

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

**Assoziation von Pankreasfett und Insulinsekretion
in einer nicht-diabetischen Population:
Identifikation möglicher Einflussfaktoren**

Dissertation

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

vorgelegt von
Valerie Stamm
(2018)

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

gez.:

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

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

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. Irene Esposito

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

„Circulating triacylglycerols but not pancreatic fat associate with insulin secretion in healthy persons “

Nowotny, Bettina; Kahl, Sabine; Klüppelholz, Birgit; Hoffmann, Barbara; Giani, Guido; Livingstone, Roshan; Nowotny, Peter J.; Stamm, Valerie; Herder, Christian; Tura, Andrea; Pacini, Giovanni; Hwang, Jong-Hee; Roden, Michael

Veröffentlicht in ´ Metabolism ´ in 2018

Zusammenfassung

Die Entstehung des Typ-2 Diabetes wird nicht nur durch die steigende Insulinresistenz bei zunehmendem Körpergewicht und körperlicher Inaktivität, sondern auch durch die Erschöpfung der Insulinsekretion bedingt. Was genau die Insulinsekretion reduziert und wie dies möglicherweise zu verzögern ist, ist eine zentrale und ungelöste Frage der Diabetologie. Eine Hypothese ist, dass ein erhöhter pankreatischer Fettgehalt zu einer Abnahme der Insulinsekretion führt. Die vorliegende Arbeit adressiert diese Hypothese sowie die Frage möglicher Einflussfaktoren.

Untersucht wurde ein Kollektiv von 73 Probanden, welche im Rahmen der Nationalen Kohorte an einem Vortest im Deutschen Diabetes Zentrum teilnahmen und neben einem standardisierten Interview, anthropometrischen Messungen, auch einen oralen Glukosetoleranztest und eine ¹H-Magnetresonanzspektroskopie (MRS) durchliefen.

Sie hatten ein durchschnittliches Alter von 57 Jahren, einen Body mass index (BMI) von 25,4 kg/m² und einen Pankreasfettanteil von 7,0%. Die Korrelationsanalysen bestätigten die bekannte Assoziation zwischen Alter und Pankreasfettgehalt. Auch sämtliche Parameter, welche den Fettanteil der Probanden beschreiben (Körpergewicht, BMI, Taillen- und Hüftumfang), korrelierten mit dem Pankreasfettgehalt. Nach Adjustierung für den BMI zeigte jedoch kein Parameter, einschließlich aller Marker der Insulinsekretion, eine Korrelation zum Pankreasfettgehalt, was auf den BMI als größten Einflussfaktor schließen lässt.

Herausforderungen der ¹H-MRS des Pankreasfettgehaltes bestehen in der ungleichen Verteilung des Pankreasfettes und der Unmöglichkeit ausschließlich den Pankreasfettwert, der nur 2% des Pankreas ausmachenden Inselzellen, zu untersuchen.

Offen bleibt daher die Frage, ob in Zukunft eine Methode entwickelt werden kann, um nichtinvasiv den Fettgehalt, speziell der für die Insulinsekretion verantwortlichen Inselzellen, zu bestimmen. Mit einer solchen Methode könnte man prüfen, ob eine Assoziation zwischen erhöhtem Inselzellfettgehalt und erniedrigter Insulinsekretion besteht. Dies könnte die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapiestrategien sein, mit dem Ziel der Reduktion des pankreatischen Fettgehaltes, noch vor Ausbruch der Erkrankung.

Abstract

Aims

The onset of type 2 diabetes is not only caused by increased insulin resistance, but also through depletion of insulin secretion. A pivotal and yet undissolved question of diabetology is what in particular causes the observed decrease in insulin secretion. One hypothesis is, that increased pancreatic fat content may be a risk factor for diminished insulin secretion. The aim of this study therefore is to address whether pancreatic fat content is correlated with insulin secretion and to explore underlying risk factors.

Material and methods

73 nondiabetic patients underwent standardized interviewing, clinical examination, oral glucose tolerance testing (oGTT), magnetic resonance imaging and ¹H-magnetic resonance spectroscopy. Insulin secretion and sensitivity indices were measured through blood testing. Furthermore ectopic fat content in the pancreas was assessed by MRI.

Results

The average age of the patients was 57 years with a body mass index 25,4 kg/m² and a pancreatic fat content of 7,0%. The latter was associated with age as well as all markers of body fat content (weight, BMI, waist- and hip circumference). However, after adjustment for BMI none of the other markers showed a correlation for pancreatic fat (including insulin secretion and sensitivity indices). This reveals BMI to be the main marker for increased pancreatic fat content.

Conclusion

A main limitation of this study is the inhomogeneous distribution of fat within the pancreas when assessed by ¹H-MRS as islet cells only represent 2% of pancreatic tissue. Therefore it is highly desirable to develop a noninvasive way to specifically measure the fat content of islet cells within the pancreas. With such a method we could investigate potential associations between the islet cell fat content and decreased insulin secretion. This knowledge could be the foundation of developing novel therapeutic strategies to lower pancreatic fat content before the onset of diabetic disease.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AI	Adaptation Index
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
Ca²⁺	Calcium
DI	disposition index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFA	free fatty acids
Fru-6-P	Fructose-6-Phosphat
GC	Gesamtcholesterin
GIP	Glucose dependent insulintropic peptide
GLP	Glucagon-like peptide
GLUT	Glukosetransporter
GLU-6-P	Glukose-6-Phosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GSIS	Glukose stimulierte Insulinsekretion
HDL	High-density lipoprotein
HKT	Hämatokrit
HMBG1	High-Mobility-Group-Protein 1
HOMA	homoeostasis model assessment
IFG	impaired fasting glucose
IGI	Insulinogenic index
IGT	impaired glucose tolerance
IL	Interleukin
IVGTT	Intravenöser Glukosetoleranztest
K⁺	Kalium
LDL	Low-density lipoprotein
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MODY	maturity onset diabetes of the young
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NGT	normale Glukosetoleranz
OGIS	oral glucose insulin sensitivity

III | Abkürzungsverzeichnis

oGTT	oraler Glukosetoleranztest
Pyr	Pyruvat
RBC	red blood cells
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
SD	Standartabweichung
T2D	Typ-2 Diabetes mellitus
TE	Time of echo
TG	Triglyceride
TLR	Toll-like Rezeptoren
TR	Time of repetition
UCP	uncoupling protein
VDCC	Voltage-dependent-calcium-channel
VOI	Volume of interest
WHO	World Health Organisation
ZDF	Zucker Diabetic Fatty
γ-GT	Gamma-Glutamyltransp

Inhaltsverzeichnis

I. Publikation	
II. Zusammenfassung.....	I
III. Abkürzungsverzeichnis.....	III
IV. Inhaltssverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1. Grundlagen des Diabetes mellitus	2
1.1.1. Physiologie des Kohlenhydratstoffwechsels	2
1.1.2. Diabetestypen	3
1.1.3. Diagnostik	4
1.2. Pathogenese des Typ-2 Diabetes.....	6
1.2.1. Insulinresistenz.....	6
1.2.2. Insulinsekretion.....	7
1.2.2.1. Insulinbiosynthese und -abbau.....	7
1.2.2.2. Physiologische Insulinsekretion.....	9
1.2.2.3. Messmethoden der Insulinsekretion.....	10
1.2.2.3.1. Einfache Tests zur Bestimmung der Insulinsekretion.....	10
1.2.2.3.2. Dynamische Tests nach Substratexposition.....	11
1.2.2.3.3. Dynamische Tests unter Verwendung von Clamp Untersuchungen.....	12
1.2.2.4. Modifikatoren der Insulinsekretion.....	13
1.2.3. Messmethoden des Fettgehaltes in Organen.....	17
1.2.4. Assoziation von Pankreasfettgehalt und Insulinsekretion.....	19
1.2.4.1. In vitro Daten.....	19
1.2.4.2. Tiermodelle.....	20
1.2.4.3. Humane Studien.....	21
1.3. Ziele der Arbeit.....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1. Material.....	26
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Nationale Kohorte.....	29
2.2.2. Machbarkeitsstudie.....	30

