und Software	23
2.4. Bestimmungsmethoden	25
2.5. Studiendesign	27
2.6. Statistische Analyse	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Einschluss der Probanden.....	49
3.2. Ganzkörper-Insulinsensitivität.....	51
3.3. Hepatische Insulinsensitivität.....	52
4. Diskussion.....	54

4.1. Ernährungseinfluss auf die Insulinsensitivität	54
4.2. Schlussfolgerungen	58
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis.....	61
Danksagung.....	67

Abkürzungsverzeichnis

4-AA	4-Aminoantipyrin
AC	Adenylatcyclase
ACOD	Acyl-CoA-Oxidase
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Amerikanische Diabetes Gesellschaft)
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>Acquired Immuno Deficiency Syndrome</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APE	<i>Atom Percent Enrichment</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosinriphosphat
BIA	Bioelektrische Impendanzanalyse
BLS	Bundeslebensmittelschlüssel
BMI	<i>Body Mass Index</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
D2INF	D-[6,6- ² H ₂]Glukose in NaCl
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DDIET	<i>Diabetes Diet Intervention and Energy Restriction Trial</i> (Diabetes-Diät-Interventions- und Energierestriktions-Studie)
DDZ	Deutsches Diabetes Zentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRS	Diabetes-Risiko-Score
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGP	Endogene Glukoseproduktionsrate
EKG	Elektrokardiogramm
EPIC-Studie	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GDC	<i>German Diabetes Center</i>
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GIR	Glukoseinfusionsrate
GLP-1	<i>Glucagon-like Peptide-1</i>
GLUT-1, -2, -3, -4	Glukosetransporter -1, -2, -3, -4
GRB-2	<i>Growth Factor Receptor Bound 2</i>
GSK-3	Glykogensynthasekinase-3
Hb	Hämoglobin
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin, Subfraktion A1c
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HG20	20%ige Glukoselösung mit D-[6,6- ² H ₂]Glukose
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOMA-Index	<i>Homeostasis Model Assessment</i>
H-RISIKO	Hoch-Risiko
IPAQ	<i>International Physical Activity Questionnaire</i>
IRS-1, -2, -4	Insulinrezeptorsubstrat-1, -2, -4
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MCH	Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskuläres Volumen
MEHA	3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin
MET	Metabolisches Äquivalent
min	Minute

NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH = oxidiert)
NEFA	Nicht-veresterte (freie) Fettsäuren
N-RISIKO	Niedrig-Risiko
PDE-3B	Phosphodiesterase-3B
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase</i>
PFK-2	Phosphofruktokinase-2
PI-3,4,5-P₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA, B, C	Proteinkinase A, B, C
POD	Peroxidase
PPi	Phosphorsäure
QUICKI	<i>Quantitative Insulin Sensitivity Check Index</i>
Ra	<i>Rate of appearance</i> (Endogene Glukoseproduktion)
Rd	<i>Rate of disappearance</i> (Glukoseaufnahme)
RNA	Ribonukleinsäure
SC	Korrekturfaktor für die konstante Glukosekonzentration
SEM	<i>Standard Error of Mean</i> (Standardfehler)
T4	Thyroxin
TNF	Tumornekrose-Faktor
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TTR	<i>Tracer-to-Tracer Ratio</i>
Tyr-P	Phosphotyrosin des Insulinrezeptors
UC	Korrekturfaktor für den urinären Glukoseverlust
UTP	Uridintriphosphat
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

1. Einleitung

1.1. Definition und Diagnosekriterien des Diabetes mellitus

Der Begriff *Diabetes mellitus* bezeichnet durch chronische Hyperglykämie charakterisierte Stoffwechselstörungen. Ursache ist entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Insulinwirkung oder eine Kombination aus beiden Faktoren (American Diabetes Association, 2014). Chronische Hyperglykämie begünstigt dabei eine Diabetes-spezifische Mikroangiopathie, die zu Folgeerkrankungen wie Retinopathie, Nephropathie oder Neuropathie führen kann. Ist die Konzentration der venösen Gelegenheits-Plasmaglukose höher als 199 mg/dl oder die Nüchternblutglukose im venösen Plasma höher als 125 mg/dl, wird die Diagnose *Diabetes mellitus* gestellt. Die Nüchternblutglukose-Konzentration setzt sich zu 95% aus der durch die Leber und zu 5% aus der durch die Nieren freigesetzten Glukose zusammen. Ein weiteres Diagnosekriterium ist der 2-Stunden-Wert der Blutglukosekonzentration nach einem oralen Glukose-Toleranztest, der bei Diabetes mellitus mehr als 199 mg/dl beträgt. Der HbA1c-Wert, der den mittleren Plasmaglukosespiegel der letzten zwölf Wochen darstellt und zur Verlaufskontrolle einer Diabetes-Therapie eingesetzt wird, kann ebenfalls als Diagnosekriterium verwendet werden. Liegt der HbA1c-Wert höher als 6,5%, lässt dies auf einen Diabetes mellitus schließen, während ein Wert zwischen 5,7 und 6,5% Personen mit erhöhtem Diabetesrisiko identifiziert (American Diabetes Association, 2014).

1.2. Epidemiologie des Typ 2 Diabetes mellitus

Mindestens 5% der deutschen Bevölkerung leiden an manifestem Typ 2 Diabetes mellitus. Dieser hat in der Bevölkerungsgruppe der 55- bis 74-Jährigen bereits eine

Prävalenz von bis zu 18%. In Deutschland wird, wie auch weltweit, seit Jahrzehnten ein stetiger Anstieg der Inzidenz des Typ 2 Diabetes mellitus beobachtet, während die Zahl der Betroffenen jährlich um 5% zunimmt (Giani et al., 2004; Rathmann et al., 2009).

1.3. Glukosehomöostase

Die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase innerhalb eines engen physiologischen Bereichs unterliegt der Regulierung durch die Hormone Insulin und Glukagon sowie der kontinuierlichen Registrierung der Blutglukosekonzentration durch spezifische Rezeptoren (Glukose-Sensoren), die sich auf den glukosesensiblen Alpha- und Beta-Zellen der Langerhans-Inseln im Pankreas befinden (Hers, 1990; Saltiel, 2016). Dadurch werden sowohl Insulin- als auch Glukagonsekretion eng an den Glukosestoffwechsel gekoppelt. Für die Aufrechterhaltung der normalen Blutglukosespiegel ist ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Insulinsekretion und Insulinwirkung notwendig. Gehirn und Erythrozyten decken ihren Energiebedarf ausschließlich über Glukose, sodass ein dauerhafter basaler Glukosebedarf besteht, der laufend gedeckt werden muss. Die Glukoseaufnahme in diesen Organen erfolgt Insulin-unabhängig. Glukose wird in nüchternem Zustand nur in der Leber (mittels Glukoneogenese und Glykogenolyse) und geringfügig in der Niere (mittels Glukoneogenese) produziert und von dort ins Blut abgegeben. Wichtige Substrate für die Glukoneogenese sind Glycerin, die Aminosäuren Alanin und Glutamin (aus dem Protein- und Fettstoffwechsel) sowie Laktat (aus Muskelglykogen und Glukose). Dabei gleicht die Rate, mit der Glukose in das Plasma freigesetzt wird, derjenigen Rate, mit der Glukose aus dem Plasma aufgenommen wird.

1.3.1. Pankreas

Das Pankreas ist sowohl eine exokrine als auch eine endokrine Drüse. Im exokrinen Anteil wird ein Verdauungsekret produziert, das aus Bikarbonat, Proteasen, Lipasen, Glykosidasen und Nukleasen besteht. Der endokrine Bereich des Pankreas besteht hingegen aus etwa einer Million Langerhans-Inseln, die homogen über das gesamte Pankreas verteilt sind. In diesen Zellaggregaten sind drei verschiedene Zelltypen nachweisbar. Etwa 20% der Inselzellen sind sogenannte Alpha-Zellen, die für die Glukagonbiosynthese verantwortlich sind. 70 - 80% der Inselzellen hingegen sind Insulin-produzierende Beta-Zellen. Die Beta-Zellen befinden sich im Zentrum der Langerhans-Inseln und werden arteriell optimal versorgt, wodurch eine schnelle Registrierung der Blutglukose-Konzentration gewährleistet wird. Etwa 7% der Inselzellen entfallen auf die sogenannten Delta- und PP-Zellen. Delta-Zellen bilden Somatostatin, während PP-Zellen für die Polypeptidbildung verantwortlich sind.

1.3.2. Insulin und C-Peptid

Insulin ist ein 5,8 kDA großes Proteohormon. Es besteht aus einer A-Peptidkette (21 Aminosäuren) und einer B-Peptidkette (30 Aminosäuren). Beide Ketten werden durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Eine weitere Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der A-Kette und stabilisiert die Raumstruktur des Insulins (**Abb. 1**).

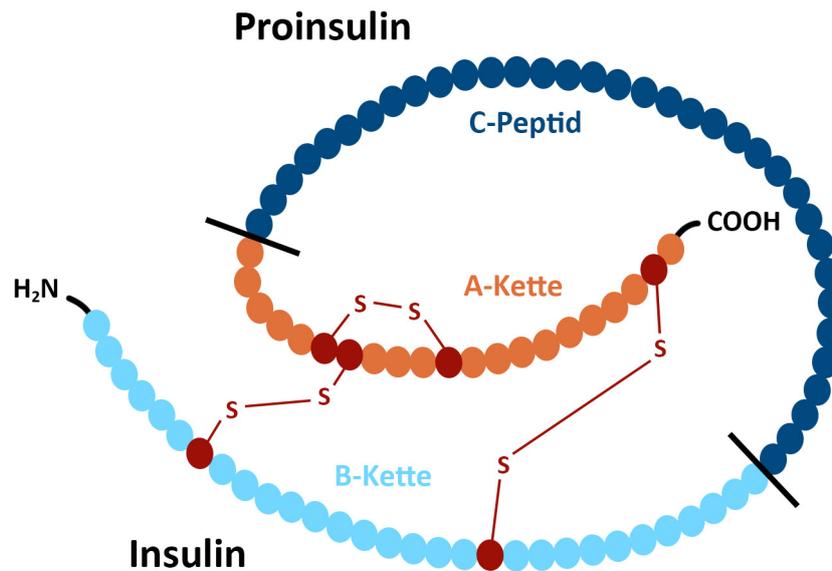


Abb. 1 Struktur von Proinsulin und Insulin.

Die Insulinbiosynthese erfolgt in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Zunächst wird das Präproinsulin in den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums der Beta-Zellen durch Bindung der Transkriptions-Faktoren an die DNA des Insulingens synthetisiert. Mit Hilfe des Signalpeptids gelangt das Exportprotein in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums. Dort erfolgt die Abtrennung des Signalpeptids, sodass Proinsulin entsteht. Es besteht aus einer A- und einer B-Kette, sowie einem C-Peptid. Durch Aktivierung von Prohormon-Konvertasen wird das C-Peptid entfernt und so Insulin gebildet. Im Golgi-Apparat bilden sich Sekretgranula, in denen Insulin und C-Peptid in einem äquimolaren Verhältnis enthalten sind. Die C-Peptid-Konzentration im Plasma entspricht somit der Insulin-Konzentration im Plasma. Diese Erkenntnis ist in der Diabetologie von klinischer Bedeutung, da durch eine spezifische immunologische Bestimmung der C-Peptid-Konzentration im Plasma ein Rückschluss auf die körpereigene Restsekretion von Insulin möglich ist. Glukose ist der wichtigste Faktor für die Expression des Insulingens. Die Erhöhung der Glukose-Konzentration im Plasma führt zu einem raschen Wiederauffüllen der intrazellulären Insulinvorräte

in den Beta-Zellen. Andererseits hemmt eine erhöhte Insulinkonzentration die Expression des Insulingens.

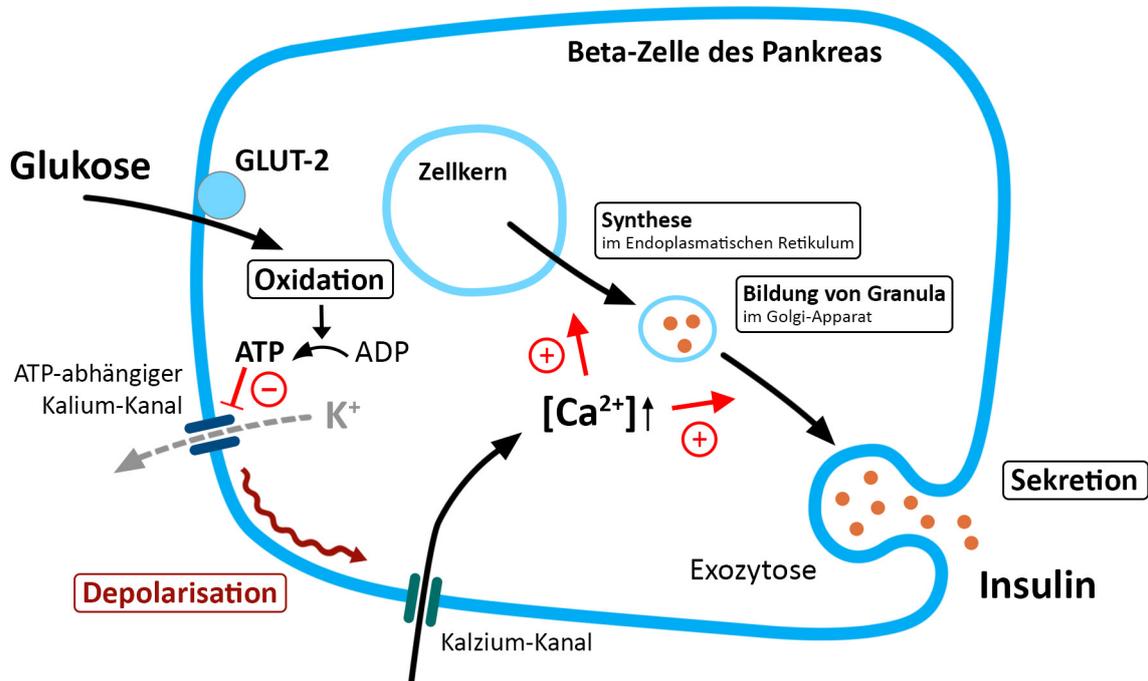


Abb. 2 Mechanismus der Insulinsekretion (*GLUT-2* = Glukose-Transporter 2; *ADP* = Adenosindiphosphat; *ATP* = Adenosintriphosphat).

Die Glukose-stimulierte Insulinsekretion beginnt bei einer Glukose-Konzentration von 2 - 3 mmol/l (45 mg/dl) und nimmt bis zu einer Konzentration von 15 mmol/l (270 mg/dl) zu. In Abhängigkeit von der Blutglukose-Konzentration wird über das Glukosetransportprotein GLUT-2 Glukose in die Beta-Zellen aufgenommen. Nachfolgend wird die Glukose durch Glukokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Durch die Verstoffwechslung des Glukose-6-Phosphats in der Glykolyse entsteht ATP. Die in der Plasmamembran der Beta-Zellen vorhandenen ATP-abhängigen Kalium-Kanäle werden gehemmt und dadurch eine Depolarisation der Zelle ausgelöst. Durch die Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle wird die Kalziumkonzentration in den Beta-Zellen erhöht. Der Anstieg der zytosolischen Kalzium-

konzentration ist Auslöser für die gesteigerte Exozytose der Beta-Granula sowie der Insulinsekretion (**Abb. 2**). Das durch Exozytose der Beta-Granula freigewordene Insulin bindet schließlich an spezifischen Insulinrezeptoren auf den Zielzellen. Hauptzielgewebe für Insulin sind Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe.

Der Insulinrezeptor ist ein tetrameres integrales Membranprotein, das aus je zwei identischen Untereinheiten ($\alpha_2\beta_2$) besteht. Die Verknüpfung der einzelnen Untereinheiten erfolgt durch Disulfidbrücken. Die beiden Alpha-Untereinheiten befinden sich außerhalb der Membran und sind für die Insulinbindung verantwortlich. Die integrierten Beta-Untereinheiten sind Rezeptor-Tyrosinkinasen. Durch Bindung des Insulinmoleküls an die extrazellulär gelegenen Alpha-Untereinheiten kommt es zu einer Konformationsänderung im Rezeptor, und die zytosolischen Anteile der Beta-Untereinheiten werden aktiviert. Es folgt die Autophosphorylierung der Beta-Untereinheiten an den Tyrosinresten. Kommt es zur Phosphorylierung des Tyrosin-960, wird eine Bindungsstelle für Insulinrezeptorsubstrat-1 geschaffen. Anschließend erfolgt die Bindung von Insulinrezeptorsubstraten (IRS-1, -2, -4) an die Phosphotyrosine des Insulinrezeptors. Durch Phosphorylierung der Tyrosinreste der Insulinrezeptorsubstrate werden neue Bindungsstellen für weitere Proteine wie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) und *Growth Factor Receptor Bound 2* (GRB-2) generiert. In Folge werden zahlreiche Lipid- und Proteinkinasen aktiviert und dadurch insulinspezifische Vorgänge wie die Glukoseaufnahme sowie die Glykogensynthese gestartet (**Abb. 3**). Die Bindung der PI-3K führt zur Aktivierung des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat ($PI-3,4,5-P_3$), das nun zwei weitere Enzyme binden kann. Die *Phosphoinositide-dependent Kinase* (PDK) wird durch Bindung aktiviert und phosphoryliert dadurch Proteinkinase B (PKB, AKT), die zur Aktivierung ebenfalls an das Membranphospholipid gebunden sein muss. PKB führt zu einer Translokation des GLUT-4. Sie inaktiviert zwar die Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3), aktiviert jedoch die Phosphodiesterase-3B (PDE-3B) und erhöht so die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Darüber hinaus wird auch Phospho-

fructokinase-2 (PFK-2) durch die PKB aktiviert und die Glykolyse gestartet. Die Bindung von GRB-2 schließlich führt zur Änderung der Genexpression (**Abb. 3**).

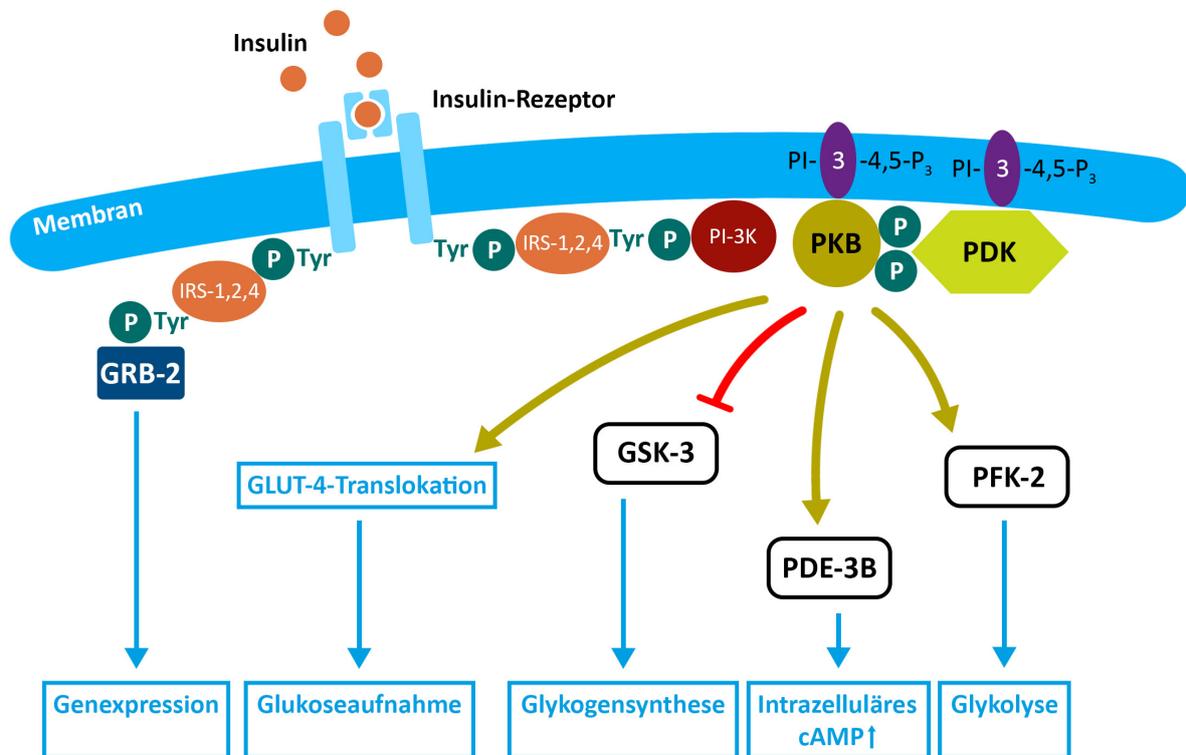


Abb. 3 Intrazelluläre Signalübertragung des Insulins.

IRS-1, -2, -4: Insulinrezeptorsubstrat-1, -2, -4. **Tyr-P:** Phosphotyrosin des Insulinrezeptors. **PI-3K:** Phosphatidylinositol-3-Kinase. **GRB-2:** *Growth Factor Receptor Bound 2*. **PI-3,4,5-P₃:** Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat. **PDK:** *Phosphoinositide-dependent Kinase*. **PKB:** Protein-kinase B. **GLUT-4:** Glukosetransporter-4. **GSK-3:** Glykogensynthasekinase-3. **PDE-3B:** Phosphodiesterase-3B. **PFK-2:** Phosphofruktokinase-2.

1.3.3. Glukose-Transport

In vielen Zielzellen kann der Glukose-Transport durch Insulin gesteigert werden. Die Aufnahme von Glukose erfolgt hier durch zellspezifische *Carrier*-Proteine. In Darm- und Nierenepithelzellen erfordert die Glukose-Absorption aus der Nahrung bzw. die Rückresorption aus dem Urin einen ATP-abhängigen Natrium-Glukose-Cotransporter. Für die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten ist die Natrium-Kalium-ATPase

verantwortlich. Alle anderen Körperzellen besitzen verschiedene spezifische, jedoch ATP-unabhängige Glukose-Transporter. Der Glukose-Transport erfolgt dabei passiv durch ein Konzentrationsgefälle aufgrund erleichterter Diffusion.

Es sind fünf sogenannte GLUT-Transporter bekannt, die zum Teil sehr unterschiedlich aufgebaut sind. Sie bestehen aus zwölf transmembranösen Abschnitten, die durch sechs extra- und fünf intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die differenten physikochemischen Eigenschaften der Transporter werden durch die erste große extrazelluläre Schleife sowie intrazelluläre amino- und carboxyterminale Enden bestimmt. GLUT-1 ist typisch für Erythrozyten, kommt jedoch auch in fast allen anderen Körperzellen vor und dient der basalen Nährstoffversorgung der Zellen mit Glukose. Die Expression von GLUT-1-Transportern steigt bei Hypoglykämie, Zellteilung, Zellwachstum, Virusinfektionen und Stresssituationen. Typisch für die Leber und die Beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas ist der GLUT-2-Transporter. Dieser weist eine geringe Affinität zu Glukose auf, daher wird der maximale Transport erst bei sehr hohen Glukose-Konzentrationen erreicht. Die Aufnahme der Glukose ist dementsprechend proportional zur Glukose-Konzentration. Diese Eigenschaft ermöglicht eine präzise Kontrolle der Insulinsekretionsrate. GLUT-4 ist hingegen in Muskel- und Fettgewebe vorhanden. Hier steigt die Glukose-Transportrate durch Insulin innerhalb weniger Minuten um den Faktor 15 bis 40. GLUT-4-Transporter sind in zytoplasmatischen Vesikeln gespeichert. Die Bindung des Insulins an den Rezeptor und die Aktivierung der oben beschriebenen Signaltransduktionskaskade führt zu einer Annäherung der Vesikel an die Zellmembran und zu einer Integrierung ihrer GLUT-4-Transporter mittels Exozytose. Auch die Synthese von GLUT-4 wird durch Insulin induziert. Diese insulinabhängigen Schritte werden Translokation genannt. Insulinsekretion und Exozytose der Vesikel werden durch die Kalzium-Konzentration reguliert. In der Skelettmuskulatur werden GLUT-4-Transporter auch insulinunabhängig durch eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration eingebaut und der Muskel ist in der Lage zu kontrahieren (Li et al., 2007). Der im Gehirn vorherrschende

Transporter GLUT-3 und der im Jejunum vorhandene GLUT-5 besitzen eine sehr hohe Affinität zu Glukose und weisen sowohl bei physiologischen als auch bei hypoglykämischen Zuständen maximale Glukose-Transportraten auf.

Immer in der Zellmembran vorhanden sind die GLUT-2-Transporter. In Hepatozyten beispielsweise aktiviert Insulin die sogenannte Hexokinase. Sie phosphoryliert Glukose zu Glukose-6-Phosphat, sodass die intrazelluläre Glukose-Konzentration im Vergleich zur extrazellulären Konzentration niedrig bleibt und Glukose kontinuierlich in die Zelle hineindiffundieren kann. Bei niedrigem Insulinspiegel wird die Glukose der Hepatozyten mit Hilfe der GLUT-2-Transporter ins Plasma transportiert, um das Glukosegleichgewicht aufrechtzuerhalten. Ist nicht genügend Glukose in der Zelle vorhanden, wird diese aus Glykogen und Aminosäuren synthetisiert. Dieser Vorgang, der hauptsächlich in der Leber und in den Nieren stattfindet, wird als Glukoneogenese bezeichnet. Die Glukoneogenese kann durch Insulin gehemmt werden.

1.3.4. Glykogen und Glykolyse

In der Leber ebenso wie in der Muskulatur ist Glykogen die effiziente Speicherform der Glukose. Allerdings entsteht beim Abbau von Muskelglykogen keine Glukose. Die Glykogensynthese in der Leber erfolgt über einen direkten Syntheseweg aus Glukose und über einen indirekten Syntheseweg aus Glukose-6-Phosphat aus der oben beschriebenen Glukoneogenese.

Phosphofruktokinase ist ein Enzym, das zum Abbau der Glukose führt. Dieser Prozess wird Glykolyse genannt und dient der Energiegewinnung. Die Glykolyse kann sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen ablaufen. Unter anaeroben Bedingungen entsteht Lactat und ATP. Die Endprodukte der aeroben Glykolyse sind Kohlenstoffdioxid und Wasser. Das durch die Glykolyse als Zwischenprodukt entstehende Pyruvat wird durch den in den Mitochondrien vorhandenen Pyruvatdehydrogenase-Komplex irreversibel oxidativ decarboxyliert, sodass Acetyl-CoA entsteht. Dabei aktiviert Insulin den Pyruvatdehydrogenase-Komplex. Das Acetyl-

CoA kann entweder in den Citratzyklus eingeschleust werden, wobei als Endprodukte Kohlenstoffdioxid und Wasser entstehen, oder für die Fettsäurebiosynthese in Fett- und Leberzellen genutzt werden. Durch die Fettsäurebiosynthese und die anschließende Veresterung mit Glycerin wird Triacylglycerin gebildet. Das Triacylglycerin stellt die Speicherform von Fettsäuren dar. Insulin begünstigt den Aufbau dieser Speichermoleküle in den Fettzellen. Ein Überschuss an Triacylglycerin wird als Fettröpfchen im Fettgewebe gespeichert.

1.4. Langzeiteffekte von Insulin

Das von den Beta-Zellen sezernierte Insulin hemmt die Lipolyse im Fettgewebe, steigert die Glukoseaufnahme in die Skelettmuskeln und hemmt die Glukoseproduktion in der Leber (Dimitriadis et al., 2011).

Im Fettgewebe induziert Insulin – wie in **Kap. 1.3.4.** beschrieben – die Expression von Enzymen und Transportproteinen, die für die Glykolyse bzw. für die Umwandlung von Glukose in Pyruvat und anschließend über Acetyl-CoA in Fettsäuren essentiell sind (Randle et al., 1963). Insulin ist wichtig für die Aktivität der Lipoproteinlipase, die für die Aufnahme von Triacylglycerin aus VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) verantwortlich ist.

Wie bereits in **Kap. 1.3.4.** aufgeführt, induziert Insulin in der Leber die für die Glykolyse verantwortlichen Enzyme Glucokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase (Sillero et al., 1969). Die Glukoneogenese stellt prinzipiell die Umkehr der Glykolyse dar. Die Biosynthese der Glukoneogenese-spezifischen Schlüsselenzyme wie Pyruvatcarboxylase, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Fructose-1,6-Bisphosphatase und Glukose-6-Phosphatase wird durch Insulin somit gehemmt (Weber et al., 1965).

In den Skelettmuskeln erhöht Insulin die Rate der Glukoseaufnahme hauptsächlich durch Stimulation der Translokation von GLUT-4-Isoformen aus dem Zellinneren

Richtung Zelloberfläche (Shepherd and Kahn, 1999). Insulin steigert darüber hinaus die Transportrate einiger Aminosäuren in das Gewebe und somit auch die Rate der Proteinsynthese in Muskeln, Fettgewebe, Leber und anderen Organen (Dimitriadis et al., 2011).

1.5. Insulinresistenz

Von Insulinresistenz spricht man, wenn die Sensitivität für Insulin an den Zielorganen Fettgewebe, Leber und Muskel herabgesetzt ist (Zeyda and Stulnig, 2009). Die Insulinresistenz führt durch verminderte Suppression der endogenen Glukoseproduktion (EGP) zu chronischer Hyperglykämie sowie zu geringerer postprandialer Glukoseaufnahme in den Skelettmuskelzellen. Zudem wird die Insulinresistenz u.a. durch eine vermehrte Verfügbarkeit von Triacylglycerin aus der Nahrung, aus der Leber und durch reduzierte Lipolyse-Hemmung im Fettgewebe induziert.

Ist die Konzentration freier Fettsäuren erhöht, werden Glukosetransport und/oder Phosphorylierung gehemmt. Daraus folgt sowohl eine Abnahme der Glukoseoxidationsrate als auch der Glykogensyntheserate im Muskel (Roden et al., 1996). Darüber hinaus führt Insulinresistenz zu einer geringeren Fähigkeit des Insulins, den Glukosemetabolismus im peripheren Gewebe anzuregen bzw. die hepatische Glukoseproduktion zu beeinflussen (Kahn, 1994).

Die Wirkung des Insulins wird auf zellulärer Ebene über die Bindung am Insulinrezeptor vermittelt, woraufhin verschiedene Signalproteine aktiviert werden. Bei einer Insulinresistenz kommt es vor allem bei diabetischen Patienten mit manifester Nüchternhyperglykämie zu einem Post-Rezeptor-Defekt, durch den beispielsweise die Phosphoinositol-3-Kinase- oder PKB-Aktivität herabgesetzt wird (Krook et al., 1998). Die Insulinsensitivität von Skelettmuskulatur, Fettgewebe und Leber unterscheidet sich. Die Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur spielt vor allem für die postprandiale Glukoseverwertung eine zentrale Rolle, da die Skelettmuskulatur für ca.

80% der postprandialen Glukoseverwertung verantwortlich ist (DeFronzo et al., 1981; Shulman et al., 1990).

Im Fettgewebe ist bei einer Insulinresistenz die Lipolyse trotz hoher Insulinspiegel nicht unterdrückt. Demzufolge steigt die Konzentration der zirkulierenden freien Fettsäuren an. Also wird die Menge der von den Hepatozyten aufzunehmenden freien Fettsäuren und Glukose durch die Insulinresistenz von Adipozyten und Myozyten deutlich erhöht (Dancygier, 2006).

In der Leber werden nicht alle insulinsensitiven Vorgänge gleichermaßen beeinflusst: Die hepatische Lipogenese ist trotz Insulinresistenz gesteigert, während sowohl die Oxidation der freien Fettsäuren als auch die Glukoneogenese überaktiviert sein können (Horton et al., 2002). Des Weiteren wird die Synthese von Apolipoprotein B 100 und damit der VLDL-assoziierte Lipidtransport aus den Hepatozyten durch eine chronische Hyperinsulinämie vermindert. Dies führt, bei gleichzeitiger Hemmung der Triacylglycerinsekretion als VLDL, zu einer Zunahme der hepatischen Triacylglycerinsynthese (Charlton et al., 2002).

1.6. Ursachen der Insulinresistenz

Eine Insulinresistenz kann sowohl durch genetische als auch erworbene Faktoren verursacht werden (Rathmann et al., 2013). Genetisch determinierte Zustände sind Insulinrezeptormutationen oder Rezeptormangel. Selten können vorhandene Antikörper gegen den Insulinrezeptor ebenfalls Insulinresistenz verursachen.

Insulinresistenz, die im Rahmen einer Manifestation des Typ 2 Diabetes mellitus bei Adipositas auftritt, ist in hohem Maße mit der Zunahme des Körperfettanteils, Adipokinen, Inflammation, Hyperglykämie und freien Fettsäuren assoziiert. Eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren, die durch fehlende Hemmung der Lipolyse verursacht wird, kann ebenso wie ein hoher Lipidanteil in den Muskelzellen

die Insulinresistenz im Skelettmuskel begünstigen (Boden and Chen, 1995; Boden et al., 1994; Boden et al., 1991).

Eine erhöhte Konzentration freier Fettsäuren kann auch die Folge von Übergewicht sein (Bjorntorp et al., 1969). Dabei korreliert der Body-Mass-Index (BMI) mit der Stärke der Insulinresistenz (Bogardus et al., 1984).

Bei einer Insulinresistenz kommt es zu einer verminderten Autophosphorylierung der Beta-Untereinheiten an den Tyrosinresten des Insulinrezeptors. Dem zu Folge werden weniger Bindungsstellen für Insulinrezeptorsubstrate geschaffen und dies bewirkt eine verringerte Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase.

Die Insulinresistenz in Skelettmuskulatur führt neben der verminderten Glukosephosphorylierung und Glykolyse zu einer reduzierten Glucoseoxidation und einer eingeschränkten Glykogensynthese. Durch eine verminderte Aktivität der postrezeptorischen Signaltransduktionskaskade wird die Synthese von GLUT-4- und GLUT-12-Rezeptoren und somit auch die Glukoseaufnahme in die Muskelzelle gesenkt.

Diese verminderte Glukoseaufnahme führt kompensatorisch zu höheren Insulinkonzentrationen im Blut. Der Muskel besitzt eine metabolische Flexibilität und ist in der Lage, die benötigte Energie aus freien Fettsäuren zu beziehen, damit die Glukosezufuhr zum Gehirn gewährleistet werden kann (Abdul-Ghani and DeFronzo, 2010).

Fettgewebe ist als endokrines Organ in der Lage, sowohl das Insulin-sensitivierende Hormon Adiponectin als auch den Antagonisten Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF- α) zu produzieren (Cawthorn and Sethi, 2008). Die Zunahme an viszeralem Fett, Fettzellgröße und Fettsäurenakkumulation führt bei übergewichtigen Menschen zu einer gesteigerten Sekretion von TNF- α , das die Weiterleitung des Insulinsignals bereits am Rezeptor hemmt. Diese Hemmung wird durch die verringerte Phosphorylierung des IRS-1 hervorgerufen. Fettgewebe produziert ein weiteres Hormon namens Resistin, das eine Insulinresistenz im Muskel und in der Leber induzieren kann (Cawthorn and Sethi, 2008). Mit zunehmender Fettmasse steigt die Sekretion von TNF- α und Interleukin-6. Dadurch vermindert sich die Adiponectinproduktion der

Adipozyten (Liu et al., 2008). Die Wirkung des Adiponectins beruht auf der Aktivierung der wiederum AMP aktivierenden Proteinkinase und führt zur Erhöhung der Insulinsensitivität im Muskel und in der Leber. Des Weiteren stimuliert es die Insulinsekretion der Beta-Zellen. Adiponectin steigert die Glukoseverwertung im Muskel und den hemmenden Effekt des Insulins auf die Glukoneogenese. Zusätzlich senkt Adiponectin die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma sowie die Triacylglycerin-Akkumulation im Muskel und in der Leber (Mirza et al., 2012).

1.7. Messung der Insulinresistenz

Um die individuelle Insulinresistenz ermitteln zu können, wird die Insulinsensitivität gemessen. Diese kann durch verschiedene Methoden detektiert werden, die sich vor allem hinsichtlich des Aufwandes und der Komplexität unterscheiden. Die Insulinsensitivität wird bei der in dieser Arbeit angewandten Methode, dem hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp, in einem *Steady State*-Zustand ermittelt. Ein *Steady State* ist dann erreicht, wenn die EGP oder die exogene Glukosegabe im Gleichgewicht mit der Glukoseverwertung steht (Roden, 2007).

Zur Abschätzung der Insulinsensitivität kann ein Surrogat der Insulinresistenz im Nüchternzustand mit Hilfe eines mathematischen Modells berechnet werden: Der **HOMA-Index** (*Homeostasis Model Assessment*) lässt sich aus dem Produkt der Nüchternblutglukose- und Nüchterninsulin-Konzentration dividiert durch die Konstante $k = 22,5$ berechnen (Matthews et al., 1985). Der logarithmierte Kehrwert des HOMA-Index mit dem Wert 1 für die Konstante $k = 1$ wird **QUICKI** (*Quantitative Insulin Sensitivity Check Index*) genannt (Katz et al., 2000). Der Insulinsuppressions-Test stellt eine weitere Form der quantitativen Insulinsensitivitätsmessung dar. Bei diesem Test wird die endogene Insulinproduktion durch eine kontinuierliche Somatostatin-Infusion gehemmt. Es werden bestimmte Insulin-Konzentrationen, kombiniert mit variierenden Glukose-Konzentrationen, intravenös verabreicht und

dabei ein *Steady State*, d.h. eine konstante Blutglukose-Konzentration, gehalten. Je höher die Blutglukose-Konzentration im *Steady State*, desto ausgeprägter die Insulinresistenz (Roden, 2007). Die Ermittlung der Insulinsensitivität kann auch über dynamische Tests wie dem oralen oder intravenösen Glukose- und Insulintoleranztest erfolgen. Durch eine orale Glukosegabe steigt die Blutglukose-Konzentration in der ersten Stunde an. Unter physiologischen Bedingungen sollte die gestiegene Konzentration dann innerhalb von zwei bis drei Stunden wieder absinken (Roden, 2007). Beim intravenösen Glukosetoleranztest wird eine berechnete Glukosemenge intravenös verabreicht. Durch Blutprobenentnahmen nach der Injektion werden die Glukose- und Insulin-Konzentrationen gemessen (Roden, 2007). Via Insulintoleranztest kann die Insulinsensitivität nach einer exogenen Insulininjektion über das Ausmaß der fallenden Blutglukose-Konzentration bestimmt werden (Roden, 2007). Die oben dargestellten, technisch unkomplizierten Methoden sind dennoch nicht in der Lage, die Effekte verschiedener gleichzeitig ablaufender aktiver Prozesse zu ermitteln (Roden, 2007). Der Goldstandard für die Messung der Ganzkörperinsulinsensitivität ist daher der hyperinsulinämisch-euglykämische Glukose-Clamp, da dieser in hohem Maß reproduzierbar ist (DeFronzo et al., 1979; Del Prato, 1999; Ferrannini and Mari, 1998).