2.2.3. Probandenselektion.....	30
2.2.4. Studiendesign.....	30
2.2.5. Studienuntersuchungen.....	30
2.2.6. Laborchemische Bestimmungen.....	35
2.2.7. ¹ H-MRS.....	38
2.2.8. Berechnete Indizes für die Insulinsekretion und –sensitivität aus dem oGTT.....	39
2.2.9. Statistik.....	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Deskription der Kohorte.....	41
3.2. Korrelationsanalysen mit Pankreasfettgehalt.....	45
3.3. Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflussfaktoren des Pankreasfettgehaltes	45
3.4. Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflussfaktoren der Insulinsekretion...48	
4. Diskussion.....	51
4.1. Limitationen und methodische Einschränkungen.....	55
4.2. Ausblick.....	56
5. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis.....	57
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Danksagung.....	64

1. Einleitung

Das Durchschnittsalter der Weltbevölkerung ist in den letzten Jahren aufgrund enormer Verbesserungen in der medizinischen Versorgung immer weiter angestiegen. Damit einher geht auch das Auftreten einer neuen Patientenpopulation. Der multimorbide Patient ist gekennzeichnet durch ein hohes Alter und dem Auftreten einer Vielzahl, meist chronischer Krankheiten. Dazu gehören Erkrankungen des Herzens, Depression, Demenz und auch der Diabetes mellitus [1].

Die Krankheit des Diabetes mellitus gewinnt dabei im klinischen Alltag durch ihre steigende Prävalenz zunehmend an Bedeutung. So lag die Krankheitshäufigkeit aller Formen des Diabetes mellitus im Jahre 2000 weltweit noch bei 2,8%, d.h. 171 Millionen Menschen, bis 2030 wird sie schätzungsweise auf 4,4%, also 366 Millionen Menschen, ansteigen [2]. Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung steigt vor allem die Anzahl an Erkrankten mit Typ-2 Diabetes mellitus. So schätzt eine 2006 erschienene Studie die Anzahl an Patienten mit Diabetes in den USA auf ca. 20 Millionen Menschen, also 8% der amerikanischen Bevölkerung über 20 Jahren, wobei die Hälfte der Erkrankten zu diesem Zeitpunkt über 60 Jahre alt war. Die größte Krankheitshäufigkeit findet sich in der Gruppe der über 80-Jährigen. Diese Zahlen werden sich bis zum Jahr 2050 wahrscheinlich verdoppeln, da sich allein die Gruppe der über 65-jährigen Amerikaner in den nächsten 25 Jahren verdoppeln wird [3]. In Deutschland ergab sich Ende der 80er-Jahre eine Gesamtprävalenz des Typ-2 Diabetes mellitus von 4-5% [4]. Allerdings geht man davon aus, dass es eine hohe Anzahl an nicht diagnostizierten Personen mit Typ-2 Diabetes gibt, was mit einem symptomfreien Intervall zu Krankheitsbeginn zu erklären ist. Im Rahmen einer bevölkerungsrepräsentativen Studie in der Region um Augsburg Anfang des 21. Jahrhunderts bei gesunden 55-74-Jährigen, die einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT) bekamen, fand man eine Prävalenz des Typ-2 Diabetes mellitus von 17%, wobei bei ca. 8% die Erstdiagnose eines Typ-2 Diabetes mellitus gestellt wurde. Die Prävalenz einer gestörten Glukosetoleranz oder einer gestörten Nüchternglukose lag bei 23% [5].

Als eine bis heute zumeist nicht kurativ zu behandelnde Erkrankung stellt der Diabetes mellitus eine große Belastung sowohl für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem dar, welches die enormen Kosten tragen muss, die nicht nur durch die Primärerkrankung, sondern vor allem durch ihre Folgeerkrankungen

1 | Einleitung

verursacht werden. So ist das Risiko an einer kardiovaskulären Erkrankung zu leiden bei Patienten mit Diabetes um den Faktor 2-5 erhöht, verglichen mit einer nicht-diabetischen Population [6]. Weitere Komplikationen sind eine Erblindung, Nierenversagen und Neuropathien.

Die Kostenbelastung des Gesundheitssystems wurde unter anderem durch die KoDiM-Studie („Kosten des Diabetes mellitus“) abgeschätzt. Unterschieden wurde hierbei zwischen direkten Kosten, die 2001 bei 14,6 Milliarden Euro lagen, und indirekten Kosten, verursacht durch Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung, die bei 7,7 Milliarden Euro lagen. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass knapp 80% der direkten Kosten durch Begleiterkrankungen des Diabetes verursacht wurden [7, 8]. Damit ist ein besseres Verständnis der Entstehung des Diabetes von großer Bedeutung für den Patienten und das Gesundheitssystem.

1.1. Grundlagen des Diabetes mellitus

1.1.1. Physiologie des Kohlenhydratstoffwechsels

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, die durch eine chronische Hyperglykämie gekennzeichnet ist. Daraus resultieren Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel, aber auch im Protein- und Fettstoffwechsel. Das entscheidende Hormon in der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels ist das Insulin. Diabetes kann durch Störungen der Insulinsekretion, der Insulinwirkung an peripheren Geweben oder einer Kombination aus beidem entstehen [9, 10].

Insulin ist ein in den β -Zellen der pankreatischen Langerhans'schen Inseln produziertes Peptidhormon, welches zu einer Senkung der Blutglukosewerte führt. β -Zellen reagieren sensibel auf Veränderungen der Glukosekonzentration im Blut und passen ihre Insulinsekretion dementsprechend an, z.B. gesteigerte Insulinsekretion bei postprandial gesteigerten Blutglukosewerten. Diese erhöhten Insulinspiegel führen in insulinsensitiven Geweben wie Leber-, Muskel- und Fettgewebe zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme in die Zellen [11, 12].

Insulin hat aber noch vielfältige weitere Aufgaben in der Stoffwechselregulation. Es hemmt die Glukoneogenese in der Leber und auch die Lipolyse im Fettgewebe. Somit gehört es zu den anabolen Hormonen, welche bei Nahrungsüberschuss die Energiereserven des Körpers aufbauen [13].

1 | Einleitung

1.1.2. Diabetestypen

Nach der American Diabetes Association werden verschiedene Diabetesformen differenziert. Unterschieden wird zwischen einem absoluten Insulinmangeldiabetes (Typ-1 Diabetes), einem relativen Insulinmangeldiabetes (Typ-2 Diabetes), einem Gestationsdiabetes und anderen spezifischen Diabetestypen (z.B. medikamenteninduzierte, infektiöse oder monogenetische Formen) [9].