Im Jahr 1966 wurde der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp von Andres et al. entwickelt (Andres et al., 1966). Die Weiterentwicklung und Beschreibung der Technik erfolgte dann durch DeFronzo und Mitarbeiter im Jahr 1979 (DeFronzo et al., 1979). Der Clamp beginnt grundsätzlich nach Einhaltung einer 12-stündigen Nahrungskarenz. Ein hyperinsulinämischer Zustand wird erreicht, indem eine kontinuierliche Insulininfusion (z. B.: 40 mU Insulin/min/m² Körperoberfläche) verabreicht wird (DeFronzo et al., 1979).

Eine durch den hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp hervorgerufene hohe Insulinkonzentration im Blut sollte durch negative Rückkopplung zur Hemmung der Insulinsekretion in den Beta-Zellen führen, wobei dieser Effekt im Rahmen einer Insulinresistenz abnimmt. Ebenfalls wichtig zu berücksichtigen ist, ob durch die

Insulin-Infusion die EGP in der Leber vollständig gehemmt werden kann, oder ob durch eine (hepatische) Insulinresistenz die hepatische Glukoseabgabe lediglich reduziert wird (siehe auch **Kap. 2.5.7.**). Der hyperinsulinämische Zustand verursacht eine starke Insulinwirkung an den insulinsensitiven Organen und entkoppelt somit die Rückschleife zwischen der Blutglukosekonzentration und der endogenen Insulinsekretion (Bergman et al., 1985). So wird die hepatische Glukoneogenese, aus der 95% der Nüchternblutglukose entsteht, stark gehemmt. Die Glukoseverwertung in der Peripherie und vor allem in der Muskulatur steigt jedoch stark an. Diese beiden Effekte verursachen eine Hypoglykämie. Der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp beabsichtigt aber keine Hypoglykämie, sondern strebt einen euglykämischen Zustand an. Das heißt, dass in diesem Fall eine konstante Blutglukosekonzentration, die der normalen Nüchternblutglukosekonzentration entspricht, eingestellt werden muss. Durch eine angepasste exogene Glukoseinfusion kann das Absinken der Blutglukosekonzentration während des hyperinsulinämischen Clamps verhindert werden. Dabei entspricht im *Steady State* die applizierte Glukosemenge der von den Zielorganen insulinabhängig verwerteten Glukosemenge. Das heißt, dass die aus dem Plasma verwertete Glukose durch eine exogene Glukosegabe ersetzt wird und so eine konstante Glukosekonzentration während des Versuchs aufrechterhalten werden kann. Dazu wird den Probanden zur Messung der Glukosekonzentration in einem Fünf-Minuten-Intervall Blut entnommen und die Glukoseinfusionsrate an diesen Wert angepasst. Die Anpassung der Glukoseinfusionsrate wird entweder empirisch ermittelt, oder mit Hilfe einer Software, die den entsprechenden Korrektur-Algorithmus berücksichtigt.

Der Insulin-induzierte Glukosemetabolismus lässt sich grundsätzlich in einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Glukose-Stoffwechselweg einteilen. Die Glykogensynthese stellt dabei den nicht-oxidativen Stoffwechselweg dar und deren Rate wird vor allem in der Skelettmuskulatur unter hyperinsulinämischen Bedingungen erhöht (Shulman et al., 1990). Eine Insulinresistenz verursacht eine verminderte Insulin-induzierte Glykogensynthese in der Muskulatur. Denn die Glykogensyntheserate im

Muskel ist bei einem gesunden Menschen 2,4-mal höher als bei einem Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (Ekberg et al., 1999; Roden et al., 1996; Shulman et al., 1990). Die körpereigene Glukoseproduktion erfolgt hauptsächlich in der Leber (Ekberg et al., 1999). Sie wird durch eine erhöhte Glukagonkonzentration in den hepatischen Sinusoiden angeregt und bei hoher Insulinkonzentration gehemmt (Cherrington, 1999). Auch während des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps sorgt die Hyperinsulinämie für eine Hemmung der Glukagonsekretion und für eine Hemmung der körpereigenen Glukoseproduktion (Lewis et al., 1998; Prager et al., 1987). Die Höhe der Insulin-Konzentration sowie die Insulin-Sensitivität der Leber beeinflussen die hepatische Glukoneogenese (Roden, 2007). Das von den Beta-Zellen des Pankreas produzierte Insulin gelangt über die Vena portae in die Leber. Die Insulin-Konzentration im portalen Kreislauf ist 2 bis 2,5-mal höher als die Konzentration in den peripheren Venen (Waldhäusl et al., 1982). Um die endogene Insulinproduktion während des Clamps ermitteln zu können, reicht die Messung der Plasmakonzentration des C-Peptids aus, da die C-Peptid-Konzentration der endogenen Insulin-Konzentration entspricht. Die Werte für die C-Peptid-Konzentration sind hier eher niedrig, denn das C-Peptid wird erst am Ende der während des Clamps gehemmten endogenen Insulinsynthese gebildet. Durch die gehemmte Insulinproduktion des Pankreas wird der Gradient zwischen der Portalvene und der peripheren Vene aufgehoben und die Insulin-Konzentrationen gleichen sich während des Clamps an (Roden, 2007).

Eine Insulin-Infusion mit einer Konzentration von 1 mU/kg Körpergewicht kann die hepatische Glukosesynthese um 98% senken (DeFronzo et al., 1983; Rizza et al., 1981). Die EGP wird bereits bei niedrig dosierten Insulin-Infusionen reduziert, obwohl die Insulin-Konzentration in den hepatischen Sinusoiden fast unverändert bleibt (Prager et al., 1987). Dieser Umstand lässt sich durch den extrahepatischen Effekt des Insulins auf die Glukoneogenese erklären. Denn die für die Glukoneogenese notwendige Bereitstellung der erforderlichen Substrate wie hepatisches Acetyl-CoA aus der Peripherie wird insulininduziert gehemmt. Die indirekte Hemmung der

Lipolyse im Fettgewebe erfolgt während der Hyperinsulinämie auf gleiche Weise (Giacca et al., 1999; Lewis et al., 1996; McCall et al., 1998; Roden, 2007). Kürzlich durchgeführte Untersuchungen konnten zeigen, dass der Hauptmechanismus, durch den Insulin die hepatische Glukosesynthese unterdrückt, durch Reduktion von Acetyl-CoA gesteuert wird, da wiederum die Lipolyse in weißem Fettgewebe supprimiert wird (Perry et al., 2015).

1.8. Einfluss des Lebensstils auf die Insulinresistenz

Die Faktoren, die eine Insulinresistenz beeinflussen können, sind in der Regel mit dem heutigen Lebensstil eng verbunden. Neben körperlicher Aktivität und Stress spielt die Ernährung eine führende Rolle, sodass die primäre Therapie des Typ 2 Diabetes aus Ernährungsumstellung und Steigerung der körperlichen Aktivität besteht. Denn körperliche Aktivität kann eine Insulinsensitivität entscheidend modulieren: *Björntorp et al.* konnten beispielsweise eine Normalisierung erhöhter Insulinspiegel durch Ausdauertraining nachweisen (Bjorntorp et al., 1970). Abhängig von der Dauer und Intensität der körperlichen Belastung wird die periphere Glukoseverwertung gesteigert. Umgekehrt führen Bewegungsmangel und ein zunehmendes Alter zur Abnahme der Insulinsensitivität (Coyle et al., 1992; Ebeling et al., 1993; Ryan, 2000). Eine fettreiche und überkalorische Ernährung mit wenigen Ballaststoffen führt langfristig ebenso zu Fettleibigkeit und verschlechtert die Insulinsensitivität zusätzlich. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang jedoch auch die Körperfettverteilung, denn ein stammbetonter Fettverteilungstyp korreliert deutlich häufiger mit einer Insulinresistenz (Chan et al., 1994). Einzelne Studien konnten zeigen, dass bereits geringes Übergewicht die Insulinsensitivität verschlechtern kann. Es konnte beispielsweise bei einem Körpergewicht von circa 40% über dem Idealgewicht eine Abnahme der peripheren Glukoseverwertung um 30 bis 40% beobachtet werden (Golay et al., 1988). Eine Ernährungsumstellung auf ballaststoff-

und kohlenhydratreiche Nahrung mit mehrfach ungesättigten Fetten kann hingegen die Insulinsensitivität positiv beeinflussen (Anderson and Ward, 1978; Brunzell et al., 1971; Fukagawa et al., 1990).

1.9. Ziel der Arbeit und Hypothese

Epidemiologische Analysen der Potsdamer EPIC-Studie, aus denen der Deutsche Diabetes-Risiko-Score (DRS) erstellt wurde, haben unter anderem gezeigt, dass bei regelmäßigem Vollkorngetreideballaststoff- und Kaffeekonsum das Risiko, an Typ 2 Diabetes mellitus zu erkranken, geringer war (Schulze et al., 2007). Bei regelmäßigem Konsum von rotem Fleisch war das Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus hingegen erhöht (Schulze et al., 2007). Auf diesen Daten basierend, wurden im Rahmen der DDIET-STUDIE (Deutsche Diabetes-Diät-Interventions- und Energierestriktions-Studie), auf die sich diese Arbeit bezieht, die Auswirkungen von zwei verschiedenen Ernährungsmodifikationen auf den primären Zielparameter der Ganzkörperinsulinsensitivität sowie den sekundären Zielparameter der hepatischen Insulinsensitivität verglichen.

In Anlehnung an die epidemiologischen Analysen der Potsdamer EPIC-Studie sowie weitere Interventionsstudien, die einen positiven Einfluss auf die Ganzkörper- bzw. hepatische Insulinsensitivität durch das regelmäßige Konsumieren von Vollkorngetreideballaststoffen und Kaffee bei Patienten mit Typ 2 Diabetes zeigten (Cowan et al., 2014; Weickert et al., 2011), erwarteten wir einen signifikanten Anstieg der Ganzkörper- sowie der hepatischen Insulinsensitivität bei übergewichtigen Patienten mit Typ 2 Diabetes und einem BMI ≥ 30 kg/m² nach einer achtwöchigen, moderat kalorienreduzierten (-300 kcal pro Tag) getreideballaststoffreichen Ernährungsintervention mit Kaffee und dem Verzicht auf rotes Fleisch, unabhängig von der Gewichtsreduktion. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in der hier vorgestellten randomisierten, kontrollierten Studie standardisierte Untersuchungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Infusions- und Nährlösungen

- Isotonische Natriumchloridlösung 0,9% (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)
- Insulin (Insuman Rapid® 40 I.E./ml Injektionslösung in einer Durchstechflasche, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main)
- D-[6,6-²H₂]Glukoselösung (5 ml = 1 g D-[6,6-²H₂]Glukose; 10 ml = 2 g D-[6,6-²H₂]Glukose, Profil Institut für Stoffwechselforschung GmbH, Neuss, Deutschland)
- 20%ige Glukoselösung (Glucose 20%, 100 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

2.2. Verbrauchsmaterialien

- Blutbildröhrchen (BD Vacutainer® K2E 5,4 mg, Plus Blood Collection Tubes, REF 368499, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Citratröhrchen (BD Vacutainer® 9NCO.129M, REF 353079, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Serumröhrchen (BD Vacutainer® SST™II Advance Plus Collection Blood Tubes, REF 367955, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Urinröhrchen (BD Vacutainer®, REF 364915, BD Vacutainer Systems Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Urintransfereinheit (Vacutainer®, REF 364940, BD Vacutainer Systems Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ, USA)

- Sterile Urinbecher mit Schraubverschluss (Sarstedt®, 100 ml, REF 75.562.105, Sarstedt AG und Co. Medizin, Nümbrecht, Deutschland)
- Weithalsflaschen mit Schraubverschluss (Nalgene®, 2000 ml, REF 215-7361, Nalge Nunc International Corporation, NY, USA)
- Monozytenröhrchen (Cellstar® Tubes, 15 ml, Cat.-No. 188271, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Genröhrchen (PAXgene® Blood RNA tube, PreAnalytix, REF 762165, Hombrechtikon, Schweiz)
- Sicherheitsvenenpunktionsbesteck (Venofix® Safety, G21 (REF 4056520-01), G23 (REF 4056510-01), G25 (REF 4056500-01), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- *One-Use, Non-Stackable Needle Holder* (BD Vacutainer®, REF 364815, BD Vacutainer Systems Preanalytical Solutions, Franklin Lakes, NJ, USA)
- *Multi Sample Luer Adapter* (BD Vacutainer®, REF 367300, BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK)
- Sicherheitsvenenverweilkanülen (Vasofix® Safety, 18G (REF 4268130S-01), 20G (REF 4268113S-01), 22G (REF 4268091S-01), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Pflaster-Venenverweilkanüle (APPLICA I.V., REF 66047717, Smith & Nephew Medical, Hull, England)
- Pflasterrolle (Leukofix®, 2,5 cm x 9,2 m, REF 46834-00, BSN Medical GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Drei-Wege-Hähne (3-Way-Stopcock®, Fresenius Kabi AG, REF 8501722, Bad Homburg, Deutschland)
- Verschluss Drei-Wege-Hahn (Combi Stopper®, REF 4495101, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Blutlanzetten (Kendall, Monoject, Monolet Blood Lancets, REF 602018, Tyco/Healthcare, Gosport, UK)

- Spritzen 1/2/5/10 ml (Injekt® Luer Solo, REF 1 ml 9166017V, REF 2 ml 4606027V, REF 5 ml 4606051V, REF 10 ml 4606108V, B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland)
- Blutzuckermessgefäße (Glucose-/Lactat-Hämolyselösung, REF 0209-0100-012, EKF Diagnostik GmbH, Barleben/Magdeburg, Deutschland)
- 20 µl-Kapillare (Natrium-heparinisiert, EKF Diagnostik GmbH, Barleben/Magdeburg, Deutschland)
- Zelluloseputz (Maicell® 4x5 cm, REF 72100, MaiMed® Medical, MaiMed GmbH & Co KG, Neuenkirchen, Deutschland)
- Handschuhe (MaiMed®-sensitiv, REF 74185, MaiMed GmbH & Co KG, Neuenkirchen, Deutschland)
- Desinfektionsspray (Cutasept® F, REF 976802, Bode Chemie Hamburg, Deutschland)
- Händedesinfektionsmittel (Manusept® basic, REF 975612, Bode Chemie Hamburg, Deutschland)
- Kanülenabwurf (Multisave, Sarstedt AG und Co. Medizin, Nümbrecht, Deutschland)
- Infusionsbesteck (Infudrop®, REF 2886312, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland)
- Infusomateleitung (Original Infusomat®-Leitung, REF 8700036T, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Perfusorleitung (Original Perfusor®-Leitung, REF 872269/0, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Perfusorspritze (Original Perfusor®-Spritze OPS, 50 ml Luer Lock, REF 8728810F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Cryotubes für Blutproben (Cryovial® 1,2 ml (Art.Nr. 710511), 2,0 ml (Art.Nr. 710513), frei stehend, steril, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland)

- Probenröhrchen (1,5 ml, farblos, frei stehend, für Schraubverschlüsse, Art.Nr. 710020, Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland)
- Cap-Insert für Biozym Cryovials, rot (Art.Nr. 710533), gelb (Art.Nr. 710534), Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland)
- Schraubverschluss für Probenröhrchen, violett (Art.Nr. 710716), gelb (Art.Nr. 710714), grün (Art.Nr. 710033), blau (Art.Nr. 710716), Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland)
- EKG-Elektroden (Ambu[®], Blue Sensor UL, *Single Patient Use ECG Electrodes*, REF VL-00-5/25, Ambu A/S, Ballerup, Dänemark)
- *Double Size Electrodes for Bioelectrical Impedance Measurement* (BIANOSTIC AT[®], Data Input GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Pico50-Röhrchen (2 ml, REF 956.552, Radiometer Medical ApS, Bronshøj, Dänemark)
- Fluorid-Heparinat-Röhrchen (Sarstedt[®], 1,3 ml, REF 41.1394.005, Sarstedt AG und Co. Medizin, Nümbrecht, Deutschland)

2.3. Geräte und Software

- Blutglukosemessgerät (EKF Biosen C-Line, EKF Diagnostik GmbH, Barleben/Magdeburg, Deutschland)
- Infusomat (Infusomat[®] fm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Perfusor (Perfusor[®] compact, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kalorimetrie (Vmax[™] Encore 29n, VIASYS Healthcare, Höchberg, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich Rotixa 50 RS, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)

- Notebook (DELL Latitude E6500, Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland)
- Drucker (hp Laserjet CPI525n color, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen, Deutschland)
- Zeitmesser (Mesotron Quartz, Hanhart AG, Diessenhofen, Schweiz)
- Schrittzähler und Software „My Wellness Key“ (Technogym Wellness & Biomedical GmbH, Egelsbach, Deutschland)
- EKG-Gerät (MAC™ 1600, GE Medical Systems, Information Technologies GmbH, Freiburg, Deutschland)
- Phasensensitives Monofrequenz-Impedanzanalysegerät Nutrigard-S (Data Input GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Blutdruckmessgerät (OMRON 705 IT, REF 40 15672 10146, OMRON Medizintechnik, Mannheim, Deutschland)
- Kühlschranks (Liebherr Comfort, -20°C, Liebherr International AG, Bulle, Schweiz)
- Gefrierschranks (Thermo Scientific, -80°C, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)
- Personenwaage (seca® Modell 920, Fabr. Nr. 905740, seca AG, Reinach, Schweiz)
- Laserdoppler-Messgerät (O2C Lea Medizintechnik GmbH, Gießen, Deutschland)
- Dopplersonographie (En Virsor C HC, Phillips GmbH, Healthcare, Hamburg, Deutschland)
- Microsoft Office Professional Word 2010 und Excel 2010 (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA)
- Ernährungssoftware (PRODI® 5.8, Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland)
- GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

2.4. Bestimmungsmethoden

2.4.1. Messung der Blutglukosekonzentration

Die Bestimmung der Blutglukose wurde mit einem Messgerät der Firma EKF durchgeführt und erfolgte mittels Hexokinase-Methode: Durch das Enzym Hexokinase werden Hexosen und Adenosintriphosphat (ATP) zu Hexose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) umgesetzt. Das entstandene Glucose-6-Phosphat wird in Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺) zu D-Gluconat-6-Phosphat dehydriert. Gleichzeitig wird NADP⁺ zu Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) reduziert (Neeley, 1972). Die der D-Glukose äquivalente Stoffmenge NADPH kann mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden, da NADPH im Gegensatz zu NADP⁺ bei 340 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. Um Messungengenauigkeiten zu minimieren, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der jeweilige Mittelwert verwendet.

2.4.2. Messung der Konzentration der deuterierten Glukose

Die D-[6,6-²H₂]Glukose wurde mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)-Methode bestimmt. In einem ersten Schritt wurden die Proteine aus dem Plasma entfernt. Im weiteren Verlauf wurden die endogen gebildete Glukose und die exogen infundierte D-[6,6-²H₂]Glukose zu Pentaacetat derivatisiert (Beylot et al., 1993). Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie quantifiziert beide Massen und gibt diese als *Atom Percent Enrichment* (APE) aus. Nach Bestimmung der APEs und unter Berücksichtigung der infundierten Menge an D-[6,6-²H₂]Glukose wurde schließlich die EGP ermittelt.