Nur ca. 5-10% der Patienten mit Diabetes leiden an einem Typ-1 Diabetes, bei welchem es durch eine Autoimmunreaktion zu einer Zerstörung der β -Zellen und damit einem absoluten Insulinmangel kommt. Oftmals tritt der Typ-1 Diabetes bereits im Kindes- oder Jugendalter in Erscheinung und die Patienten präsentieren sich meist mit einem schlanken Habitus. Typ-1 Diabetes ist zudem vergesellschaftet mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. einer Hashimoto-Thyreoiditis, einem Morbus Addison oder einer autoimmun vermittelten Hepatitis [9].

Als Gestationsdiabetes bezeichnet man einen in der Schwangerschaft erstmals diagnostizierten Diabetes. Die Frauen haben häufig einen erhöhten BMI und es besteht bei ihnen auch nach der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko, einen Typ-2 Diabetes zu entwickeln. Durch den gesteigerten Insulinspiegel im Fruchtwasser steigt die Glukoseaufnahme der ungeborenen Kinder und somit auch ihr Gewicht, was in einer gesteigerten Frühgeburtlichkeitsrate und damit einhergehenden Komplikationen für Mutter und Kind resultiert [9].

Medikamente, welche einen Diabetes induzieren können, sind beispielsweise Glukokortikoide. Bei Absetzen dieser Medikamente kann es zu einer spontanen Normalisierung der Stoffwechsellage kommen [9].

Monogenetische Formen des Diabetes treten bereits im frühen Alter (meist unter 25 Jahren) auf und sind häufig charakterisiert durch vererbte Defekte in der β -Zellfunktion, die auf einem singulären Gendefekt beruhen. Es besteht eine Störung der Insulinsekretion, wobei die Wirkung des Hormons oftmals normal ist. Diese Formen des Diabetes bezeichnet man auch als MODY (maturity onset diabetes of the young). Selten führen auch mitochondriale Defekte zur Ausbildung eines Diabetes [9].

Die Mehrzahl (90-95%) der Patienten erkranken jedoch an einem Typ-2 Diabetes mellitus. Dieser früher auch als Insulin-unabhängiger Diabetes oder Altersdiabetes bezeichnete Typ, zeichnet sich durch eine primäre Insulinresistenz in peripheren Geweben wie Muskel-, Leber- und Fettgewebe aus [9–12]. Kann die

1 | Einleitung

Insulinproduktion nicht mehr für die Insulinresistenz kompensieren, entsteht der Typ-2 Diabetes und es liegt ein relativer Insulinmangel vor. Das Risiko einen Typ-2 Diabetes zu entwickeln steigt mit zunehmendem BMI an. Meist sind ältere Patienten betroffen, die Rate an Kindern und Jugendlichen mit Typ-2 Diabetes nimmt jedoch aufgrund der auch immer steigenden Prävalenz des Übergewichtes in dieser Altersgruppe kontinuierlich zu [9, 11, 12].

1.1.3. Diagnostik

Nach den aktuellen Empfehlungen der American Diabetes Association und der Deutschen Diabetes Gesellschaft wird der Diabetes mellitus über folgende Kriterien diagnostiziert [9, 10]:

1. Klassische Symptome einer Hyperglykämie und eine Plasmaglukosekonzentration ≥ 200 mg/dl zu einem beliebigen Tageszeitpunkt oder
2. HbA1c $\geq 6,5\%$ oder
3. Nüchtern glukose im Plasma ≥ 126 mg/dl (bestätigt durch Wiederholung der Messung an einem anderen Tag) oder
4. Blutglukosewert ≥ 200 mg/dl 2 Stunden nach standardisierter oraler Glukosebelastung (oraler Glukosetoleranztest)

Als Diabetes-spezifische Symptome gelten eine Polyurie, vermehrtes Wasserlassen, Polydipsie und ein nicht anders erklärbarer Gewichtsverlust, die durch eine fortgeschrittene gestörte Stoffwechsellage ausgelöst werden, bei der die Blutglukosewerte regelmäßig die Nierenschwelle von ca. 180 mg/dl überschreiten [9].

Dem gegenüber gibt der HbA1c-Wert unabhängig vom aktuellen Nüchternstatus oder der Tageszeit Aufschluss über die mittleren Blutglukosewerte der letzten zwei bis drei Monate und ermöglicht so bei Werten $\geq 6,5\%$, entsprechend einer mittleren Blutglukosekonzentration von 130 mg/dl, die Diagnose eines Diabetes mellitus zu stellen, bevor Symptome auftreten. Beachten sollte man falsch hohe Werte oder falsch niedrige Werte bei Menschen mit bestimmten Anämieformen, Hämoglobinopathien oder denjenigen, die eine regelmäßige Dialyse erhalten [9].

1 | Einleitung

Die Bestimmung des Nüchternglukosewertes setzt eine Fastenzeit von mindestens acht Stunden vor der Blutentnahme voraus und sollte zur Verbesserung der Sensitivität durch einen oralen Glukosetoleranztest (oGTT) ergänzt werden.

Der oGTT wird heutzutage in der Praxis als Goldstandard zur Diagnostik eines Typ-2 Diabetes eingesetzt.

Bei einem oGTT wird der Nüchternglukosewert nach einer nächtlichen Fastenzeit von 8-12 Stunden und der Zweistundenglukosewert nach der oralen Gabe einer standardisierten Glukoselösung aus 75 g Glukose gelöst in einem Gesamtvolumen von 300 ml ermittelt.

Auch bei einem normalen Glukosestoffwechsel steigt der Blutglukosewert innerhalb der ersten 60 Minuten stark an, wird jedoch nach 2-3 Stunden wieder auf den Anfangswert abfallen. Bei einem Patienten mit Diabetes mellitus liegt der Blutglukosewert 2 Stunden nach Testbeginn über 200 mg/dl (Tabelle 1) [9, 10].

Zusätzlich zum manifesten Diabetes können auch Vorstufen des Diabetes mit Hilfe eines oGTT festgestellt werden. Unterschieden wird hierbei zwischen Personen mit einem gestörten Nüchternglukosewert (impaired fasting glucose (IFG)) oder Personen mit einer veränderten Glukosetoleranz 2 Stunden nach Glukoseaufnahme (impaired glucose tolerance (IGT)) oder einer Kombination aus beidem (Tabelle 1).

	Nüchtern	oGTT 2-Stundenwert
Normale Glukosetoleranz	<100 mg/dl	<140 mg/dl
Isolated impaired fasting glucose (IFG)	100–125 mg/dl	<140 mg/dl
Isolated impaired glucose tolerance (IGT)	<100 mg/dl	140–199 mg/dl
IFG+IGT	100–125 mg/dl	140–199 mg/dl
Diabetes mellitus	≥126 mg/dl	≥200 mg/dl

Tabelle 1. Grenzwerte der Blutglukose bei venöser Blutentnahme

Daten aus den Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft zur Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus 2011 [10]

1 | Einleitung

1.2. Pathogenese des Typ-2 Diabetes

1.2.1. Insulinresistenz

Die Pathogenese des Typ-2 Diabetes ist gekennzeichnet durch eine bereits viele Jahre vor Diagnose des Typ-2 Diabetes auftretende Insulinresistenz in unterschiedlichen Geweben [14]. Die Insulinresistenz beschreibt eine ungenügende Wirkung des Hormons an seinen Zielorganen wie Muskel- oder Leberzellen [13].

Insulin bindet an den Insulinrezeptor, welcher sich in den meisten menschlichen Geweben findet, wobei seine Dichte mit mehr als 300.000 Rezeptoren pro Zelle in Leber- und Fettgewebe am höchsten ist [15]. Es gibt zwei verschiedene Isoformen des Insulinrezeptors. Isoform A wird vermehrt in fetalen Zellen und in Krebszellen exprimiert, während die Isoform B in differenzierten Zellen vorhanden ist und somit in adultem Gewebe die relevante Form ist [16]. Die Affinität von Insulin ist höher zu der Isoform A als zu der Isoform B [16].

Die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins und eine Aktivierung seiner Kinaseaktivität. Dies ist der Beginn der Signaltransduktionskaskade des Insulins, wo verschiedene Insulinrezeptor-substrate eine Rolle spielen. Diese werden phosphoryliert und können im Anschluss weitere Proteine, wie z.B. die Phosphatidyl-3-Kinase, binden. Reguliert werden durch die Bindung des Insulins und die folgende Signaltransduktion unter anderem der Transport der Glukose, die Hemmung der Lipolyse und die Protein- und Glykogen-Synthese. Zudem besitzt Insulin eine anti-apoptotische Wirkung [15].

Obwohl es diese hohe Anzahl hepatischer Insulinrezeptoren gibt, kommt es im Rahmen eines Typ-2 Diabetes zu einer unterschiedlich ausgeprägten hepatischen Resistenz gegenüber der Wirkung des Insulins, die im Wesentlichen auf einer Modulation der Signaltransduktion beruht [17]. Dadurch kommt es zum Wegfall der physiologischen Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion. Trotz einer im Blut vorhandenen hohen Konzentration an Glukose und Insulin produziert die Leber weiterhin Glukose über die Glukoneogenese und Glykogenolyse und trägt damit zu einer weiter steigenden Blutglukosekonzentration bei. Begründet wird diese Resistenz gegenüber der physiologischen Insulinwirkung unter anderem durch erhöhte intrahepatische Fetteinlagerungen und erhöhte Konzentrationen von Lipotoxinen [18–20].

1 | Einleitung

Auch die Muskulatur ist postprandial mit 25% einer der Hauptabnehmer der Blutglukose. Eine Schlüsselrolle spielt dabei der insulinabhängige Glukosetransporter 4 (GLUT4). Im Fastenzustand sind diese Transporter größtenteils intrazellulär in Vesikeln gespeichert und werden nur auf einen insulinabhängigen Stimulus zur Zellmembran transloziert. Bei einem Typ-2 Diabetes ist dieser Regelkreis v.a. durch erhöhte Serumspiegel an freien Fettsäuren und in der Folge durch Erhöhung von intrazellulären Lipotoxinen gestört, so dass die Myozyten nicht mehr genügend Glukose aufnehmen können [21–24]. Der Glukosetransport und die Phosphorylierung der Glukose werden gehemmt und es kommt zudem zu einer verminderten Rekrutierung von GLUT4 an die Zelloberfläche [25–27].

In späteren Stadien der Insulinresistenz kommt es kompensatorisch zu einer Hyperinsulinämie [15].

Was als die primäre Ursache einer Insulinresistenz anzusehen ist, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass eine hyperkalorische Kost kombiniert mit Bewegungsarmut negativen Einfluss auf die physiologische Insulinwirkung hat. Auch ein höheres Alter und eine genetische Prädisposition sind weitere Risikofaktoren.

1.2.2. Insulinsekretion

1.2.2.1. Insulinbiosynthese und -abbau

Insulin ist ein aus 51 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon, dessen zwei Ketten durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die Synthese findet in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas statt. Kodiert wird Insulin auf dem Chromosom 11. Zunächst entsteht während der Translation im rauen endoplasmatischen Retikulum das Präproinsulin. Nach Faltung und Bildung von Disulfidbrücken wird eine Signalsequenz des Präproinsulins abgespalten. Es entsteht Proinsulin, welches sich aus der A- und B-Kette, verbunden durch das C-Peptid-Fragment, zusammensetzt. Proinsulin wird im Golgi-Apparat gespeichert. Als letzter Schritt der Insulinsynthese kommt es durch eine im Golgi-Apparat vorhandene membranständige Protease zu einer Abspaltung des C-Peptids vom Insulin [15] (**Abb. 1**).

1 | Einleitung

Das abgespaltene C-Peptid wird zusammen mit Insulin in den Vesikeln der β -Zellen gespeichert und mit diesem in äquimolaren Mengen freigesetzt. Im Gegensatz zum Insulin unterliegt es de facto keiner hepatischen Extraktion, sodass in frühen Phasen einer Insulinfreisetzung die eigentliche Insulinsekretion besser über die C-Peptidspiegel berechnet und über das Verhältnis von Insulin und C-Peptid die hepatische Extraktion des Insulin abgeschätzt werden kann. Da das C-Peptid jedoch eine längere Halbwertszeit als Insulin hat, werden bei längerfristigem Beobachtungsverlauf die Verhältnisse von C-Peptid und Insulin zueinander für die genannten Beobachtungen verfälscht [15].