2.4.3. Insulin und C-Peptid

Insulinkonzentrationen im Serum der Probanden wurden mittels Festphasen- und Enzym-markierter Chemilumineszenz-immunometrischer Assays (Insulin Immulite® 2000; Verwendung nach Herstellerangaben; Siemens Packungsbeilage) bestimmt. Die Festphase bestand aus Kugeln, die mit einem murinen monoklonalen Anti-Insulin-Antikörper beschichtet waren. Die Flüssigphase bestand aus einem polyklonalen (Schaf) und einem monoklonalen (Maus) Anti-Insulin-Antikörper, die beide mit alkalischer Phosphatase (Rind) konjugiert waren. Die Inkubationszeit betrug etwa 60 min. Das Insulin bildet in dieser Zeit einen Antikörper-Sandwichkomplex. Der Antikörper-Sandwichkomplex besteht dabei aus dem monoklonalen murinen Anti-Insulin-Antikörper der Kugeln und dem enzymkonjugierten polyklonalen Schaf-Anti-Insulin-Antikörper sowie dem enzymkonjugierten monoklonalen murinen Anti-Insulin-Antikörper aus dem Reagenz. Ungebundene Bestandteile und Enzymkonjugate wurden durch Waschschrte in der Zentrifuge entfernt. Abschließend wurde dem die Kugeln enthaltenden Reaktionsröhrchen Chemilumineszenz-Substrat hinzugefügt und proportional zum gebundenen Enzym nach etwa 65 min ein entsprechendes Signal generiert. Eine Hämolyse sollte bei Abnahme der Proben für die Insulin-Bestimmung unbedingt vermieden werden, da diese zu falsch-niedrigen Ergebnissen führen kann. Für die Bestimmung werden 100 µl Serum benötigt. Die Proben können bis zu drei Monate bei -20°C gelagert werden.

C-Peptid-Serumkonzentrationen wurden mittels Festphasen- bzw. Zweiphasen- Chemilumineszenz-immunometrischer Assays (C-Peptid Immulite® 2000; Verwendung nach Herstellerangaben; Siemens Packungsbeilage) bestimmt. Die Festphase bestand hier aus Kugeln, die mit einem monoklonalen Maus-Anti-C-Peptid-Antikörper beschichtet waren. Die Flüssigphase bestand aus einer alkalischen Phosphatase aus dem Rind, die mit einem monoklonalen Maus-Anti-C-Peptid-Antikörper in Pufferlösung konjugiert war. Probandenprobe, Reagenz und die beschichteten Kugeln wurden für 30 min inkubiert. Wie beim Insulin bildet das C-Peptid während der

Inkubationszeit einen Antikörper-Sandwichkomplex, bestehend aus monoklonalem Maus-Anti-C-Peptid-Antikörper der Kugeln und Enzym-konjugiertem Maus-Anti-C-Peptid-Antikörper aus dem Reagenz. Auch bei dieser Bestimmung wurden ungebundene Bestandteile und Enzymkonjugate durch einen Zentrifugationsschritt entfernt, das Chemilumineszenz-Substrat dem die Kugeln enthaltenden Reaktionsröhrchen zugefügt und das proportional zum gebundenen Enzym gebildete Signal nach ca. 35 min gemessen. C-Peptid-Proben können etwa eine Woche bei -20°C gelagert werden.

2.4.4. Freie Fettsäuren

Die Bestimmung der nicht-veresterten (freien) Fettsäuren (NEFA) im Serum erfolgte mittels eines enzymatischen Farbtests (Wako® NEFA-HR; Verwendung nach Herstellerangaben; Wako Packungsbeilage). Unter Mitwirkung von Coenzym A (CoA) und Adenosin-5-Triphosphat-Dinatriumsalz (ATP) werden NEFA in der Probe durch das Enzym Acyl-CoA-Synthetase (ACS) zu Acyl-CoA, Adenosinmonophosphat (AMP) und Phosphorsäure (PPi) umgesetzt. Das entstandene Acyl-CoA wird durch das Enzym Acyl-CoA-Oxidase (ACOD) zu 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Unter der Wirkung von 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -Hydroxyethyl)-Anilin (MEHA) sowie 4-Aminoantipyrin (4-AA) entsteht in Anwesenheit von Peroxidase (POD) durch oxidative Kupplung ein blau-violetter Farbkomplex. Die NEFA-Konzentration wurde durch eine Absorptionsmessung dieser blau-violetten Färbung bestimmt.

2.5. Studiendesign

Bei der DDIET-Studie, aus der diese Arbeit entstanden ist, handelt es sich um eine klinische, prospektive, kontrollierte, randomisierte und multizentrische Kurzzeit-Ernährungsinterventions-Studie mit zwei Untersuchungsarmen (Interventions-

gruppen A (Hoch-Risiko-Gruppe, H-Risiko) und B (Niedrig-Risiko-Gruppe, N-Risiko)) an Patienten mit der Neudiagnose des Typ 2 Diabetes mellitus.

Dafür wurden die Probanden zufällig einer der beiden Ernährungsinterventionsgruppen zugeordnet, die in gleicher Weise kalorienreduzierte Kost bekamen. Die Probanden der einen Gruppe verzichteten acht Wochen auf rotes Fleisch, sollten jedoch täglich Kaffee und Getreideprodukte mit hohem vorgegebenen Getreideballaststoffanteil konsumieren. Die Probanden der anderen Gruppe verzichteten auf Kaffee und Produkte mit hohem Getreideballaststoffanteil, sollten aber täglich rotes Fleisch in vorgegebener Menge zu sich nehmen.

Während der zweiwöchigen Vorbereitungsphase wurden die Probanden zwei Mal wöchentlich untersucht. Gemessen wurden der Blutdruck sowie Körpergewicht, Bauch- und Hüftumfang. Die Versuchsteilnehmer protokollierten Menge und Art der täglich konsumierten Nahrungszutaten sowie ihre tägliche körperliche Aktivität. Vor Beginn der Ernährungsumstellung fand eine dreitägige Untersuchungsreihe statt, um die Werte vor der Intervention zu erfassen. Anschließend begann die achtwöchige Ernährungsintervention. Währenddessen erfolgten im Rahmen von Visiten wöchentliche Kontrollen der Diätadhärenz mittels Analyse von Wiegeprotokollen, Blut- und Urin-Untersuchungen sowie anthropometrischen Messungen. Nach Beendigung der achtwöchigen Ernährungsintervention wurden die dreitägigen Untersuchungen erneut durchgeführt, um die Werte nach erfolgter Ernährungsumstellung zu bestimmen.

Für die Durchführung der Studie liegt eine Genehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf vor (Studiennummer 3521).

2.5.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen der DDIET-Studie wurden Patienten im Alter zwischen 18 und 69 Jahren mit neudiagnostiziertem Typ 2 Diabetes mellitus untersucht.

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über öffentliche Aushänge, Inserate in Zeitungen, Veröffentlichung der Studie auf der Internetseite www.diabetes-heute.de, niedergelassene Ärzte, die Stoffwechselambulanz der Universitätsklinik für Diabetologie und Endokrinologie des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie aus der *German Diabetes Center* (GDC)-Studie am Deutschen Diabetes Zentrum in Düsseldorf, die sich als prospektive Langzeitstudie mit der Bedeutung von Biomarkern sowie weiteren individuellen Faktoren zur Vorhersage und Behandlung Diabetes-assoziiierter Folgeerkrankungen bei Patienten mit neudiagnostiziertem Typ 1 bzw. 2 Diabetes befasst.

Die Probandeninformation wurde den interessierten potentiellen Probanden vorab zugesandt und anschließend ein *Screening*-Termin vereinbart. Beim *Screening*-Termin wurden ein weiteres Mal Sinn und Durchführung der Interventionsstudie erklärt und alle weiteren Fragen des Probanden beantwortet. Die *Screening*-Untersuchung erfolgte erst nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung. Während des *Screenings* wurden sowohl eine umfassende medizinische Anamnese und Laboruntersuchungen als auch eine körperliche Untersuchung durchgeführt. Im Einzelnen beinhaltete die *Screening*-Untersuchung Blutdruckmessungen, EKG, Bioimpedanzmessung (BIA), Erfassung von Körpergröße, Bauch- und Hüftumfang (jeweils in cm), Gewicht (in kg) und die Berechnung des *Body-Mass-Index* (BMI) (in kg/m^2). Des Weiteren wurde eine Blutentnahme zur Bestimmung von Blutbild (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC), HbA1c, Kreatinin, Leberwerten (ALT, AST), γ -GT, AP, Bilirubin, Laktatdehydrogenase (LDH), Blutfettwerten (Triacylglycerin, HDL- und LDL-Cholesterin), Eisenspiegel, Transferrinsättigung, Ferritin und Schilddrüsenhormonen (TSH, fT4) durchgeführt. Anhand des Spontanurins wurde zusätzlich untersucht, ob beim Probanden eine Mikroalbuminurie vorlag.

Um eventuell bestehende kardiale Erkrankungen erfassen zu können, wurde ein Ruhe-EKG (MACTM) geschrieben. Die Körperstellen für die Platzierung der Elektroden wurden mit Kontaktspray besprüht, anschließend erfolgte das Ansaugen der Elektroden mittels Unterdruck. Das EKG wurde mit einer Amplitude von 10 mm/mV

und einer Geschwindigkeit von 50 mm/s aufgezeichnet. Die Standardableitungen nach Einthoven, die Extremitätenableitungen nach Goldberger und die Brustwandableitungen nach Wilson wurden von einem Arzt ausgewertet. Bei der Auswertung wurden Herzfrequenz, Rhythmus, Lagetyp, Erregungsbildung, -ausbreitung sowie -überleitung beurteilt und in das Untersuchungsprotokoll eingetragen.

Mit Hilfe der bioelektrischen Impedanzanalyse (BIA) wurde die Körperzusammensetzung erfasst. Zur Bestimmung der Fettmasse wurden insbesondere die fettfreie Masse und der Gesamtwasseranteil gemessen. Die fettfreie Masse ist eine wichtige Größe bei der Berechnung der Insulinresistenz und zusätzlich für den Vergleich der interindividuellen Insulinresistenz in der Clamp-Untersuchung notwendig. Die Bioimpedanzmessung erfolgte mit Hilfe eines phasensensitiven Monofrequenz-Impedanzanalysegerätes. Gemessen wurde an nüchternen Probanden. Außerdem wurden die Probanden gebeten, vor der Untersuchung die Blase zu entleeren. Um ein gleichmäßig verteiltes Blutvolumen zu erreichen, sollten sich die Patienten unmittelbar vor der Messung auf die Untersuchungsfläche legen. Nachdem die entsprechenden Hautareale gereinigt worden waren, wurden vier Elektroden angebracht. Die Handelektroden wurden auf Höhe des Ulnarkopfes und über der Mitte der Grundgelenke der Finger befestigt. Die Fußelektroden wurden zwischen Außen- und Innenknöchel sowie auf Höhe der Grundgelenke der Zehen aufgebracht. Wichtig ist dabei, dass der Abstand der Elektroden mindestens 5 cm beträgt. Während der Messung wurde sichergestellt, dass sich der Proband nicht bewegte, sich Arme und Beine auf Körperhöhe befanden und der Proband keine Metallgegenstände berührte. Sämtliche Patientendaten wurden mit Hilfe der NutriPlus®-Software (Data Input, Pöcking, Deutschland) dokumentiert. An jedem Probanden wurden zwei Messungen durchgeführt. Anschließend wurde anhand der Ergebnisse der vorangegangenen *Screening*-Untersuchungen überprüft, ob der jeweilige Teilnehmer sämtliche Einschlusskriterien und keines der Ausschlusskriterien erfüllte, um an der Vorphase (*Run-In-Phase*) der Studie teilnehmen zu können. Die Randomisierung erfolgte mittels einer vorher festgelegten Block-Randomisierungsliste. Jedem eingeschlossenen Pro-

banden wurde der unmittelbar nächste freie Gruppencode (A oder B) auf der Randomisierungsliste des jeweiligen Blocks zugewiesen. Es wurde zudem darauf geachtet, dass zwischen der *Screening*-Untersuchung und dem Beginn der Intervention nicht mehr als 4 Wochen lagen.

2.5.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Die Diagnose des Typ 2 Diabetes mellitus sollte bei den Probanden der Studie vor maximal 5 Jahren gestellt worden sein und es sollte ein Übergewicht mit BMI-Werten ≥ 30 kg/m² vorliegen. Das Körpergewicht der Probanden sollte sich in den letzten zwölf Wochen nicht um mehr als 10% verändert haben. Der HbA1c-Wert sollte als Marker der durchschnittlichen Blutglukosekonzentration in den letzten acht bis zwölf Wochen zwischen 6,5 und 9,0% liegen. Als spezifische Diabetes-Therapie waren entweder nur eine Diät alleine und/oder eine Acarbose- und/oder Metformintherapie erlaubt. Andere orale Antidiabetika oder eine Insulintherapie galten als Ausschlusskriterien. Im Falle einer vorliegenden endokrinen Störung, die die Insulinsekretion und/oder Insulinsensitivität beeinträchtigte, war der Einschluss in die Studie nur erlaubt, wenn eine normale endokrine Funktion durch entsprechende Substitution bzw. Therapie erreicht wurde. Weitere Ausschlusskriterien waren sekundärer Diabetes mellitus, Diabetes-Folgeerkrankungen, maligne Erkrankungen, Schwangerschaft, chronische Herzinsuffizienz, chronische Niereninsuffizienz, Gicht, Immunsuppression, Infektionskrankheiten, HIV/AIDS, Autoimmunerkrankungen und immunologisch vermittelte Erkrankungen, Einnahme von Cortison oder anderen immunmodulatorischen Medikamenten, Einnahme von gerinnungshemmenden Medikamenten (Marcumar), Einnahme von Medikamenten aus der Gruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika, Indikation zur dauerhaften Einnahme von Aspirin (Z.n./oder Risiko für Apoplex, stentversorgte koronare Gefäßerkrankung), Epilepsie, Einnahme von Psychopharmaka (Antidepressiva, Neuroleptika) oder Suchterkrankungen (Alkohol, Drogenmissbrauch). Fehlende bzw. verminderte *Compliance*

war ein weiterer Ausschlussgrund. Im Falle einer akuten Entzündung und/oder einer Infektion konnte der Proband ebenfalls nicht an der Studie teilnehmen. Auch Studieninteressierte mit bekannten Allergien und einer Indikation zur dauerhaften Therapie mit Antihistaminika wurden aus der Studie ausgeschlossen.

2.5.3. Abbruchkriterien

Die Studie konnte jederzeit auf Wunsch des Probanden abgebrochen werden. Nichteinhaltung der Diät oder Verschlechterung der Diabeteskontrolle während der Intervention waren ebenfalls Kriterien für den Abbruch der Studie.

2.5.4. Vorphase (*Run-In-Phase*)

Als Vorphase wurden die zwei Wochen vor Diätbeginn bezeichnet. In dieser Phase fanden vier Visiten statt (V -4, V -3, V -2, V -1), wobei die erste Visite (V -4) zeitgleich mit der *Screening*-Untersuchung durchgeführt wurde. Ziel der Vorphase war es sicherzustellen, dass das Ausmaß der körperlichen Aktivitäten des Probanden und das Körpergewicht konstant blieben. Ab dem ersten Tag der Vorphase wurden die Bewegungen der Studienteilnehmer erfasst. Den Probanden wurde bei jeder Visite ein Bewegungsprotokoll (IPAQ®) ausgehändigt, das ausgefüllt zur nächsten Visite abgegeben wurde. Bei der Auswertung wurde ein Wert ermittelt, der als metabolisches Äquivalent (MET) bezeichnet wird. Ein MET entspricht dem Energieverbrauch einer Kilokalorie pro Kilogramm Körpergewicht in einer Stunde (Ainsworth et al., 1993; Ainsworth et al., 2000). Nach erfolgreichem Einschluss in die Studie bekam jeder Proband zusätzlich einen Schrittzähler, der alle zwei Wochen im DDZ mit der Wellness-Key® Software (Technogym Wellness & Biomedical GmbH) analysiert wurde.

Neben der Bewegung sollte auch die Ernährung protokolliert werden. Hierzu wurden den Probanden Ernährungsprotokolle ausgehändigt, in denen sie die verzehrte

Menge und die Art der Zubereitung der Getränke und Nahrungsmittel detailliert dokumentierten. Bei jeder Visite wurden das Körpergewicht (in kg) mit einer Personenwaage (seca® Modell 920) sowie Bauch- und Hüftumfang (in cm) mit einem Maßband gemessen. Zusätzlich wurde der Blutdruck (in mmHg) mit Hilfe des Blutdruckmessgeräts OMRON® 705 IT ermittelt. Bei einem Armumfang >32 cm wurde eine große Manschette verwendet. Aus dem aktuellen Körpergewicht und der Körpergröße (in m) wurde dann der BMI (in kg/m²) berechnet. Bei jeder Visite wurden den Probanden für die Urinproben ein Sammelurinbehälter (Nalgene®), drei Urinröhrchen (Vacutainer®) sowie eine Urintransfereinheit (Vacutainer®) ausgehändigt. Jeder Proband wurde gebeten, vor der Visite den Urin über 24 Stunden zu sammeln und die Sammelurinmenge zu dokumentieren. Die Urinproben wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Zusätzlich wurden bei jeder Visite insgesamt 8 ml Blut entnommen: 5 ml Serum und 3 ml EDTA-Blut wurden für zehn Minuten bei einer Temperatur von 4°C und mit 2800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotixa 50 RS). Danach wurden jeweils ein EDTA-Plasma- sowie ein Serum-Kryoröhrchen bei -20°C und jeweils eines bei -80°C gelagert.

Im Anschluss an die zweiwöchige Vorphase folgten vor Beginn der Diät die dreitägigen Basisuntersuchungen. Hier wurde auch der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp zur Messung der Ganzkörper-Insulinsensitivität durchgeführt.

2.5.5. Wöchentliche Visiten

Unmittelbar nach den dreitägigen Basisuntersuchungen wurde die achtwöchige Ernährungsintervention gestartet. Zur Kontrolle der Diäteeinhaltung wurden weiterhin wöchentliche Visiten durchgeführt. Wie in **Kap. 2.5.4.** für die Vorphase beschrieben, wurden auch in den Folgeuntersuchungen Blutdruck, Gewicht sowie Bauch- und Hüftumfang gemessen. Wichtig war, dass weder ein Gewichtsverlust von mehr als einem Kilogramm pro Woche noch eine Änderung der körperlichen Aktivität

festgestellt wurde. Bei jeder Visite wurden anhand der abgegebenen Protokolle die tagesdurchschnittlich aufzunehmende Nahrung (in kcal), Fett-, Eiweiß- und Kohlenhydratanteil (jeweils in %), Getreideballaststoffgehalt und die Fleischmenge (jeweils in g) berechnet.

Zur Diätadhärenzkontrolle wurden für die Bestimmung der Biomarker für Vollkorn- und Kaffeekonsum erneut 8 ml Blut entnommen und – wie in **Kap. 2.5.4.** beschrieben – verarbeitet. Die Urinproben wurden zur Kontrolle der verzehrten Fleischmenge für die Bestimmung von 1-Methylhistidin und Kreatinin vorgesehen. Nach der vierten Diätwoche wurde im Rahmen der Visite (V 4) auch der Eisenstatus überprüft. Dazu wurden Hämoglobin (Hb in g/dl), Eisen im Serum (in µg/dl), Transferrinsättigung (in %) und Ferritin (in µg/l) bestimmt. Diese Diagnostik sollte sicherstellen, dass die Diätintervention (insbesondere in Gruppe B bei Verzicht auf rotes Fleisch) keine Mangelzustände verursachte.