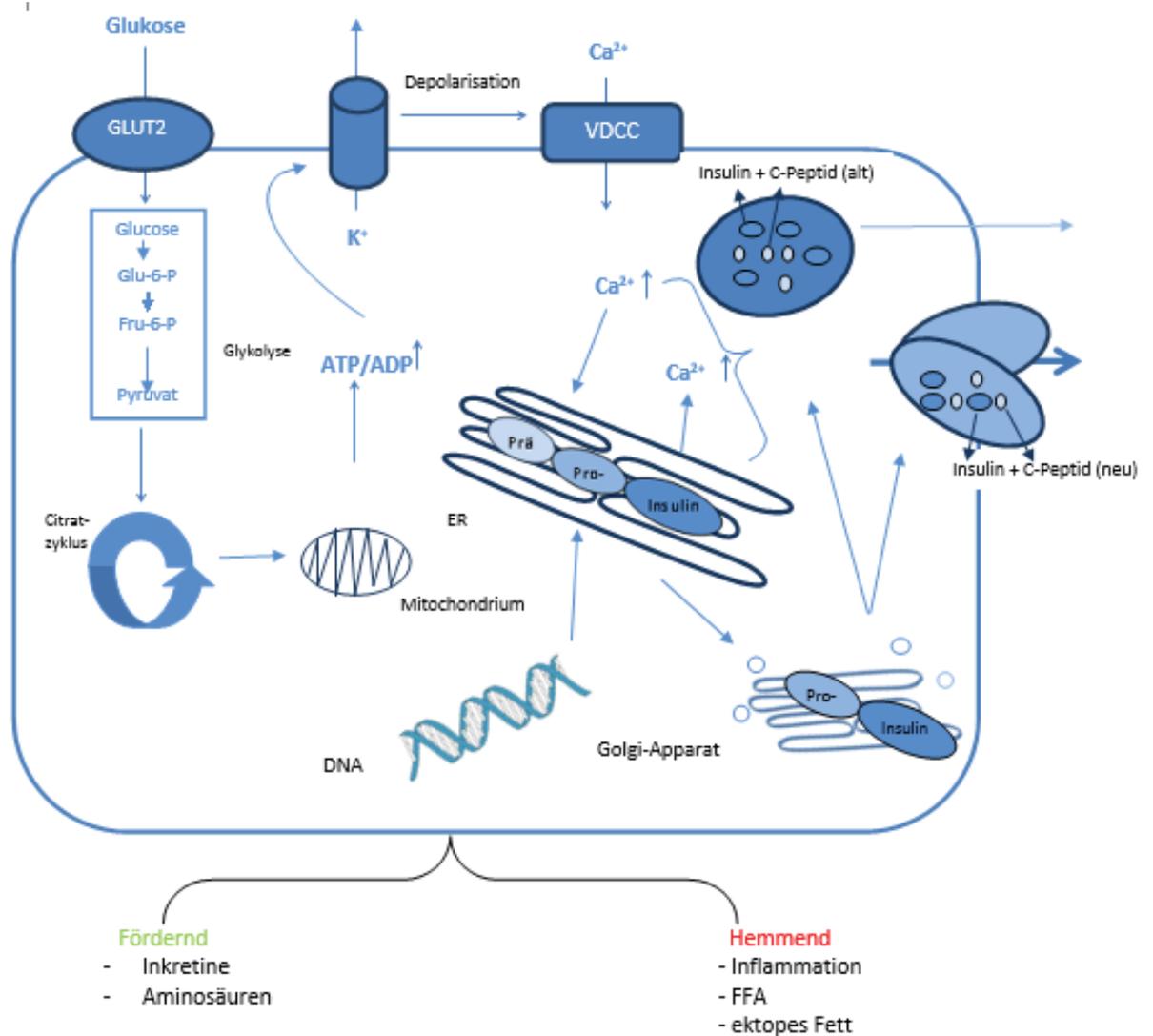


Abbildung 1: Insulinfreisetzung aus den β -Zellen (modifiziert nach [15]).

GLUT2: Glukose-2-Transporter, Glu-6-P: Glukose-6-Phosphat, Fru-6-P: Fructose 6 Phosphat, Pyr: Pyruvat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, ER: Endoplasmatisches Retikulum, VDCC: Voltage-dependent-calcium-channel (spannungsabhängiger Calcium Kanal), K^+ : Kalium, Ca^{2+} : Calcium.

1 | Einleitung

Den Hauptabbauort des Insulins stellt die Leber dar. C-Peptid hingegen wird hauptsächlich von den Nieren ausgeschieden [28]. Aber auch Proinsulin findet sich in der Blutbahn. Wird in Phasen des erhöhten Insulinbedarfs mehr Proinsulin von den β -Zellen synthetisiert, kann es zu einer Übersättigung aller Proinsulin spaltenden Enzyme und damit einer fehlenden Verfügbarkeit dieser kommen. Zu diesem Zeitpunkt wird auch Proinsulin von der β -Zelle in die Blutbahn sezerniert. Peripheres Proinsulin stellt somit einen Marker für eine beginnende Erschöpfung der β -Zellfunktion dar [29].

1.2.2.2. Physiologische Insulinsekretion

Wie bereits beschrieben wird Insulin in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas produziert. Dieser endokrine Teil des Pankreas beinhaltet neben den zentral in den Inseln liegenden β -Zellen, die zwischen 60% und 80% einer Insel ausmachen, noch die peripher liegenden, Glukagon sezernierenden α -Zellen (15-20% der Zellmasse der Insel) und 5-10% δ -Zellen, welche Somatostatin sezernieren [15].

Die Glukose gelangt mittels erleichterter Diffusion durch den GLUT2 Transporter in der β -Zellmembran des Pankreas (**Abb. 1**) in die Zelle, wo sie durch das Enzym Glukokinase phosphoryliert wird und dann die Glykolyse durchläuft. Sowohl die Glukokinase als auch der Glukosetransporter haben eine geringe Affinität zu Glukose und reagieren daher auf ein erhöhtes Angebot an extrazellulärer Glukose unmittelbar mit einer Aktivitätssteigerung. Die Phosphorylierung durch die Glukokinase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Verarbeitung der Glukose.

Das am Ende der Glykolyse anfallende Pyruvat wird nun durch den Zitratzyklus und die Atmungskette weiter zu Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Der ATP/ADP (Adenosindiphosphat) Quotient steigt an und dadurch verschließt sich der β -Zell-spezifische ATP-abhängige Kaliumkanal, die intrazelluläre Kaliumkonzentration steigt an und führt zur Depolarisation der Zellmembran. Die Depolarisation bewirkt ein Öffnen von spannungsabhängigen Calciumkanälen der β -Zellmembran, einem Einstrom in die β -Zelle und einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Calciumanstieg öffnet Calcium-abhängige Calciumkanäle im Endoplasmatischen Retikulum der Zellen und führt zu einem zusätzlichen Ausstrom von Calcium in den Intrazellulärraum.

1 | Einleitung

Die nun intrazellulär vorliegende hohe Konzentration an Calcium bewirkt die Exozytose von Insulin, welches in Vesikeln gespeichert in der Zelle vorliegt.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass es zwei unterschiedliche Pools von Insulinvesikeln gibt. So wird neu synthetisiertes Insulin als „readily-released pool“ (10%) in anderen Vesikeln gespeichert, welche sich näher an der Zellmembran befinden, als bereits längere Zeit bestehendes Insulin „reserve pool“ (90%). Zudem wird das neu synthetisierte Insulin durch seine direkte Verfügbarkeit präferiert ausgeschüttet.

Während die Ausschüttung des Insulins aus dem „readily-released pool“ ohne weitere Signalschritte erfolgen kann [30–32], muss der „reserved pool“ einigen weiteren ATP-, Ca^{2+} -, temperatur- und zeit- abhängigen Reaktionsschritten unterzogen werden, bevor das Insulin durch die Exozytose freigesetzt werden kann [32]. So bewirkt die durch einen erhöhten Blutglukosespiegel ausgelöste Zelldepolarisation mit anschließender Ausschüttung von Ca^{2+} eine Modifikation des „reserved pools“ Richtung „readily-released pool“, ebenso wie der ATP-Anstieg. All dies erklärt eine zweiphasige Insulinsekretion mit einer raschen Insulinausschüttung zu Beginn, gefolgt von einer langsameren Ausschüttung des „reserved pool“.

Obwohl die Höhe der Blutglukosespiegel der primäre Regulator der Insulinsekretion ist, spielen auch andere Stimuli eine entscheidende Rolle. So wird durch verschiedene Enterohormone die Sekretion zusätzlich gesteigert, was die erhöhte Insulinausschüttung bei oraler Glukoseaufnahme im Vergleich zur parenteralen Glukoseapplikation erklärt. Auch Aminosäuren, Fettsäuren und eine Aktivierung des Parasympathikus modifizieren die Insulinsekretion [11]. In Kapitel 1.2.2.4 werden die verschiedenen Mechanismen, die zur einer Veränderung der Insulinsekretion führen können, näher erläutert.

1.2.2.3. Messmethoden der Insulinsekretion

Bei der Abschätzung der Insulinsekretion existiert kein Goldstandard. Man kann einfache Tests, die lediglich Nüchternwerte benötigen, von dynamischen Tests unterscheiden, die wiederum verschiedene Qualitäten der Insulinsekretion untersuchen. Bei den dynamischen Test kann wiederum zwischen oralen Tests wie beispielsweise dem oGTT, und intravenösen Test, wie einem intravenösen Glukosetoleranztest oder einem Clamp, unterschieden werden.