2.5.6. Ernährungspläne

Für die Erstellung der Ernährungspläne wurde unabhängig vom täglichen Kalorienbedarf der Probanden die durchschnittliche Tageskalorienzufuhr individuell mit Hilfe der vom Probanden ausgefüllten Ernährungsprotokolle aus der Vorphase sowie der Ernährungssoftware PRODI® 5.8 (Nutri-Science GmbH) (**Abb. 4**) ermittelt. Um die durchschnittliche Tageskalorienzufuhr jedes Probanden berechnen zu können, wurde die Kilokalorienmenge, die für die einzelnen Ernährungstagesprotokolle durch die PRODI®-Software ausgegeben wurde, addiert und durch die Anzahl der Tage dividiert. Für die Diätintervention wurden dann neue Protokolle erstellt, die 300 kcal pro Tag weniger enthielten als die durchschnittliche Tageskalorienzufuhr während der Vorphase. Diese individuelle Ziel-Kilokalorienmenge war Grundlage für die Ernährungspläne, die den Studienteilnehmern acht Wochen lang als Diätvorschrift ausgehändigt wurden.

#	Typ	Menge	Einheit	Synonym/Text	Code	Lebensmittel	g/E	[g]
1		150	Gramm	Toasties Weiz...	GOLDEN009	Toasties We...	1	150,0
2		40	Gramm	fitline 0,2% Krä...	KARWE014	fitline 0,2% K...	1	40,0
3		40	Gramm	Erdbeerkonfitü...	DFS209003	Erdbeerkonfi...	1	40,0
4		40	Gramm	Kochschinken...	ZIMBO002	Kochschink...	1	40,0
5		50	Gramm	FrühlingsQuar...	MILRAM028	FrühlingsQu...	1	50,0
6		120	Gramm	Rind Steak roh	U130100	Rind Steak r...	1	120,0
7		300	Gramm	Thai-Gemüse...	BOFR01073	Thai-Gemüs...	1	300,0
8		150	Gramm	ANANAS	P0401	ANANAS	1	150,0
9		150	Gramm	APRIKOSE	P0201	APRIKOSE	1	150,0
10		200	Gramm	MANGO	P04061	MANGO	1	200,0
11		10	Milliliter	Balsamicoessig	R125000	Balsamicoes...	1	10,0
12		10	Milliliter	OLIVENÖL	E0208	OLIVENÖL	1	10,0
13		250	Gramm	Fruchtjoghurt ...	BAUER063	Fruchtjoghur...	1	250,0
14		80	Gramm	Hühnerlei Volle...	E111100	Hühnerlei Vo...	1	80,0
15		150	Gramm	Eisbergsalat roh	G103100	Eisbergsalat ...	1	150,0
16		100	Gramm	GURKE	N0302	GURKE	1	100,0
17		60	Gramm	Karotte (Mohr...	G620100	Karotte (Mo...	1	60,0
18		80	Gramm	Bio-Mais, Bon...	BOND026	Bio-Mais, Bo...	1	80,0
19		80	Gramm	TOMATE	N0306	TOMATE	1	80,0
20		80	Gramm	Gemüsepaprik...	G543100	Gemüsepapr...	1	80,0

Abb. 4 Ausschnitt aus der Ernährungssoftware PRODI®.

Die Ernährungspläne der Teilnehmer aus Interventionsgruppe A sollten täglich mindestens 150 g rotes Fleisch enthalten, jedoch keine koffeinhaltigen Produkte, kein helles Fleisch bzw. Fisch und kein Vollkornbrot (**Abb. 5**). Die Getreideballstoffmenge sollte in dieser Gruppe maximal 10 g betragen. Die Ernährungspläne der Teilnehmer aus Interventionsgruppe B sollten hingegen täglich 30 - 50 g Getreideballstoffe, mindestens 5 Tassen Kaffee sowie weißes (Geflügel-) Fleisch oder Fisch enthalten, aber kein rotes Fleisch.

Proband: x Ernährungsplan: y Datum: z

Menge	g	Zutaten	EW ^a	F	KH ^a	Bst ^a	EUF ^a	MUF ^a	GFS ^a	kcal
			g	g	g	g	g	g	g	
150	Gramm	Toasties Weizen, Golden Toast	13,5	2	63	4,5			0,8	327
40	Gramm	fitline 0,2% Kräuter, Exquisa Frischkäse	4,4	0	2					25
40	Gramm	Erdbeerkonfitüre, Extra, Dr. Oetker	0,2	0	25	0,3	0,0	0,0	0,0	102
40	Gramm	Kochschinken, Zimbo	7,6	2	0					46
50	Gramm	Frühlingsquark Leicht, Milram	4,9	1	3					41
120	Gramm	Rind Steak roh	26,4	8	0	0,0	3,5	0,4	3,3	175
300	Gramm	Thai-Gemüsepfanne, beifrost	6,6	15	10	7,8			12,6	204
150	Gramm	ANANAS	0,7	0	19	1,5				82
150	Gramm	APRIKOSE	1,4	0	13	2,3				65
200	Gramm	MANGO	1,2	1	25	3,4				115
10	Milliliter	Balsamicoessig	0,0	0	2	0,0	0,0	0,0	0,0	10
10	Milliliter	OLIVEN ÖL		10						90
250	Gramm	Fruchtjoghurt 1,8% Pfirsich-Maracuja, Bauer	8,8	3	35					203
80	Gramm	Hühnerlei Vollei roh	9,5	7	1	0,0	3,8	1,5	2,7	110
150	Gramm	Eisbergsalat	1,5	0	2	1,6	0,0	0,2	0,0	20
100	Gramm	GURKE	0,6	0	2	0,5				12
60	Gramm	Karotte	0,5	0	4	1,8	0,0	0,1	0,0	20
80	Gramm	Bio-Mais, Bonduelle	2,5	1	17					91
80	Gramm	TOMATE	0,8	0	2	0,8				14
80	Gramm	Gemüsepaprika rot	1,0	0	5	2,9	0,0	0,2	0,1	30
Gesamt			91,9	53	230	27,4	7,3	2,4	19,5	1780

Nährstoffrelation

Energiewert 1780 kcal
7485 kj

	Menge	rel.
Eiweiß ^a	91,9 g	22 %
Fett	53 g	28 %
Kohlenhydrate	230 g	54 %

Abb. 5 Beispiel für einen Ernährungsplan der Probandengruppe A.

In beiden Gruppen wurde die gleiche Verteilung von Makronährstoffen berücksichtigt, d.h. 50% Kohlenhydrat-, 30% Fett- und 20% Proteinanteil an der gesamten Kilokalorienmenge. Tageskalorienzufuhr und Makronährstoffanteil durften um maximal 10% schwanken. Alle Nährwertangaben der PRODI®-Software bezogen sich auf den Bundeslebensmittelschlüssel (BLS).

Für jeden Studienteilnehmer wurden in der Regel vier, bei Bedarf auch mehr Ernährungspläne erstellt. Ernährungsgewohnheiten der Probanden fanden bei der Erstellung der Diätpläne Beachtung, und jeder Proband wurde wöchentlich befragt,

ob er Änderungen an den Ernährungsplänen wünscht. Ziel war eine optimale *Compliance*. Je nach Bedarf wurden den Studienteilnehmern wöchentlich Austausch-tabellen mit Alternativprodukten angeboten. Die Alternativprodukte enthielten äquivalente Kalorienmengen und Nährstoffanteile.

2.5.7. Messung des Effekts der Ernährungsintervention auf die Insulinsensitivität

Um den Effekt der achtwöchigen Ernährungsintervention auf die Insulinsensitivität überprüfen zu können, wurde der hyperinsulinämisch-euglykämische Clamp unmittelbar vor (Basisuntersuchung) und nach der Diät (Folgeuntersuchung) durchgeführt und der M-Wert als Maß für die Insulinsensitivität bestimmt.

Die während des hyperinsulinämischen Clamps zur Konstanterhaltung der Glukosekonzentration benötigte Glukoseinfusionsrate lässt Rückschlüsse auf die Ganzkörper-Insulinwirkung zu. Durch die exogene Insulinzufuhr kann sowohl die Insulin-konzentration während der verschiedenen metabolischen Phasen im Plasma als auch die Insulinaktivität unabhängig von der Sekretion der Beta-Zellen erfasst werden. Die Insulin-induzierte Glukoseverbrauchsrate ist dabei ein Maß für die Ganzkörper-insulinsensitivität und wird als M-Wert dargestellt (Roden, 2007). Für die Ermittlung des M-Wertes ist eine zwanzigminütige *Steady State*-Phase mit konstanter Glukosekonzentration im Plasma sicherzustellen. Der **M-Wert** lässt sich durch die Differenz aus der Glukoseinfusionsrate (GIR), dem Korrekturfaktor für die konstante Glukosekonzentration (SC) und dem Korrekturfaktor für den urinären Glukoseverlust (UC) berechnen (Roden, 2007):

$$M = GIR - SC - UC$$

Unter euglykämischen Bedingungen sollte in der Regel kein Glukoseverlust im Harn beobachtet werden. Bei Probanden, die an Diabetes leiden und bei denen die

Nüchternblutglukose hyperglykämisch ist, kann es jedoch zu einer Glukosurie kommen. Für die Ermittlung der ausgeschiedenen Glukosemenge wird der Urin dieser Probanden während des gesamten Clamps gesammelt, nachdem vor Beginn des Versuchs die Blase entleert wurde. Durch die konstante Plasmaglukosekonzentration ist mit einem gleichmäßig verteilten Harn-Glukose-Verlust während des gesamten Clamps zu rechnen.

Der **Korrekturfaktor für die Glukoseinfusionsrate** lässt sich ebenfalls rechnerisch ermitteln. Dazu wird die Differenz aus der Glukosekonzentration zu Beginn (G1) und am Ende (G2) der zwanzigminütigen *Steady State*-Phase mit dem Faktor 10 multipliziert, um die Einheit der Glukosekonzentration von mg/dl in mg/l umzuformen. Anschließend wird das Ergebnis mit dem Glukoseverteilungsraum (0,19 l/kg Körpergewicht) multipliziert und zum Schluss durch die zwanzig Minuten dividiert. Der Korrekturfaktor (SC) wird in mg/kg/min angegeben:

$$SC = ((G2 - G1) \cdot 10 \cdot 0,19) / 20$$

Die Glukosekonzentrationen G1 und G2 sollten in einem genauen zwanzigminütigen Abstand gemessen werden (Roden, 2007). Der Zeitpunkt des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps, an dem der M-Wert berechnet wird, ist zwar nicht fest definiert, es gibt jedoch Präferenzen. Ferrannini und Mari publizierten die letzten 40 oder 60 Minuten des zweistündigen Clamps als die beste Zeit, um den Durchschnitt des M-Wertes zu ermitteln (Ferrannini and Mari, 1998). Nach Bokemark et al. ist die 60. bzw. 120. Minute nach Beginn der Insulininfusion ebenfalls ein adäquater Zeitpunkt für die Berechnung des M-Wertes (Bokemark et al., 2000).

Um die M-Werte verschiedener Probanden miteinander vergleichen zu können, müssen diese standardisiert sein. Die Standardisierung des M-Wertes kann unter Berücksichtigung des Körpergewichts, der freien Fettmasse, des Energieverbrauchs in Ruhe oder der Insulin-Konzentration während der *Steady State*-Phase des Clamps erfolgen

(Bergman et al., 1985; Ferrannini and Mari, 1998). Aufgrund der unterschiedlichen Fettmasse bei Frauen und Männern wird empfohlen, bei der Standardisierung des M-Wertes die freie Fettmasse zu berücksichtigen. Bokemark et al. weisen außerdem darauf hin, dass der auf das Körpergewicht bezogene M-Wert bei Übergewichtigen zu falschen Werten führt (Bokemark et al., 2000). Für die Vergleichbarkeit der M-Werte ist es außerdem wichtig, identische Zeitpunkte für die Berechnung zu wählen.

Bei einem gesunden normalgewichtigen Menschen liegt der M-Wert bei $8,6 \pm 1,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Ravussin et al., 1983). Ferrannini et al. ermittelten für gesunde normalgewichtige Personen einen M-Wert von $7,1 \pm 2,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Ferrannini et al., 1997). Bei Typ 2 Diabetes-Patienten mit einer schlechten Blutglukosekontrolle wurden Werte von $2,7 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ beziehungsweise $2,9 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ angegeben (Anderwald et al., 2002; Doberne et al., 1982). Bei Typ 2 Diabetes-Patienten mit gut eingestellter Blutglukose liegt der M-Wert hingegen bei $4,7 \pm 1,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Bavenholm et al., 2001).

Des Weiteren sind zwei Methoden für die Erfassung der hepatischen Glukosefreisetzung etabliert. Während des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps stellt die sogenannte Glukose-Isotopen-Verdünnungstechnik die Methode der Wahl dar, denn sie ist leicht anzuwenden. Im *Steady State* wird vorausgesetzt, dass die endogene Glukoseproduktion (*Rate of appearance, Ra*) und die Glukoseaufnahme (*Rate of disappearance, Rd*) genau übereinstimmen. Dafür sorgt die kontinuierliche Infusion eines stabilen Tracers. Der Glukose-Input des Gesamtkörper-Glukosepools setzt sich aus der endogenen Glukoseproduktionsrate und der Infusionsrate des Glukosetracers zusammen (**Abb. 6**).



Abb. 6 Glukose-Input des Gesamtkörper-Glukosepools.

Die Infusion der deuterierten Glukose, die sich aus einer 0,9%-igen NaCl-Lösung und D2-Glukose zusammensetzt, wird als Tracerglukose bezeichnet. Der Gesamtglukosepool lässt sich aus den Infusionsraten der unmarkierten Glukose (in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) und der infundierten Tracerglukose (in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) berechnen. Das dimensionslose Verhältnis dieser beiden Glukoseanteile wird als *Tracer-to-Tracer Ratio (TTR)* ausgedrückt:

$$TTR = \text{Tracerglukose} / \text{unmarkierte Glukose}$$

Für die Bestimmung der EGP werden die Werte für Glukose-Infusionsrate, D2-Glukose-Infusionsrate, TTR und *Atom Percent Enrichment* der D2-Glukose im Infusat benötigt (Hother-Nielsen et al., 1996; Steele et al., 1956). Alternativ kann auch die Katheterisierung einer hepatischen Vene durchgeführt werden, um in hepatischen Blutproben die Netto-Bilanz des Glukose-Stoffwechsels in der Leber zu ermitteln (Roden, 2007).

Zu beachten ist, dass üblicherweise die Glukose-Verwertung bei Patienten mit Diabetes und bei Personen mit gestörter Glukose-Toleranz trotz erhöhter Insulinkonzentration geringer ist als bei Gesunden (Kolterman et al., 1981).

Die hepatische Glukose-Freisetzung ist bei Personen, die normalgewichtig und gesund sind, während des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps vollständig

gehemmt. Bei gestörter Glukose-Toleranz, Typ 2 Diabetes mellitus oder erhöhten BMI-Werten ist dies in der Regel nicht der Fall, sodass hier die hepatische Glukoseabgabe gemessen werden sollte (Roden, 2007).

Im Falle einer unzureichenden Suppression der EGP durch eine (hepatische) Insulinresistenz muss die EGP oder die Freisetzung von Glukose durch die Glykogenolyse bei der Berechnung des M-Wertes berücksichtigt werden, da die Glukoseinfusionsrate in diesem Fall nicht den gesamten Glukosemetabolismus des Körpers widerspiegelt. Der M-Wert würde dann aus einer fehlerbehafteten Glukoseinfusionsrate ermittelt (Roden, 2007). Da sowohl eine gestörte Glukosetoleranz als auch Typ 2 Diabetes mellitus ebenso wie Übergewicht mit einer Insulinresistenz einhergehen, könnte je nach Ausprägung der Insulinresistenz dann die vollständige Insulin-induzierte Hemmung der hepatischen Glukoneogenese nicht erreicht werden (Roden, 2007). Eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren und Triacylglycerin im Serum oder ein hoher Fettgehalt in der Leber können die Insulin-induzierte Hemmung der Glukoseproduktion zusätzlich verringern (Boden et al., 2002).

2.5.8. Vorbereitung des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps

Vor der Untersuchung durfte der Proband über mindestens zehn Stunden keine Nahrung und keine Medikamente zu sich nehmen. Mindestens drei Tage vor der Untersuchung sollte Metformin und/oder Acarbose abgesetzt worden sein. Ebenfalls sollte der Proband an den drei Tagen vor der Untersuchung keine mittelschwere bis schwere körperliche Aktivität von mehr als einer Stunde Dauer durchgeführt haben. Es wurden folgende Materialien bereitgestellt: die im Voraus mit Etikett beklebten und beschrifteten Blutröhrchen, der Notfallwagen mit EKG und Defibrillator, eine Stoppuhr (Mesotorn Quartz), ein Stauschlauch, eine Sicherheitsvenenverweilkanüle (Vasofix Safety®), Injekt® Einmalspritzen in verschiedenen Größen (2, 5, 10, 20 ml), Drei-Wege-Hahn (3-Way-Stopcock®), Pico50-Röhrchen für die Blutgasanalyse (Radiometer Mecial ApS) und ein Fluorid-Heparinat-Röhrchen (Sarstedt®). Zusätzlich

sollte sich eine Wanduhr im Untersuchungsraum befinden. Vor der Untersuchung wurde der Proband gebeten, die Blase zu entleeren. Die für die Analysen notwendigen Messgrößen wie Körpergewicht (in kg) und Körpergröße (in cm) wurden bestimmt und die Körperoberfläche (in m²) nach Dubois berechnet:

$$\text{Körperoberfläche} = \text{Körpergewicht} \cdot \text{Körpergröße} \cdot 0,007184$$

Des Weiteren wurden für die Durchführung des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps folgende Infusionen vorbereitet:

❖ **D-[6,6-²H₂]Glukose in 0,9% NaCl**

Aus einer 500 ml-Flasche mit 0,9%igem NaCl (Fresenius Kabi) wurden 10 ml entnommen und verworfen. In einem nächsten Schritt wurden 10 ml D-[6,6-²H₂]Glukose-Lösung (Profil GmbH Neuss) zu den verbliebenen 490 ml 0,9%iger NaCl-Lösung hinzugegeben. Durch Hinzufügen der D-[6,6-²H₂]Glukose-Lösung, in der 2 g D-[6,6-²H₂]Glukose enthalten waren, wurde eine Endkonzentration von 0,4% D-[6,6-²H₂]Glukose in einer 0,9%igen NaCl-Lösung erreicht. Die Flasche wurde mit „D2INF“ beschriftet und durch acht- bis zehnmaliges Schwenken um 180° gut durchmischt. Anschließend wurde eine Infusomat[®]-Leitung angeschlossen. Die ersten ca. 10 ml Lösung wurden nach Einlauf in das System verworfen. Aus dem Ende des Infusionssystems wurden dann 0,5 ml Infusat zu einem Infusatröhrchen ohne Zusatz hinzutropft. Das Röhrchen wurde zusammen mit anderen Röhrchen auf Eis gelagert und anschließend bei -20°C eingefroren. Die Infusomatleitung wurde schließlich in den Infusomaten (Infusomat[®]) eingelegt. Bei Bedarf wurde eine zweite Infusionsflasche vorbereitet, allerdings mit 5 ml D-[6,6-²H₂]Glukose (1 g) und 245 ml 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Berechnung der Infusionsraten für den „D2INF“-Bolus und die kontinuierliche Infusion erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\mathbf{10\text{-Minuten-Bolus D2INF [ml/h] = 0,06 \cdot \text{Körpergewicht [kg]} \cdot \text{Nüchtern-Blutglukose [mg/dl]}}$$

$$\mathbf{Kontinuierliche D2INF [ml/h] = 0,54 \cdot \text{Körpergewicht [kg]}}$$

❖ 20%ige Glukose-Lösung mit D-[6,6-²H₂]Glukose

Aus einer 500 ml-Flasche mit 20%iger Glukose-Lösung (B. Braun) wurden 10 ml entnommen und verworfen. Zu den restlichen 490 ml 20%iger Glukose-Lösung wurden 10 ml D-[6,6-²H₂]Glukose hinzugegeben (Endkonzentration: 2% D-[6,6-²H₂]Glukose) und wie oben beschrieben gut durchmischt. Die Flasche wurde mit „HG20“ beschriftet und an eine Infusomatleitung angeschlossen. Die ersten 10 ml der Lösung durchliefen das System und 0,5 ml Infusat wurden aus dem Ende des Infusionssystems zu einem Infusatröhrchen ohne Zusatz hinzutropft. Das Röhrchen wurde zusammen mit anderen Infusatröhrchen auf Eis gelagert und anschließend bei -20°C eingefroren. Zum Schluss wurde die Infusomatleitung in den Infusomaten eingelegt. Bei Bedarf wurde eine weitere Flasche mit halber Menge vorbereitet.