1 | Einleitung

1.3.2.3.1. Einfache Tests zur Bestimmung der Insulinsekretion

Vor allem in großen epidemiologischen Studien wird entweder der HOMA-B empirisch aus dem Nüchternblutglukose und dem Nüchterninsulinspiegel berechnet [33] oder durch die Bestimmung des Verhältnisses von Proinsulin zu Insulin zur Abschätzung der β -Zelldysfunktion [34].

1.3.2.3.2. Dynamische Tests nach Substratexposition

Hierunter fallen einerseits die intravenöse Gabe eines Glukosebolus mit nachfolgender Messung der Glukose-, Insulin und ggf. auch C-Peptidspiegel im Sinne eines Provokationstests, sowie die oralen Stimulationstests mit standardisierten Glukoselösungen (z.B. Dextro-o.G.T.) oder standardisierten Mahlzeiten (mixed meal tolerance tests, MTT) [35]. Während die oralen Tests die physiologische Situation am besten widerspiegeln, können intrinsische Defekte der β -Zellen allerdings nicht von Störungen in der enteralen Ache differenziert werden. Beide resultieren in einer eingeschränkten β -Zellfunktion [35].

Intravenöser Glukosetoleranztest (IVGTT)

Für diesen Test wird ein standardisierter Bolus Glukose i.v. injiziert und typischerweise die erste schnelle Phase der Insulinsekretion bestimmt. Wird zusätzlich auch die zweite Phase der Insulinsekretion gemessen, kann aus diesem Test auch die Insulinsensitivität über mathematische Berechnungen (minimal model) bestimmt werden [35, 34].

Oraler Glukosetoleranztest (oGTT) und mixed meal Test (MMT)

Aus beiden oralen Tests können prinzipiell die gleichen Indizes zur Bestimmung der Insulinsekretion und der Insulinsensitivität abgeleitet werden. Benötigt werden hierfür Glukose, Insulin und C-Peptid-Werte zum Nüchternzeitpunkt und jeweils 30, 60 und 120 Minuten nach dem Trinken einer definierten Glukoselösung.

Insulinogenic index (IGI)

Zur Bestimmung der β -Zell Funktion dient der Insulinogenic index (ISI) [36]. Um die frühe Insulinsekretion zu berechnen, benötigt man entweder die Insulin- oder C-Peptidwerte sowie die Glukosewerte zu den Zeitpunkten 0 und 30. Der IGI-Insulin (IGI-I) spiegelt vor allem das frühe Erscheinen des Insulin in der Zirkulation wider.

1 | Einleitung

Da das C-Peptid die pankreatische Insulinsekretion besser darstellt, da es im Gegensatz zum Insulin keiner schwankenden hepatischen Extraktion unterliegt, wird hier besser das C-Peptid zur Berechnung verwendet und damit der IGI-Cp-Peptid (IGI-CP) bestimmt.

Wird die gesamte Fläche unter der Insulin- bzw. C-Peptidkurve sowie der Glukosekurve verwendet, kann so die totale Sekretion (IGI-I_{tot} bzw. IGI-CP_{tot}) bestimmt werden.

OGIS (Oral Glucose Insulin Sensitivity)

Die Berechnung des OGIS dient der Bestimmung der Insulinsensitivität aus dynamischen Daten des oGTT mithilfe eines empirischen mathematischen Modells. So erhält man Daten zur Insulinsensitivität ohne die Durchführung eines sowohl kosten- als auch zeitaufwändigen Clamps, welcher jedoch immer noch der Goldstandard zur Bestimmung der Insulinsensitivität ist. Validiert wurde der OGIS für die Benutzung eines 75 g oGTT [37]. Hierbei muss die Glukosekonzentration zu den Zeitpunkten 0, 90 und 120 Min. sowie die Insulinkonzentration zu den Zeitpunkten 0 und 90 Min. bestimmt werden [37].

Disposition Index (DI)

Der Disposition Index (DI) stellt die posthepatische Insulinsekretion adjustiert für die jeweils vorherrschende Insulinsensitivität dar [38]. Er berechnet sich aus dem Produkt der Insulinsensitivität (OGIS) und der totalen Insulinsekretion, bestimmt als IGI-I_{tot}.

Adaptation Index (AI)

Der Adaptation Index (AI) ist dem gegenüber ein Maß für die prähepatische Insulinsekretion, ebenfalls adjustiert für die bestehende Insulinsensitivität und berechnet sich als das Produkt der Insulinsensitivität (OGIS) und der prähepatischen Betazellfunktion (IGI-CP_{tot}) [39].

1.3.2.3.3 Dynamische Tests unter Verwendung von Clamp-Untersuchungen

Mit Hilfe eines hyperinsulinämischen Clamp bestimmt man die Sensitivität eines Probanden auf die intravenöse Insulingabe. Durch gleichzeitige Gabe von Glukose und kontinuierlicher Messung der Blutglukosewerte erhält man Informationen

1 | Einleitung

darüber, wie sensitiv die Körperzellen auf Insulin reagieren und dadurch die Glukose aufnehmen. Im Vergleich zum oGTT kann man also spezifisch eine Insulinresistenz feststellen, wohingegen bei einem pathologischen oGTT sowohl eine Insulinresistenz als auch eine gestörte Insulinsekretion vorliegen kann. Beim hyperglykämischen Clamp kann durch Infusion einer Glukoselösung und nachfolgender Messung der endogenen Insulinausschüttung eine Aussage über die Insulinsekretion gemacht werden. Mit einer zusätzlichen Argininstimulation misst man die Insulinsekretion in Folge einer Aminosäurestimulation, welche die β -Zelle zur maximalen Sekretion anregt. Der Vorteil der Clamp Methode gegenüber dem oGTT ist eine kontinuierliche Messung der Insulinwerte [35, 40].

1.2.2.4. Modifikatoren der Insulinsekretion

Inkretine

Als Inkretine bezeichnet man die aus der Darmschleimhaut sezernierten Hormone Glucagon-like peptide (GLP-1) und Glucose dependent insulinotropic peptide (GIP). GIP wird in den K-Zellen produziert, welche sich vor allem im proximalen Anteil des Dünndarms befinden, mit einer besonders hohen Anzahl im Duodenum. GLP-1 wird von den L-Zellen sezerniert, welche im Ileum und Colon lokalisiert sind [41]. Inkretine bewirken eine gesteigerte Insulinsekretion und eine verminderte Glukagonausschüttung. Dies bewirken sie, indem sie einerseits zu einer Steigerung der Insulinbiosynthese führen, andererseits die Zellproliferation der β -Zellen stimulieren und die Zellapoptose verhindern [41].

Als primärer Stimulus für die Ausschüttung der Inkretine gilt eine orale Nahrungsaufnahme und damit das Vorhandensein von Nährstoffen im Darmlumen. Sowohl oral aufgenommene Kohlenhydrate, Proteine als auch Fette bewirken dabei eine Inkretinausschüttung, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß [41].

Vergleicht man die Insulinsekretion nach der oralen Glukoseaufnahme mit der Sekretion nach intravenös applizierter Glukoselösung, sieht man eine deutliche Abhängigkeit der Insulinsekretion von der Sekretion der Inkretinhormone [42, 43]. Die Konzentrationen von GLP-1 und GIP unterscheiden sich zudem zwischen Probanden mit IFG und IGT, so dass die unterschiedliche β -Zellfunktion in diesen beiden prädiabetischen Gruppen möglicherweise auch von der Inkretinsekretion abhängt. Die Literatur ist hier jedoch widersprüchlich. So zeigte sich eine gestörte Sekretion von GIP bei Probanden mit einer IGT, aber nicht bei Probanden mit einer IFG [42]. Weitere Daten zeigen jedoch nur in den ersten 30 Minuten nach einem

1 | Einleitung

oralen Glukosetoleranztest eine geringere Inkretinausschüttung bei Probanden mit einer gestörten Glukosetoleranz. Führt man nach 180 Minuten eine erneute Blutentnahme durch zeigt sich kein Unterschied in der Inkretinausschüttung zwischen Probanden mit einer normalen Glukosetoleranz und denen mit einer gestörten Glukosetoleranz (IGT) [44].

Patienten mit einem bereits diagnostizierten Diabetes mellitus haben eine signifikant geringere Inkretinausschüttung als Gesunde [43], die zudem nicht auf erhöhte Plasmaglukosespiegel reagiert. Hier kommt es auch in hyperglykämischen Situationen zu einer annähernd konstanten erniedrigten Inkretinausschüttung [45].

Aminosäuren

Auch Aminosäuren bewirken eine gesteigerte Insulinsekretion. Dies geschieht nicht nur wie zuerst angenommen ausschließlich im Beisein von Glukose. An der Aminosäure Leucin konnte gezeigt werden, dass diese eine direkte Stimulation der Glutamatdehydrogenase, damit eine gesteigerte Aminosäureoxidation, eine erhöhte Konzentration von ATP und so eine gesteigerte Insulinsekretion bewirkt [46]. Aber auch eine Mischung aus 10 verschiedenen essentiellen Aminosäuren bewirkt eine gesteigerte Insulinsekretion und dies in höherem Ausmaß als es Leucin alleine bewirkt, was darauf schließen lässt, dass weitere verzweigtkettige und aromatische Aminosäuren an der gesteigerten Insulinsekretion beteiligt sind [47]. Da Aminosäuren gleichzeitig die Glukoneogenese stimulieren und die Insulinsekretion steigern, bleibt der Glukosehaushalt bei Gesunden im Gleichgewicht [48].

Inflammation

Eine Hyperglykämie bewirkt zunächst eine Steigerung der Insulinsekretion durch Proliferation pankreatischer β -Zellen. Chronifiziert die Phase der Hyperglykämie, nimmt die β -Zell Funktion jedoch immer weiter ab und bewirkt somit eine verminderte Insulinsekretion. Diese negativen Effekte einer chronisch erhöhten Blutglukosekonzentration bezeichnet man als Glukotoxizität, bei der durch die Hyperglykämie ausgelöste inflammatorische Prozesse eine wichtige Rolle spielen. So kommt es durch gesteigerte Glukosespiegel zu einer erhöhten Produktion von Interleukin (IL)-1 β . IL1 β wird sowohl von verschiedenen Immunzellen als auch von den β -Zellen selbst sezerniert und führt im Sinne einer Autostimulation zu einem weiteren Anstieg seiner Sekretion [49]. Zudem führt IL1 β zu einem Einwandern von

1 | Einleitung

Makrophagen in die Langerhans'schen Inseln sowie zu einer zusätzlichen Freisetzung von IL1 β und anderen proinflammatorischen Zytokinen durch die eingewanderten und aktivierten Makrophagen [50].

Diese Mechanismen bewirken eine intrapankreatische Inflammation, eine Aktivierung des Fas-Rezeptors und damit letztendlich eine Apoptose der β -Zellen [51–53].

Die gesteigerte Ausschüttung von IL-1 β wird über eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren ausgelöst, die durch Glukose induziert wird. Glukose selber stellt zwar keinen Liganden der Toll-like Rezeptoren dar, im Gegensatz zu beispielsweise freien Fettsäuren, Fibrinogen oder verschiedenen Hitzeschockproteinen [51], führt jedoch zu einer gesteigerten Ausschüttung von High-Mobility-Group-Protein 1 (HMBG1). Dieses Protein, welches auch bei einer Nekrose freigesetzt wird, dient als Ligand der Toll-like-Rezeptoren [54]. Zusätzlich wird die Sekretion weiterer proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 und IL-8, stimuliert, die u.a. durch Makrophagen ausgeschüttet werden.

So sind die inflammatorischen Prozesse eine Folge einer beim Typ-2 Diabetes auftretenden Hyperglykämie, verstärken diese aber zudem im Sinne eines Circulus vitiosus.

Auch freie Fettsäuren können eine Inflammation auslösen, deren Rolle im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

Freie Fettsäuren (FFA)

Akut wirken freie Fettsäuren zunächst als Stimulator für die Insulinsekretion. Sie aktivieren einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR40), durch den eine gesteigerte Insulinsekretion induziert wird [55]. In einem chronischen Stadium des Überangebots von freien Fettsäuren kommt es jedoch zu einer Beeinträchtigung von sowohl Insulinsynthese als auch Insulinsekretion. Ein Grund dafür ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) in den Mitochondrien der β -Zelle, die bei der Metabolisierung von FFA anfallen und sich negativ auf die Funktion der Zellen auswirkt [56]. Eine entscheidende Rolle dabei spielt aber auch das durch freie Fettsäuren induzierte Zytokin IL1 β , welches eine Entzündungsreaktion innerhalb der Langerhans'schen Inseln bewirkt [51].

Wird das Pankreas im Mausmodell über einen längeren Zeitraum erhöhten Spiegeln an freien Fettsäuren ausgesetzt, reagieren die β -Zellen weniger sensibel auf

1 | Einleitung

Glukose und die Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) nimmt ab. Eine wichtige Rolle dabei spielt das Uncoupling Protein 2 (UCP2), welches sich an der Zellmembran der Mitochondrien befindet und als Ionentransporter fungiert. Erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren und eine erhöhte Bildung von ROS in den β -Zellen bewirken sowohl eine erhöhte Aktivität als auch eine erhöhte Expression des UCP2, wodurch die Bildung von ROS in den β -Zellen vermindert und eine protektive Wirkung erreicht wird. Auf der anderen Seite vermindern die erhöhten UCP2-Spiegel durch die Entkopplung der Atmungskette die ATP-Bildung und damit den ATP/ADP-Quotienten, was in einer verminderten GSIS resultiert [57, 58].

In vitro führen vor allem gesättigte Fettsäuren, wie Palmitinsäure, zu einer Induktion von ROS, einer Störung der mitochondrialen Funktion und einer Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen, ungesättigte Fettsäuren hingegen (z.B. Ölsäure) zeigen diese Effekte nicht [59]. Ob diese Effekte auch in vivo eine Rolle spielen, wird bisher kontrovers diskutiert.

Durch freie Fettsäuren steigt die Zahl apoptotischer Zellen und auch die Anzahl proapoptotischer Gene nimmt zu [60]. Die Apoptose wird eingeleitet durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren (TLR). Vor allem die TLR 2 und 4 spielen dabei im Mausmodell eine wichtige Rolle, indem sie verschiedene Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)- abhängige und -unabhängige Signalwege aktivieren und so z.B. durch NF- κ B Aktivierung zur Zellapoptose oder zu einer Störung der Insulingenexpression führen [61]. Dieser Prozess beschleunigt sich, wenn zusätzlich zu erhöhten Spiegeln an freien Fettsäuren noch eine erhöhte Glukosekonzentration vorliegt.