❖ Insulin-Infusion

In einer Perfusorspritze wurden 39 ml 0,9%ige NaCl-Lösung und 1 ml Rapidinsulin (Insuman Rapid®) mit 40 Insulineinheiten (IE) vereint (Endkonzentration: 1 IE/ml). Die Perfusorspritze mit der Insulin-Lösung wurde verschlossen und gut durchmischt. Anschließend wurde eine Perfusorleitung angeschlossen. Die Berechnung der Infusionsraten für den Insulin-Bolus und die kontinuierliche Insulin-Infusion erfolgte nach folgenden Formeln:

$$\mathbf{10\text{-Minuten-Insulin-Bolus [ml/h] = 0,6 \cdot \text{Körpergewicht [kg]}}$$

$$\mathbf{Kontinuierliche Insulin-Infusion [ml/h] = 0,09 \cdot \text{Körpergewicht [kg]}}$$

2.5.9. Durchführung des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps

Zu Beginn des Clamps wurde eine Sicherheitsvenenverweilkanüle (Vasofix® Safety) am linken Arm des Probanden angelegt. Die erste Blutentnahme erfolgte vor Beginn der deuterierten Glukoseinfusion in Minute -120. Dabei wurden dem Probanden 35,5 ml Blut für die Bestimmung von Insulin bzw. C-Peptid, Monozyten, Metaboliten, Immunmediatoren, freien Fettsäuren, Triacylglycerin, D-[6,6-²H₂]Glukose, Ethanol, Kalium, des Blutbilds und der Genexpression entnommen. Zu den Röhrcchen für Monozyten (Cellstar®) wurde Natrium-EDTA, zu den Röhrcchen für Metaboliten (Vacutainer®) Kalium-EDTA und zu den Röhrcchen für freie Fettsäuren und Triacylglycerin Na-EDTA und Orlistat hinzugefügt. Die für die Kaliumbestimmung vorgesehenen Röhrcchen wurden mit Heparinplasma befüllt. Das Blutbildröhrcchen wurde mit EDTA vorbereitet. Die Genexpressions-Röhrcchen (PAXgene®) enthielten ein Additiv, das die zirkulierende RNA im Blut stabilisiert. Zu den Röhrcchen für die Bestimmung von D-[6,6-²H₂]Glukose wurden Kalium-Fluorid und EDTA hinzugefügt. Für die Blutgasanalyse wurden Pico50-Röhrcchen (Radiometer Medical ApS) verwendet. Der Wert für Hämoglobin sollte bei Frauen über 11 g/dl und bei Männern über 13 g/dl sowie für Hämatokrit bei über 36% liegen. Der Mittelwert für den Blutzucker wurde ebenfalls ermittelt. Waren die notwendigen Kriterien erfüllt, so wurde ein Drei-Wege-Hahn (3-Way-Stopcock®) und die „D2INF“-Infusion an die Venenverweilkanüle angeschlossen. Die berechnete Bolusrate wurde am Infusomaten eingestellt und die Infusion gestartet. Die Stoppuhr wurde auf zehn Minuten eingestellt. Nach zehn Minuten erfolgte die Umstellung auf die kontinuierliche Infusionsrate, die bis zum Versuchsende unverändert blieb.

Anschließend erfolgte die Anlage einer Sicherheitsvenenverweilkanüle am rechten Arm, um die „D2INF“-Infusion auf diesen zu verlagern. Des Weiteren wurde für die häufigen Blutentnahmen ein Drei-Wege-Hahn am linken Arm angeschlossen. Die NaCl-Infusion wurde mit langsamer Infusionsgeschwindigkeit gestartet, damit die

Braunüle für die Blutentnahmen durchgängig blieb. In Minute -30 erfolgte die nächste Blutentnahme aus der Braunüle am linken Arm. Es wurden 1,5 ml Blut für die Bestimmung von D-[6,6-²H₂]Glukose und der Blutglukosekonzentration entnommen. Zur Minute 0 – also 2 Stunden nach Beginn der „D2INF“-Infusion – wurden noch einmal 4,5 ml Blut abgenommen, um Insulin bzw. C-Peptid, freie Fettsäuren und Triacylglycerin, D-[6,6-²H₂]Glukose sowie die Blutglukosekonzentration zu bestimmen. Von Minute 2 bis 8 wurden in zweiminütigen Abständen jeweils 2,5 ml Blut entnommen. Von den 2,5 ml wurden 2 ml für die Insulin- bzw. C-Peptid-Bestimmung und 0,5 ml zur Messung der Blutglukosekonzentration benötigt. Zur Minute 10 wurden 3,5 ml Blut abgenommen, um hier außer Insulin bzw. C-Peptid sowie Blutzucker auch die D-[6,6-²H₂]Glukose zu bestimmen. Nach weiteren 10 Minuten erfolgte eine zusätzliche Entnahme von 3,5 ml Blut. Diese wurden auf die Röhrchen für Insulin- bzw. C-Peptid- und die Bestimmung der freien Fettsäuren und Triacylglycerin verteilt. 0,5 ml davon wurden für die Messung der Blutglukosekonzentration verwendet. Zur Minute 30 wurden erneut 2,5 ml Blut für die Insulin- bzw. C-Peptid- sowie die Blutglukosekonzentrationsbestimmung abgenommen. Zur Minute 30 und 40 wurden 3,5 ml Blut für die Bestimmung von Insulin bzw. C-Peptid, D-[6,6-²H₂]Glukose sowie der Blutglukosekonzentration entnommen, zur Minute 60 weitere 4,5 ml, um Insulin bzw. C-Peptid, D-[6,6-²H₂]Glukose, freie Fettsäuren, Triacylglycerin und die Blutglukosekonzentration zu bestimmen.

Der Clamp begann zur Minute 60. Um eine insulininduzierte Hypokaliämie während des Clamps zu verhindern, wurde bei einem Kaliumwert von <3,5 mmol/l eine Kalinor[®]-Brausetablette verabreicht. Dann wurde die berechnete Bolusrate für die Insulininfusion am Perfusor (Perfusor[®] compact) eingestellt. Nach etwa 10 Minuten erfolgte die Umstellung auf die kontinuierliche Infusionsrate bis zum Versuchsende (Minute 240). Insulin bzw. C-Peptid wurden zu den Minuten 210, 220, 230 und 240 bestimmt. Blutproben für die Bestimmung von freien Fettsäuren und Triacylglycerin sowie D-[6,6-²H₂]Glukose wurden zu den Minuten 120, 180, 210, 220, 230 und 240 abgenommen. Die 20%ige Glukoseinfusion mit D-[6,6-²H₂]Glukose („HG20“-Infusion)

wurde ab Clamp-Beginn (Minute 60) abhängig von der Konzentration der Blutglukose verabreicht und entsprechend protokolliert. Die Infusionsgeschwindigkeit richtete sich nach der Blutglukosekonzentration. Im Rahmen des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps sollte eine Blutglukosekonzentration von 90 mg/dl gehalten werden. Dabei waren Schwankungen der Glukosekonzentration um 5 mg/dl erlaubt. Sie sollte dabei allerdings 70 mg/dl nicht unter- und 120 mg/dl nicht überschreiten. Versuchsende war in der Regel nach Minute 240. Der Clamp konnte um maximal 30 Minuten verlängert werden, falls die Blutglukosekonzentration bis Minute 240 keine ausreichend konstante Phase (*Steady State*) erreichte. Die Insulin- und „D2INF“-Infusionen wurden zur Minute 240 gestoppt; die „HG20“-Infusion lief 30 Minuten länger, nun aber (im Gegensatz zum Clamp) mit doppelter Geschwindigkeit. Es erfolgte eine venöse Kontrolle der Blutglukosekonzentration etwa 30 Minuten nach Ende der Insulininfusion. Bei einer Konzentration von >100 mg/dl wurde die Glukoseinfusion beendet und beide Braunülen wurden entfernt. Anschließend bekam der Proband eine kohlenhydratreiche Mahlzeit. Zur Minute 300 wurden das Blutbild und die Kalium-Werte kontrolliert. Bei einem Kalium-Wert <3,5 mmol/l bekam der Proband eine Kalinor®-Brausetablette. Nach der Mahlzeit wurde die Blutglukosekonzentration erneut gemessen. Sie sollte nun >80 mg/dl betragen und in den letzten 30 Minuten keinen Abfall von ≥ 50 mg/dl aufweisen. Waren diese Kriterien erfüllt, konnte der Proband das Studienzentrum verlassen. Die gesammelten Proben-Röhrchen wurden anschließend wie folgt versorgt: Proben für die Bestimmung von Monozyten, Genexpression, Kalium, Ethanol sowie die Proben für die Blutbild-Bestimmung wurden unmittelbar nach der Blutentnahme zur Weiterverarbeitung ins Labor gebracht. Insulin- bzw. C-Peptid-Röhrchen konnten bei Raumtemperatur gelagert werden. Die *Metabolomics*-Röhrchen wurden sofort verarbeitet und bei -80°C gelagert. Proben für die Bestimmung von Immunmediatoren, freier Fettsäuren, Triacylglycerin und D-[6,6-²H₂]Glukose wurden zunächst auf Eis gelagert. Während des Versuchs wurden die Proben für 10 Minuten mit 2800 Umdrehungen pro Minute bei 4°C zentrifugiert (Hettich Zentrifuge, Rotixa 50 RS). Der Überstand wurde

sorgfältig abgenommen und versorgt. Proben für die Bestimmung der freien Fettsäuren und der *Metabolomics* wurden hingegen zweifach versorgt; die restlichen Röhrchen wurden einfach versorgt und bei -20°C gelagert.

2.5.10. Durchführung der Fluss-medierten Dilatation

Die Messungen der Fluss-medierten Dilatation (FMD) der Arteria brachialis und der kutanen Mikrozirkulation in Ruhe und unter reaktiver Hyperämie nach Oberarmstau sowie nach Gabe von Glyzeroltrinitrat (Nitrolingual®) als Positivkontrolle am rechten Arm erfolgten in den 30 Minuten zwischen Minute -120 und -90 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps. Die FMD-Messung erfolgte mit dem Messgerät En Visor C HC von Phillips. Die Blutflussmessung der A. brachialis wurde ebenfalls zwischen Minute -120 und -90 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps durchgeführt. Es wurde das Messgerät O2C der Firma LEA Medizintechnik® verwendet.

2.5.11. Durchführung der indirekten Kalorimetrie

Zwischen Minute -90 und -60 des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps wurde die kontinuierliche Messung des produzierten CO₂ und O₂ unter definierter Sauerstoffzufuhr im Atemzelt durchgeführt. Die Messung der indirekten Kalorimetrie erfolgte mittels Vmax™ Encore 29n zur Bestimmung des Energieumsatzes in Ruhe.

2.5.12. Durchführung des Langzeit- Elektrokardiogramms

Zur Ermittlung von neuropathischen Veränderungen erfolgte während des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps eine Langzeit-Elektrokardiogramm (EKG)-Aufzeichnung. Dabei wurden EKG-Elektroden (Ambu® Blue Sensor VL) an die vordere Brustwand des Probanden angebracht und diese an das Langzeit-EKG-Gerät ELA Medical angeschlossen.

2.6. Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Arbeit wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's *t*-Test berechnet. P-Werte unterhalb von 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Einschluss der Probanden

Insgesamt wurden 216 potentielle Probanden kontaktiert (**Abb. 7**). Davon haben sich 86 Probanden einer *Screening*-Untersuchung unterzogen. Die restlichen 130 kontaktierten Personen konnten aufgrund von zutreffenden Ausschlusskriterien (Komorbiditäten, vom Studiendesign nicht akzeptierte Therapieformen, BMI und HbA1c außerhalb der vorgegebenen Grenzwerte) nicht eingeschlossen werden. Nach Durchführung der *Screening*-Untersuchungen wurden weitere 27 Probanden aufgrund der im *Screening* festgestellten Ausschlusskriterien exkludiert. Somit konnten 59 Probanden randomisiert werden, wobei 29 Teilnehmer der Gruppe A (Hoch-Risiko-Gruppe, H-Risiko) und 30 Teilnehmer der Gruppe B (Niedrig-Risiko-Gruppe, N-Risiko) zugeteilt wurden. Nach der Randomisierung und noch vor Beginn der Ernährungsintervention wurden 8 weitere Probanden aufgrund mangelnder *Compliance* ausgeschlossen. Weitere 14 Probanden wurden während bzw. nach Abschluss der Ernährungsintervention aus der Studie exkludiert – wegen Glukokortikoideinnahme, Beendigung der Metformintherapie während der Ernährungsintervention oder wegen einer Hypoglykämie während des hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamps. Bei der Auswertung der Gesamtkörper-Insulinsensitivität wurden 37 Probanden berücksichtigt, davon 20 aus der H-Risiko- und 17 aus der N-Risiko-Gruppe. In die Auswertung der hepatischen Insulinsensitivität gingen 19 Probanden der H-Risiko- und 17 Probanden der N-Risiko-Gruppe ein. Bei einem Probanden der H-Risiko-Gruppe konnte aufgrund einer nicht vorhandenen Probe die Messung der deuterierten Glukose nicht durchgeführt werden.

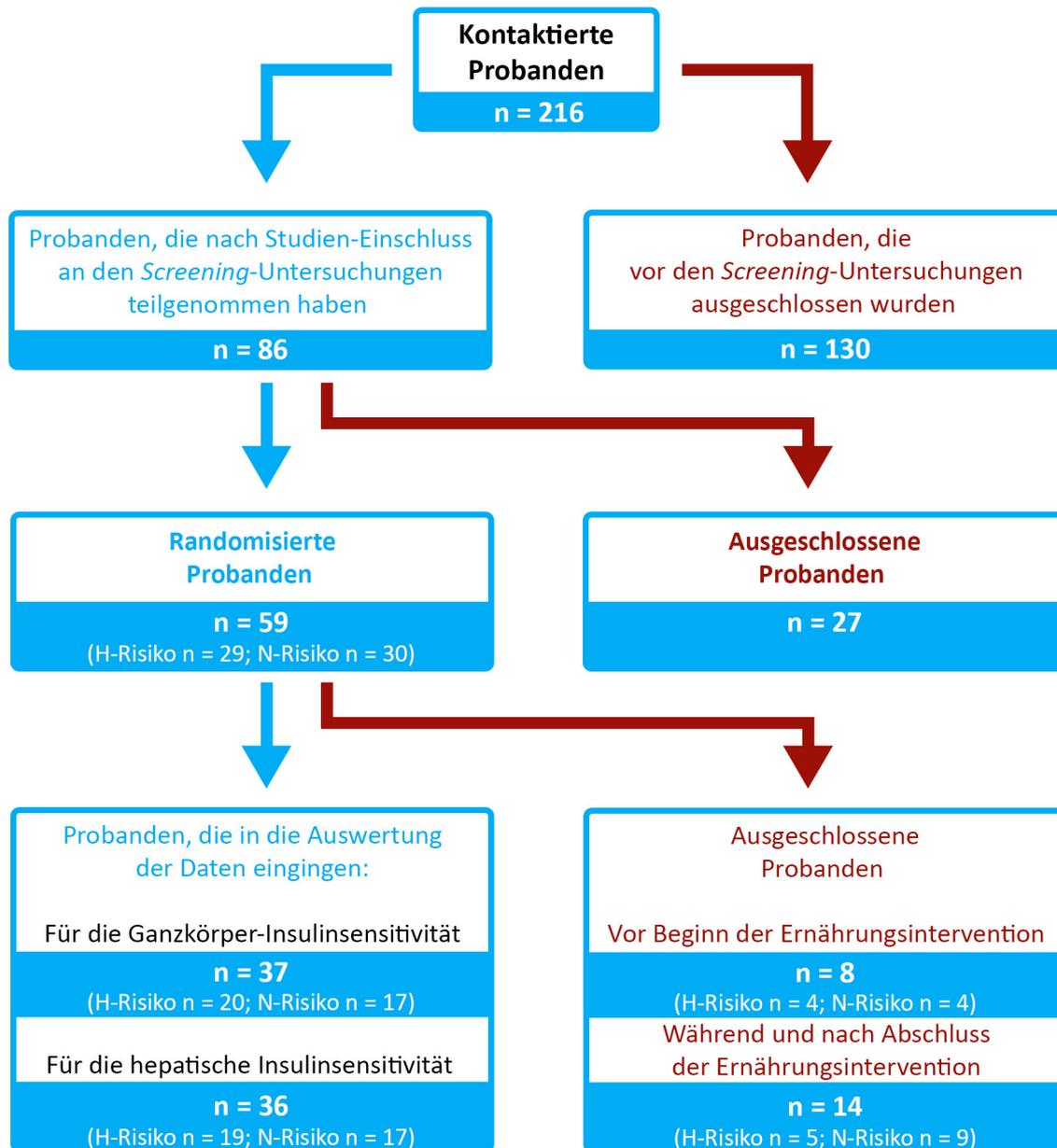


Abb. 7 Übersicht über den Probandeneinschluss in die DDIET-Studie. H-Risiko = Hoch-Risiko (Gruppe A); N-Risiko = Niedrig-Risiko (Gruppe B).

In der Niedrig-Risiko-Gruppe nahmen die Probanden täglich 30 - 50 g Getreideballaststoffe und ≥ 5 Tassen Kaffee zu sich, aber kein rotes Fleisch (niedriges Risiko gemäß DRS). In der Hoch-Risiko-Gruppe wurden täglich ≥ 150 g rotes Fleisch verzehrt,

mit Verzicht auf Kaffee und Vollkornprodukte (hohes Risiko gemäß DRS). Die Makro-nährstoffe verteilten sich dabei auf 50% Kohlenhydrate, 30% Fett und 20% Proteine.

Vor und nach der Ernährungsintervention wurde ein hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp mit deuterierter Glukose zur Bestimmung der Ganzkörper-Insulinsensitivität (M-Wert) und der hepatischen Insulinsensitivität (insulinvermittelte EGP-Suppression) durchgeführt.

3.2. Ganzkörper-Insulinsensitivität

Die Ganzkörper-Insulinsensitivität (M-Wert) war vor Beginn der Ernährungsintervention in Gruppe A und B vergleichbar ($5,13 \pm 0,49 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in der Hoch-Risiko-Gruppe gegenüber $5,47 \pm 0,37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in der Niedrig-Risiko-Gruppe).

Nach acht Wochen (Abschluss der Ernährungsintervention) war die Ganzkörper-Insulinsensitivität hingegen in beiden Gruppen angestiegen: in der Hoch-Risiko-Gruppe um $27 \pm 10\%$ von $5,13 \pm 0,49$ auf $6,02 \pm 0,45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Mittelwert \pm SEM, $p < 0,01$) und in der Niedrig-Risiko-Gruppe um $23 \pm 7\%$ von $5,47 \pm 0,37$ auf $6,42 \pm 0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Mittelwert \pm SEM, $p < 0,05$) (**Abb. 8**). Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich jedoch kein Unterschied im Anstieg der Ganzkörper-Insulinsensitivität (Anstieg um $27 \pm 10\%$ des Ausgangswertes in der Hoch-Risiko-Gruppe gegenüber $23 \pm 7\%$ in der Niedrig-Risiko-Gruppe).

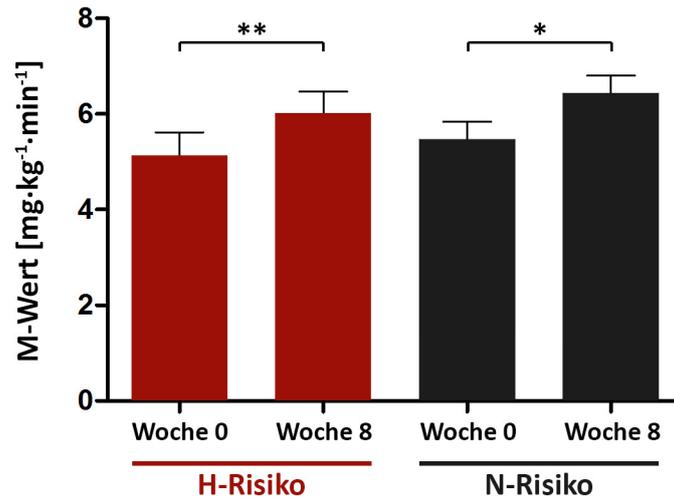


Abb. 8 Änderungen der Ganzkörper-Insulinsensitivität (M-Werte) aus dem hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp vor Beginn und nach Abschluss der Ernährungsintervention. $n = 20$ in der Hoch-Risiko-Gruppe und $n = 17$ in der Niedrig-Risiko-Gruppe. Die Ganzkörper-Insulinsensitivität wurde in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen. Änderungen wurden mittels Student's t -Test für gepaarte Proben innerhalb einer Gruppe analysiert. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

3.3. Hepatische Insulinsensitivität

Die hepatische Insulinsensitivität (gemessen als insulinvermittelte EGP-Suppression im Clamp in %) war vor Beginn der Ernährungsintervention in Gruppe A und B vergleichbar ($79 \pm 3\%$ in der Hoch-Risiko-Gruppe gegenüber $82 \pm 5\%$ in der Niedrig-Risiko-Gruppe).

Nach acht Wochen (Abschluss der Ernährungsintervention) war die hepatische Insulinsensitivität in beiden Gruppen unverändert: in der Hoch-Risiko-Gruppe von $79 \pm 3\%$ auf $75 \pm 4\%$ (Mittelwert \pm SEM, $p > 0,05$) und in der Niedrig-Risiko-Gruppe von $82 \pm 5\%$ auf $79 \pm 4\%$ (Mittelwert \pm SEM, $p > 0,05$) (**Abb. 9**).

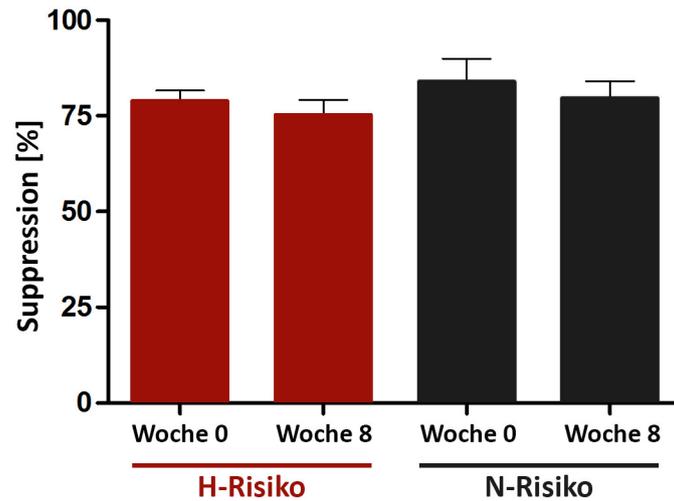


Abb. 9 Änderungen der hepatischen Insulinsensitivität vor Beginn und nach Abschluss der Ernährungsintervention. $n = 19$ in der Hoch-Risiko-Gruppe und $n = 17$ in der Niedrig-Risiko-Gruppe. Die hepatische Insulinsensitivität wurde als Insulin-vermittelte EGP-Suppression in % gemessen. Änderungen wurden mittels Student's t -Test für gepaarte Proben innerhalb einer Gruppe analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

4. Diskussion

Basierend auf den Ergebnissen der Potsdamer EPIC-Studie, die Zusammenhänge zwischen dem Verzehr bestimmter Lebensmittel und dem Risiko für eine Typ 2 Diabetes-Erkrankung zeigen, wurden im Rahmen der DDIET-Studie zwei unterschiedliche Ernährungsinterventionen an übergewichtigen Probanden mit seit maximal fünf Jahren diagnostiziertem Typ 2 Diabetes mellitus sowie einer Metformin- oder keiner medikamentösen Therapie durchgeführt. In der hier vorgestellten Arbeit wurden die Auswirkungen von zwei Ernährungsmodifikationen auf die Ganzkörper- sowie die hepatische Insulinsensitivität an Probanden mit Typ 2 Diabetes mellitus untersucht.

Die DDIET-Studie zeigte, dass bei Probanden mit Typ 2 Diabetes eine 8-wöchige Ernährungsumstellung mit moderater Kalorienrestriktion (-300 kcal) und Verteilung der Makronährstoffanteile auf 50% Kohlenhydrate, 30% Fett und 20% Eiweiß sowohl bei Getreideballaststoff- und Kaffee-reicher Ernährung (Niedrig-Risiko-Gruppe) als auch bei Konsum von rotem Fleisch (Hoch-Risiko-Gruppe) die Ganzkörperinsulinsensitivität in vergleichbarem Ausmaß verbessert. Die hepatische Insulinsensitivität war in der DDIET-Studie nach beiden Ernährungsmodifikationen unverändert.

4.1. Ernährungseinfluss auf die Insulinsensitivität

Insgesamt belegen Studien zur Auswirkung der Ernährungsumstellung auf die Insulinsensitivität unterschiedliche Effekte bezüglich der Ernährungszusammensetzung.

Lim et al. führten 2011 eine 8-wöchige Diätinterventionsstudie an elf übergewichtigen Probanden mit Typ 2 Diabetes durch (Lim et al., 2011). Die Probanden waren 47 bis 52 Jahre alt. Die BMI-Werte lagen zwischen 32,4 und 34,8 kg/m². Hier wurde im Unterschied zur DDIET-Studie nicht der Effekt der Nahrungszusammensetzung, son-

dern der einer radikalen Kalorienreduktion überprüft. Die Probanden nahmen nur 600 kcal pro Tag zu sich, wobei die Nüchtern-Blutglukosekonzentration schon nach einer Woche um 36% abnahm. Bei der durch den hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp ermittelten peripheren Insulinsensitivität war keine signifikante Verbesserung festzustellen. Die hepatische Insulinsensitivität stieg bereits nach einer Woche an und die insulininduzierte Hemmung der hepatischen Glukoseabgabe verbesserte sich um 31%. Nach acht Wochen war eine Senkung des hepatischen Triacylglycerins um 88% zu beobachten. Der Triacylglyceringehalt des Pankreas wurde um 23% reduziert. Lim et al. nahmen an, dass die Reduktion des Triacylglyceringehalts der Leber und des Pankreas schließlich eine Verbesserung der Beta-Zellfunktion und der hepatischen Insulinsensitivität bewirkte (Lim et al., 2011), wobei Begovatz et al. die Meinung vertreten, dass es bezüglich der Rolle und Regulation der Adipozyteninfiltration und des intrazellulären Pankreasfetts im Hinblick auf die Entwicklung von Typ 2 Diabetes mellitus noch weiterer Forschung bedarf. Denn den derzeitigen nicht-invasiven MRT- und MRS-Techniken gelingt es nicht, zwischen den beiden Fettdepots des Pankreas zu unterscheiden (Begovatz et al., 2015).

In einer weiteren hypokalorischen Ernährungsinterventionsstudie konnte bei acht übergewichtigen Probanden mit Typ 2 Diabetes im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv eine Normalisierung der Nüchtern-Blutglukose, der basalen hepatischen Glukoseproduktion sowie der Insulin-induzierten Suppression der endogenen hepatischen Glukoseproduktion, die hier ebenfalls durch den hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp ermittelt wurde, nach einer Gewichtsabnahme beobachtet werden (Petersen et al., 2005). Im Unterschied zur DDIET-Studie bestand die Interventionsdiät aus einer flüssigen Nahrung mit 50% Kohlenhydraten, 43% Proteinen sowie 3% Fett und 12 g Ballaststoffen, die mit rohem Obst und Gemüse ergänzt wurden. So erhielt jeder Proband täglich 1200 kcal, unabhängig vom Körpergewicht.

Anders als in der DDIET-Studie wurden in einer weiteren Studie die Auswirkungen einer zehntägigen kalorienreduzierten Diät mit dem Effekt einer Bewegungsintervention bei übergewichtigen Probanden mit gestörter Glukosetoleranz verglichen (Arciero et al., 1999). Hier wurde gezeigt, dass sich die BMI-Werte und der Gesamtkörper-Fettgehalt in beiden Interventionsgruppen reduzieren ließen, in der Gruppe mit kalorienreduzierter Diät allerdings in stärkerem Ausmaß. Nach Intervention waren die Konzentrationen der Nüchtern-Blutglukose und des Insulins in beiden Gruppen geringer als zuvor. Die Insulin-induzierte Glukoseverwertung in der Peripherie stieg bei der Bewegungsinterventionsgruppe stärker an als bei der Diätgruppe. Zur Beurteilung der Insulinsekretion und der Insulin-induzierten Glukoseverwertung wurde hier neben dem oralen Glukosetoleranztest ein modifizierter hyperglykämischer Clamp durchgeführt (Arciero et al., 1999).

Weickert et al. verglichen im Rahmen einer länger angelegten Interventionsstudie den Einfluss einer protein- mit einer ballaststoffreichen Diät auf den Glukosestoffwechsel bei übergewichtigen Probanden (Weickert et al., 2011). Wie auch in der DDIET-Studie enthielten beide Diätformen die gleiche reduzierte Kilokalorienmenge. Die achtzehnwöchige Diätintervention führte in beiden Gruppen in gleichem Maße zu einer Reduktion des Körpergewichts sowie des subkutanen, viszeralen und Gesamtkörper-Fettgehalts. Nach sechs Wochen lag die Insulinsensitivität bei Probanden mit ballaststoffreicher Diät um 25% höher als bei Probanden mit proteinreicher Diät. Die proteinreiche Diät verursachte eine erhöhte Expression von Serinkinase 6-1. Das Enzym führt zu einer Erhöhung der Aminosäure-Konzentration, die dann die Insulinresistenz bedingt bzw. verstärkt (Weickert et al., 2011). Auch Tremblay et al. konnten anhand einer Studie mit geringem Kollektiv beobachten, dass die Insulinwirkung bei Erhöhung der Aminosäure-Konzentration durch den Rapamycin/S6-Kinase-1-Weg und der inhibitorischen Serinphosphorylierung des Insulinrezeptorsubstrat-1 beeinträchtigt ist (Tremblay et al., 2005).

Einen positiven Einfluss von Getreidevollkorn auf die Insulinsensitivität zeigt die Studie von Weickert und Mitarbeitern, welche die Verbesserung der Insulinsensitivität nach Einnahme von Getreideballaststoffen über 72 Stunden zeigen konnte (Weickert et al., 2011). In einer weiteren Studie konnte eine Verbesserung der systemischen Inflammation durch Modifikation der Darmflora während der Einnahme von Getreideballaststoffen unabhängig von der Gewichtsreduktion gezeigt werden (Martinez et al., 2013). Ähnliche Auswirkungen wurden für chronischen Kaffeekonsum beschrieben (Cowan et al., 2014).

Sacks et al. konnten 2014 in einer kontrollierten 5-wöchigen Ernährungsumstellungs-Intervention mit 163 übergewichtigen Probanden und einem systolischen Blutdruck zwischen 120 und 159 mmHg zeigen, dass eine Ernährung mit niedrigem glykämischen Index im Vergleich zu einer Ernährung mit hohem glykämischen Index keinen Vorteil bietet im Hinblick auf die Verbesserung der Insulinsensitivität, einer Hyperlipidämie oder eines hohen Blutdrucks (Sacks et al., 2014), wobei es sich bei dem Probandenkollektiv nicht um Probanden mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes handelte. Auch hier wurde nicht der Goldstandard für die Ermittlung der Insulinsensitivität gewählt, da die Insulinsensitivität anhand der Flächen unter den Kurven für Glukose- und Insulinspiegel während eines oralen Glukosetoleranztests bestimmt wurde.

Des Weiteren haben Krebs und Mitarbeiter in einer länger angelegten Interventionsstudie an 14 übergewichtigen Probanden mit Typ 2 Diabetes den Effekt einer Ernährung mit niedrigem Kohlenhydrat- und hohem Fettanteil auf Insulinsensitivität, glykämische Kontrolle und kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht. Hier wurde im Unterschied zu DDIET keine Kalorienreduktion beabsichtigt. Nach 24 Wochen wurden eine Gewichtsabnahme sowie eine Verbesserung der glykämischen Kontrolle erreicht. Im Vergleich zu dem in der DDIET-Studie angewandten hyperinsulinämisch-euglykämischen Clamp wurden hier die Insulinsensitivität und die glykämischen

Kontrolle mit Hilfe des HOMA-Index und der Fläche unter der Kurve für Glukosespiegel während des intravenösen Glukosetoleranztests ermittelt (Krebs et al., 2013).

4.2. Schlussfolgerungen

Die ähnlichen Effekte der beiden unterschiedlichen Ernährungsmodifikationen der DDIET-Studie auf das Ausmaß der Verbesserung einer Insulinresistenz lassen annehmen, dass nicht nur die einzelnen Bestandteile der Ernährungszusammensetzung, sondern vor allem die Kalorienrestriktion und Verteilung der Makronährstoffe für die Verbesserung der Ganzkörperinsulinsensitivität verantwortlich sind. Zudem ist anzunehmen, dass die durchgeführten Niedrig-Risiko- und Hoch-Risiko-Ernährungsmodifikationen die Insulinsensitivität über unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise durch die Reduktion des Gesamtkörper-Fettgehalts, verbessert haben könnten.

Zudem ist auch möglich, dass unter hohen Insulindosen, die zur Ermittlung der Ganzkörperinsulinsensitivität im Clamp notwendig waren, Unterschiede in der hepatischen Insulinsensitivität unbemerkt blieben.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass eine achtwöchige moderat hypokalorische Diät bei übergewichtigen Probanden mit Typ 2 Diabetes die Ganzkörperinsulinsensitivität verbessert – und zwar unabhängig von einzelnen Ernährungsbestandteilen. Diese Kurzzeit-Interventionsstudie zeigte keinen Vorteil einer an Getreideballaststoffen und Kaffee reichen Ernährung in Bezug auf die Verbesserung der Ganzkörperinsulinsensitivität gegenüber einer anderen Ernährungszusammensetzung. Die DDIET-Studie konnte als randomisierte, kontrollierte Studie an einem gut definierten, aber kleinen Kollektiv von übergewichtigen Probanden mit Typ 2 Diabetes also nicht alle möglichen Veränderungen, die durch einzelne Ernährungsbestandteile oder deren Interaktion mit der Gewichtsabnahme bedingt sein könnten, aufdecken. Denn sowohl eine wenn auch nur moderate Gewichtsabnahme als auch

eine multimodale Ernährungsumstellung könnten potentielle spezifische Effekte einzelner Ernährungsbestandteile maskieren, sodass zur detaillierten Beantwortung dieser Fragestellung in Zukunft größer angelegte längerfristige Studien mit isokalorischer Ernährungsumstellung notwendig sein werden.

5. Zusammenfassung

Epidemiologische Analysen der Potsdamer EPIC-Studie zeigten, dass das Risiko, an Typ 2 Diabetes zu erkranken, vermindert wurde, wenn Probanden regelmäßig mehr Vollkorngetreideballaststoffe und Kaffee konsumierten. Bei regelmäßigem Konsum von rotem Fleisch hingegen war das Risiko für Typ 2 Diabetes mellitus erhöht. Aus den genannten Analysen wurde schließlich der deutsche Diabetes-Risiko-Score (DRS) abgeleitet. Die vorliegende Arbeit testete im Rahmen der DDIET-Studie die Hypothese, dass eine 8-wöchige, moderat kalorienreduzierte (-300 kcal pro Tag) Ernährungsintervention mit Vollkorn, Kaffee und dem Verzicht auf rotes Fleisch im Vergleich zu einer Ernährungsintervention mit täglichem Konsum von rotem Fleisch und Verzicht auf Kaffee und Getreideballaststoffe bei übergewichtigen Probanden ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) mit Typ 2 Diabetes die Ganzkörper-Insulinsensitivität verbessert. Vor und nach der Ernährungsintervention wurde ein hyperinsulinämisch-euglykämischer Clamp mit deuterierter Glukose zur Bestimmung der Ganzkörper-Insulinsensitivität (M-Wert) und der hepatischen Insulinsensitivität (insulinvermittelte EGP-Suppression) durchgeführt. Der M-Wert war nach Abschluss der Ernährungsintervention in beiden Gruppen angestiegen. Die Verbesserung der Ganzkörper-Insulinsensitivität unterschied sich zwischen den Gruppen nicht. Die hepatische Insulinsensitivität blieb in beiden Gruppen unverändert. Diese Kurzzeit-Interventionsstudie zeigte hinsichtlich der Verbesserung der Ganzkörperinsulinsensitivität keinen Vorteil einer getreideballaststoff- sowie kaffeereichen Ernährung gegenüber einer anderen Ernährungszusammensetzung. Die kurzfristige, moderat hypokalorische und multimodale Ernährungsumstellung könnte mögliche spezifische Effekte einzelner Ernährungsbestandteile maskiert haben. Zur detaillierten Beantwortung dieser Fragestellung ist es sinnvoll, zukünftig groß angelegte, langfristige Studien mit isokalorischer Ernährungsumstellung durchzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- ABDUL-GHANI, M. A. & DEFRONZO, R. A. 2010. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 476279.
- AINSWORTH, B. E., HASKELL, W. L., LEON, A. S., JACOBS, D. R., JR., MONTOYE, H. J., SALLIS, J. F. & PAFFENBARGER, R. S., JR. 1993. Compendium of physical activities: classification of energy costs of human physical activities. *Med Sci Sports Exerc*, 25, 71-80.
- AINSWORTH, B. E., HASKELL, W. L., WHITT, M. C., IRWIN, M. L., SWARTZ, A. M., STRATH, S. J., O'BRIEN, W. L., BASSETT, D. R., JR., SCHMITZ, K. H., EMPLAINCOURT, P. O., JACOBS, D. R., JR. & LEON, A. S. 2000. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med Sci Sports Exerc*, 32, S498-504.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION 2014. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37, 81-90.
- ANDERSON, J. W. & WARD, K. 1978. Long-term effects of high-carbohydrate, high-fiber diets on glucose and lipid metabolism: a preliminary report on patients with diabetes. *Diabetes Care*, 1, 77-82.
- ANDERWALD, C., BERNROIDER, E., KRSSAK, M., STINGL, H., BREHM, A., BISCHOF, M. G., NOWOTNY, P., RODEN, M. & WALDHAUSL, W. 2002. Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle. *Diabetes*, 51, 3025-32.
- ANDRES, R., SWERDLOFF, R., POZEFSKY, T. & COLEMAN, D. 1966. Manual feedback technique for control of glucose concentration. *Skeggs LT, Jr, ed. Automation in Analytic Chemistry, Medaid, New York*, 486-501.
- ARCIERO, P. J., VUKOVICH, M. D., HOLLOSZY, J. O., RACETTE, S. B. & KOHRT, W. M. 1999. Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance. *J Appl Physiol (1985)*, 86, 1930-5.
- BAVENHOLM, P. N., PIGON, J., OSTENSON, C. G. & EFENDIC, S. 2001. Insulin sensitivity of suppression of endogenous glucose production is the single most important determinant of glucose tolerance. *Diabetes*, 50, 1449-54.
- BEGOVATZ, P., BIERWAGEN, A., LUNDBOM, J. & RODEN, M. 2015. Pancreatic triacylglycerol distribution in type 2 diabetes. Reply to Hollingsworth K. G., Al Mrabeh A., Steven S. et al [letter]. *Diabetologia*, 58, 2679-81.
- BERGMAN, R. N., FINEGOOD, D. T. & ADER, M. 1985. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev*, 6, 45-86.
- BEYLOT, M., PREVIS, S. F., DAVID, F. & BRUNENGRABER, H. 1993. Determination of the ¹³C-labeling pattern of glucose by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, 212, 526-31.
- BJORNTORP, P., BERGMAN, H. & VARNAUSKAS, E. 1969. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med Scand*, 185, 351-6.
- BJORNTORP, P., DE JOUNGE, K., SJOSTROM, L. & SULLIVAN, L. 1970. The effect of physical training on insulin production in obesity. *Metabolism*, 19, 631-8.
- BODEN, G. & CHEN, X. 1995. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, 96, 1261-8.
- BODEN, G., CHEN, X., RUIZ, J., WHITE, J. V. & ROSSETTI, L. 1994. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*, 93, 2438-46.

- BODEN, G., CHEUNG, P., STEIN, T. P., KRESGE, K. & MOZZOLI, M. 2002. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E12-9.
- BODEN, G., JADALI, F., WHITE, J., LIANG, Y., MOZZOLI, M., CHEN, X., COLEMAN, E. & SMITH, C. 1991. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest*, 88, 960-6.
- BOGARDUS, C., LILLIOJA, S., MOTT, D., REAVEN, G. R., KASHIWAGI, A. & FOLEY, J. E. 1984. Relationship between obesity and maximal insulin-stimulated glucose uptake in vivo and in vitro in Pima Indians. *J Clin Invest*, 73, 800-5.
- BOKEMARK, L., FRODEN, A., ATTVALL, S., WIKSTRAND, J. & FAGERBERG, B. 2000. The euglycemic hyperinsulinemic clamp examination: variability and reproducibility. *Scand J Clin Lab Invest*, 60, 27-36.
- BRUNZELL, J. D., LERNER, R. L., HAZZARD, W. R., PORTE, D., JR. & BIERMAN, E. L. 1971. Improved glucose tolerance with high carbohydrate feeding in mild diabetes. *N Engl J Med*, 284, 521-4.
- CAWTHORN, W. P. & SETHI, J. K. 2008. TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS Lett*, 582, 117-31.
- CHAN, J. M., RIMM, E. B., COLDITZ, G. A., STAMPFER, M. J. & WILLETT, W. C. 1994. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care*, 17, 961-9.
- CHARLTON, M., SREEKUMAR, R., RASMUSSEN, D., LINDOR, K. & NAIR, K. S. 2002. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 35, 898-904.
- CHERRINGTON, A. D. 1999. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*, 48, 1198-214.
- COWAN, T. E., PALMNAS, M. S., YANG, J., BOMHOF, M. R., ARDELL, K. L., REIMER, R. A., VOGEL, H. J. & SHEARER, J. 2014. Chronic coffee consumption in the diet-induced obese rat: impact on gut microbiota and serum metabolomics. *J Nutr Biochem*, 25, 489-95.
- COYLE, E. F., SIDOSSIS, L. S., HOROWITZ, J. F. & BELTZ, J. D. 1992. Cycling efficiency is related to the percentage of type I muscle fibers. *Med Sci Sports Exerc*, 24, 782-8.
- DANCYGIER, H. 2006. Pathogenese und Therapie der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen: Von der Fettleber zur Zirrhose. *Dtsch Arztebl*, 103, A 1301-7.
- DEFRONZO, R. A., FERRANNINI, E., HENDLER, R., FELIG, P. & WAHREN, J. 1983. Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes*, 32, 35-45.
- DEFRONZO, R. A., JACOT, E., JEQUIER, E., MAEDER, E., WAHREN, J. & FELBER, J. P. 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30, 1000-7.
- DEFRONZO, R. A., TOBIN, J. D. & ANDRES, R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 237, E214-23.
- DEL PRATO, S. 1999. Measurement of insulin resistance in vivo. *Drugs*, 58 Suppl 1, 3-6; discussion 75-82.
- DIMITRIADIS, G., MITROU, P., LAMBADIARI, V., MARATOU, E. & RAPTIS, S. A. 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*, 93 Suppl 1, S52-9.

- DOBERNE, L., GREENFIELD, M. S., ROSENTHAL, M., WIDSTROM, A. & REAVEN, G. 1982. Effect of variations in basal plasma glucose concentration on glucose utilization (M) and metabolic clearance (MCR) rates during insulin clamp studies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 31, 396-400.
- EBELING, P., BOUREY, R., KORANYI, L., TUOMINEN, J. A., GROOP, L. C., HENRIKSSON, J., MUECKLER, M., SOVIJARVI, A. & KOIVISTO, V. A. 1993. Mechanism of enhanced insulin sensitivity in athletes. Increased blood flow, muscle glucose transport protein (GLUT-4) concentration, and glycogen synthase activity. *J Clin Invest*, 92, 1623-31.
- EKBERG, K., LANDAU, B. R., WAJNGOT, A., CHANDRAMOULI, V., EFENDIC, S., BRUNENGRABER, H. & WAHREN, J. 1999. Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 48, 292-8.
- FERRANNINI, E. & MARI, A. 1998. How to measure insulin sensitivity. *J Hypertens*, 16, 895-906.
- FERRANNINI, E., NATALI, A., BELL, P., CAVALLO-PERIN, P., LALIC, N. & MINGRONE, G. 1997. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest*, 100, 1166-73.
- FUKAGAWA, N. K., ANDERSON, J. W., HAGEMAN, G., YOUNG, V. R. & MINAKER, K. L. 1990. High-carbohydrate, high-fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in healthy young and old adults. *Am J Clin Nutr*, 52, 524-8.
- GIACCA, A., MCCALL, R., CHAN, B. & SHI, Z. Q. 1999. Increased dependence of glucose production on peripheral insulin in diabetic depancreatized dogs. *Metabolism*, 48, 153-60.
- GIANI, G., JANKA, H. U., HAUNER, H., STANDL, E., SCHIEL, E., NEU, A., RATHMANN, W. & ROSENBAUER, J. 2004. Evidenzbasierte Leitlinien DDG, Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus.
- GOLAY, A., FELBER, J. P., JEQUIER, E., DEFRONZO, R. A. & FERRANNINI, E. 1988. Metabolic basis of obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, 4, 727-47.
- HERS, H. G. 1990. Mechanisms of blood glucose homeostasis. *J Inherit Metab Dis*, 13, 395-410.
- HORTON, J. D., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 109, 1125-31.
- HOTHER-NIELSEN, O., HENRIKSEN, J. E., HOLST, J. J. & BECK-NIELSEN, H. 1996. Effects of insulin on glucose turnover rates in vivo: isotope dilution versus constant specific activity technique. *Metabolism*, 45, 82-91.
- KAHN, C. R. 1994. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066-84.
- KATZ, A., NAMBI, S. S., MATHER, K., BARON, A. D., FOLLMANN, D. A., SULLIVAN, G. & QUON, M. J. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2402-10.
- KOLTERMAN, O. G., GRAY, R. S., GRIFFIN, J., BURSTEIN, P., INSEL, J., SCARLETT, J. A. & OLEFSKY, J. M. 1981. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 68, 957-69.

- KREBS, J. D., BELL, D., HALL, R., PARRY-STRONG, A., DOCHERTY, P. D., CLARKE, K. & CHASE, J. G. 2013. Improvements in glucose metabolism and insulin sensitivity with a low-carbohydrate diet in obese patients with type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr*, 32, 11-7.
- KROOK, A., ROTH, R. A., JIANG, X. J., ZIERATH, J. R. & WALLBERG-HENRIKSSON, H. 1998. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes*, 47, 1281-6.
- LEWIS, G. F., VRANIC, M. & GIACCA, A. 1998. Role of free fatty acids and glucagon in the peripheral effect of insulin on glucose production in humans. *Am J Physiol*, 275, E177-86.
- LEWIS, G. F., ZINMAN, B., GROENEWOUD, Y., VRANIC, M. & GIACCA, A. 1996. Hepatic glucose production is regulated both by direct hepatic and extrahepatic effects of insulin in humans. *Diabetes*, 45, 454-62.
- LI, Y., WANG, P., XU, J., GORELICK, F., YAMAZAKI, H., ANDREWS, N. & DESIR, G. V. 2007. Regulation of insulin secretion and GLUT4 trafficking by the calcium sensor synaptotagmin VII. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 658-64.
- LIM, E. L., HOLLINGSWORTH, K. G., ARIBISALA, B. S., CHEN, M. J., MATHERS, J. C. & TAYLOR, R. 2011. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia*, 54, 2506-14.
- LIU, F., FAN, H. Q., QIU, J., WANG, B., ZHANG, M., GU, N., ZHANG, C. M., FEI, L., PAN, X. Q., GUO, M., CHEN, R. H. & GUO, X. R. 2008. A paradox: insulin inhibits expression and secretion of resistin which induces insulin resistance. *World J Gastroenterol*, 14, 95-100.
- MARTINEZ, I., LATTIMER, J. M., HUBACH, K. L., CASE, J. A., YANG, J., WEBER, C. G., LOUK, J. A., ROSE, D. J., KYUREGHIAN, G., PETERSON, D. A., HAUB, M. D. & WALTER, J. 2013. Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements. *ISME J*, 7, 269-80.
- MATTHEWS, D. R., HOSKER, J. P., RUDENSKI, A. S., NAYLOR, B. A., TREACHER, D. F. & TURNER, R. C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28, 412-9.
- MCCALL, R. H., WIESENTHAL, S. R., SHI, Z. Q., POLONSKY, K. & GIACCA, A. 1998. Insulin acutely suppresses glucose production by both peripheral and hepatic effects in normal dogs. *Am J Physiol*, 274, E346-56.
- MIRZA, S., HOSSAIN, M., MATHEWS, C., MARTINEZ, P., PINO, P., GAY, J. L., RENTFRO, A., MCCORMICK, J. B. & FISHER-HOCH, S. P. 2012. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha, IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans: a cross-sectional study. *Cytokine*, 57, 136-42.
- NEELEY, W. E. 1972. Simple automated determination of serum or plasma glucose by a hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase method. *Clin Chem*, 18, 509-15.
- PERRY, R. J., CAMPOREZ, J. P., KURSAWE, R., TITCHENELL, P. M., ZHANG, D., PERRY, C. J., JURCZAK, M. J., ABUDUKADIER, A., HAN, M. S., ZHANG, X. M., RUAN, H. B., YANG, X., CAPRIO, S., KAECH, S. M., SUL, H. S., BIRNBAUM, M. J., DAVIS, R. J., CLINE, G. W., PETERSEN, K. F. & SHULMAN, G. I. 2015. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*, 160, 745-58.
- PETERSEN, K. F., DUFOUR, S., BEFROY, D., LEHRKE, M., HENDLER, R. E. & SHULMAN, G. I. 2005. Reversal of nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance, and

- hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 54, 603-8.
- PRAGER, R., WALLACE, P. & OLEFSKY, J. M. 1987. Direct and indirect effects of insulin to inhibit hepatic glucose output in obese subjects. *Diabetes*, 36, 607-11.
- RANDLE, P. J., GARLAND, P. B., HALES, C. N. & NEWSHOLME, E. A. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1, 785-9.
- RATHMANN, W., SCHEIDT-NAVE, C., RODEN, M. & HERDER, C. 2013. Type 2 diabetes: prevalence and relevance of genetic and acquired factors for its prediction. *Dtsch Arztebl Int*, 110, 331-7.
- RATHMANN, W., STRASSBURGER, K., HEIER, M., HOLLE, R., THORAND, B., GIANI, G. & MEISINGER, C. 2009. Incidence of Type 2 diabetes in the elderly German population and the effect of clinical and lifestyle risk factors: KORA S4/F4 cohort study. *Diabet Med*, 26, 1212-9.
- RAVUSSIN, E., BOGARDUS, C., SCHWARTZ, R. S., ROBBINS, D. C., WOLFE, R. R., HORTON, E. S., DANFORTH, E., JR. & SIMS, E. A. 1983. Thermic effect of infused glucose and insulin in man. Decreased response with increased insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 72, 893-902.
- RIZZA, R. A., MANDARINO, L. J. & GERICH, J. E. 1981. Dose-response characteristics for effects of insulin on production and utilization of glucose in man. *Am J Physiol*, 240, E630-9.
- RODEN, M. 2007. Clinical Diabetes Research: Methods and Techniques.
- RODEN, M., PRICE, T. B., PERSEGHIN, G., PETERSEN, K. F., ROTHMAN, D. L., CLINE, G. W. & SHULMAN, G. I. 1996. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*, 97, 2859-65.
- RYAN, A. S. 2000. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med*, 30, 327-46.
- SACKS, F. M., CAREY, V. J., ANDERSON, C. A., MILLER, E. R., 3RD, COPELAND, T., CHARLESTON, J., HARSHFIELD, B. J., LARANJO, N., MCCARRON, P., SWAIN, J., WHITE, K., YEE, K. & APPEL, L. J. 2014. Effects of high vs low glycemic index of dietary carbohydrate on cardiovascular disease risk factors and insulin sensitivity: the OmniCarb randomized clinical trial. *JAMA*, 312, 2531-41.
- SALTIEL, A. R. 2016. Insulin Signaling in the Control of Glucose and Lipid Homeostasis. *Handb Exp Pharmacol*, 233, 51-71.
- SCHULZE, M. B., HOFFMANN, K., BOEING, H., LINSEISEN, J., ROHRMANN, S., MOHLIG, M., PFEIFFER, A. F., SPRANGER, J., THAMER, C., HARING, H. U., FRITSCHKE, A. & JOOST, H. G. 2007. An accurate risk score based on anthropometric, dietary, and lifestyle factors to predict the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 30, 510-5.
- SHEPHERD, P. R. & KAHN, B. B. 1999. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 341, 248-57.
- SHULMAN, G. I., ROTHMAN, D. L., JUE, T., STEIN, P., DEFRONZO, R. A. & SHULMAN, R. G. 1990. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med*, 322, 223-8.
- SIEMENS PACKUNGSBEILAGE
IMMULITE 2000 C-Peptide for use on IMMULITE 2000 Systems PIL2KPEP-7 2008-07-29.

SIEMENS PACKUNGSBEILAGE

IMMULITE 2000 Insulin for use on IMMULITE 2000 Systems PIL2KIN-29 2009-10-06.

SILLERO, A., SILLERO, M. A. & SOLS, A. 1969. Regulation of the level of key enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in liver. *Eur J Biochem*, 10, 351-4.

STEELE, R., WALL, J. S., DE BODO, R. C. & ALTSZULER, N. 1956. Measurement of size and turnover rate of body glucose pool by the isotope dilution method. *Am J Physiol*, 187, 15-24.

TREMBLAY, F., KREBS, M., DOMBROWSKI, L., BREHM, A., BERNROIDER, E., ROTH, E., NOWOTNY, P., WALDHAUSL, W., MARETTE, A. & RODEN, M. 2005. Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes*, 54, 2674-84.

WAKO_PACKUNGSBEILAGE

NEFA-HR(2)_ACS-ACOD-

Methode zur quantitativen Bestimmung der Freien Fettsäuren (NEFA) im Serum 434-91795_DE 1014_D3.

WALDHÄUSL, W., BRATUSCH-MARRAIN, P., GASIC, S., KORN, A. & NOWOTNY, P. 1982. Insulin production rate, hepatic insulin retention and splanchnic carbohydrate metabolism after oral glucose ingestion in hyperinsulinaemic Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 23, 6-15.

WEBER, G., SINGHAL, R. L. & SRIVASTAVA, S. K. 1965. Insulin: Suppressor of Biosynthesis of Hepatic Gluconeogenic Enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53, 96-104.

WEICKERT, M. O., RODEN, M., ISKEN, F., HOFFMANN, D., NOWOTNY, P., OSTERHOFF, M., BLAUT, M., ALPERT, C., GOGEBAKAN, O., BUMKE-VOGT, C., MUELLER, F., MACHANN, J., BARBER, T. M., PETZKE, K. J., HIERHOLZER, J., HORNEMANN, S., KRUSE, M., ILLNER, A. K., KOHL, A., LOEFFELHOLZ, C. V., ARAFAT, A. M., MOHLIG, M. & PFEIFFER, A. F. 2011. Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *Am J Clin Nutr*, 94, 459-71.

ZEYDA, M. & STULNIG, T. M. 2009. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*, 55, 379-86.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. M. Roden danke ich für die Überlassung des Themas, die konstruktiven Vorschläge zur Umsetzung des Projektes und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf.

Mein besonderer Dank geht an Frau Dr. L. Kunstein, denn ohne ihre hervorragende und intensive Betreuung wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Bei Frau Dr. B. Novotny möchte ich mich sehr für ihre Herzlichkeit und Hilfestellung bedanken, mit der sie mich bei Fragen und Problemen stets unterstützt hat.

Danke den Mitarbeitern des Studienzentrums am Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und somit maßgeblich zum Fortgang dieser wissenschaftlichen Arbeit beigetragen haben.

Einen großen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, die immer an mich geglaubt haben. Sie sind die treibende Kraft, die mich durch jede Lebensphase getragen hat. Ohne sie hätte ich meine Ziele und Wünsche nicht verfolgen können. Meinem Bruder Raman Firouzi danke ich für seine stetige Anwesenheit und Unterstützung in meinem Leben. Seine aufmunternden und zugleich weisen Worte haben mich immer wieder gestärkt.

Bei meinen liebsten Freundinnen Mary Mohammadi und Shaghayegh Kamrad bedanke ich mich besonders für ihre positive Energie, Liebe und Motivation in jeder Phase meines Lebens.

Nicht zuletzt bedanke ich mich vor allem bei meinem besten Freund und Lebensbegleiter Ehssan Memarpouri – für all seine Geduld und den Halt, den er mir im Leben gibt und mich immer wieder zu neuen Lebensschritten inspiriert.

Eidesstattliche Versicherung

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

03.01.2017, Parnian Firouzi

Unterschrift