Die oben genannten Effekte können durch im Blut frei zirkulierende Fettsäuren bewirkt werden. Fettsäuren können aber auch lokal in Zellen des Pankreas gespeichert werden und einen direkten toxischen Effekt ausüben. Diese lokale Fettspeicherung in Geweben außerhalb des Fettgewebes bezeichnet man als ektopische Fettspeicherung.

Ektopische Fettspeicherung

Übergewicht ist ein ausschlaggebender Punkt in der Entwicklung einer Insulinresistenz. Hochkalorische Ernährung, kombiniert mit körperlicher Inaktivität führen zu einer erhöhten Anzahl an gespeicherten Triglyzeriden in den Adipozyten [62]. In weiter fortgeschrittenen Stadien werden Triglyzeride zudem in Arealen

außerhalb des Fettgewebes gespeichert. Diese sogenannte ektope Fettspeicherung führt zur Fetteinlagerung in Zellen der inneren Organe, einer Steatosis, und einer daraus möglicherweise resultierenden Fehlfunktionen der Organe [63, 64]. Nach heutigem Wissensstand ist eine der Ursachen einer peripheren Insulinresistenz im Muskelgewebe eine Akkumulation von ektopem Fett in den Myozyten [65, 64]. Im Herzmuskel dagegen kommt es zur Abnahme der diastolischen Funktion [66].

Beim Menschen können nicht nur Übergewicht, sondern auch virale Infektionen, Chemotherapie oder Alkoholabusus zu einer Pankreassteatose führen. Eine eindeutige Korrelation dieser Steatose mit einer klinischen Erkrankung wie dem Typ-2 Diabetes, Pankreaskrebs oder einer Pankreatitis konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden [67].

Ob ein erhöhter Fettgehalt des Pankreas die Insulinsekretion beeinflusst, wird in den nachfolgenden Kapiteln weiter dargestellt. Zunächst sollen die verschiedenen Messmethoden zur Bestimmung des ektopen Fettgehaltes dargestellt werden.

1.2.3. Messmethoden des Fettgehaltes in Organen

Verschiedene Möglichkeiten stehen zur Verfügung, um den Fettgehalt in Geweben zu bestimmen. Unterschieden wird hierbei zwischen invasiven Methoden, wie der Gewebebiopsie, und nicht-invasiven Methoden wie z.B. dem Ultraschall, der Computertomographie oder der Magnetresonanztomographie (MRT).

Gewebebiopsien beim Menschen sind stark beschränkt durch ihre Invasivität und einer ungenügenden Darstellung des gesamten Organs. So kann es passieren, dass man eine Biopsie eines fettfreien Organanteils erhält, oder dass es zu einer Verunreinigung durch umliegendes Fettgewebe kommt [64]. Das Pankreas kann mit Hilfe der Computertomographie oder auch mit einer Endosonographie perkutan biopsiert werden. Multiple Risiken einer Biopsie, beispielsweise Blutungen, Nachblutungen, Verletzung von Nachbarorganen oder Infektionen, erklären die eingeschränkte Nutzbarkeit dieser Methode im Rahmen einer Studie an gesunden Probanden.

Weitere invasive Methoden sind beispielsweise eine Probenentnahme während einer Operation oder während einer Autopsie. Die Proben werden zur Bestimmung des Fettgehalts getrocknet und durch eine Bestimmung des Gesamttriglycerins der Neutralfettanteil berechnet.

1 | Einleitung

Im Bereich der nicht-invasiven Methoden unterscheidet man semiquantitative Methoden (Fettgehalt kann in verschiedene Gruppen eingeteilt werden [zum Beispiel: wenig Fett, mäßig Fett, viel Fett], jedoch keiner genauen Maßeinheit zugeordnet werden) von quantitativen Methoden wie der ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS).

Als semiquantitative Methode, um den Fettgehalt zu bestimmen, gelten der Ultraschall und die Computertomographie. Im Ultraschall stellt sich eine Pankreassteatose als eine Vermehrung der Echogenität dar. Jedoch ist es vor allem bei adipösen Patienten oftmals schwierig das Pankreas im Ultraschall gut zu visualisieren. Hinzu kommt, dass sich auch eine Pankreasfibrose als eine Vermehrung der Echogenität darstellt. So ist der Ultraschall als Screeningmethode eher ungeeignet [67].

Auch mithilfe der Computertomographie kann der Pankreasfettanteil lediglich annähernd (semi-quantitativ) bestimmt werden [68, 69]. Das Pankreas enthält sowohl interlobuläres als auch perivaskuläres Fett. Zudem befindet sich ein geringer Anteil des Fettes innerhalb der Azinuszellen. Azinuszellen und Fettgewebe besitzen in der Computertomographie jedoch eine unterschiedliche Dichte. Mithilfe einer speziellen Software (Vitrea 2 sculpt tool) kann das Pankreas in der Computertomographie fettfrei dargestellt werden. Der Pankreasfettanteil kann dann gemessen werden als totales Pankreasvolumen – parenchymales Pankreasvolumen. Das Pankreasvolumen nimmt während der Kindheit zu, wobei die Relation von Pankreasgewebe zu Pankreasfett konstant bleibt. Im Alter zwischen 20-60 Jahren ändert sich das Pankreasvolumen nur wenig. Anschließend steigt v.a. der pankreatische Fettanteil. Zudem zeigte sich eine starke Korrelation zwischen Pankreasfettanteil und BMI, jedoch keine positive Korrelation zwischen Pankreasfett und Typ-2 Diabetes [69].

Möchte man eine quantitative Aussage über den Fettgehalt treffen, sollte man die ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (MRS) wählen [64, 70], welche auf dem Prinzip der Magnetresonanztomographie (MRT) beruht. Unterschiedlich ist jedoch das Ergebnis. Anders als bei der MRT, erhält man kein Bild, sondern ein Intensitätsspektrum. Da verschiedene Moleküle unterschiedliche Resonanzeigenschaften besitzen und die verschiedenen Gewebe im Körper unterschiedlich zusammengesetzt sind, kann man sie mit Hilfe der MRS differenzieren und graphisch als Spektrum darstellen. In diesem Spektrum steht

1 | Einleitung

jeder Peak für einen bestimmten Metaboliten, was es ermöglicht z.B. in einem bestimmten Volumen den Fettgehalt als Peak in einem Spektrum darzustellen. Wasserstoff eignet sich hierbei besonders gut für die Spektroskopie, da es in jedem Gewebe vorhanden ist und eine gute Sensitivität aufweist.

Diese Methode ermöglicht bereits den Triglyceridgehalt im Muskel, in der Leber und im Herzen zu bestimmen. Im Tiermodell erbrachte die MRS Messung des Pankreasfettanteils gleich gute Werte wie eine post-mortem Bestimmung [71]. In einer Vergleichsmessung bei obesen Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Ratten und schlanken Kontrolltieren zeigte sich eine gute Korrelation zwischen der Bestimmung des pankreatischen Triglyceridgehaltes in der MRS und der biochemischen Bestimmung des Lipidgehaltes post mortem. Zur Bestimmung des Pankreasfettanteils in der MRS wurde das Pankreas den Tieren entnommen, in ein Messgefäß mit Wasser überführt und der Triglyceridgehalt per Spektroskopie bestimmt. Zur biochemischen Bestimmung wurde das Pankreas direkt nach der Entnahme eingefroren und der Triglyceridgehalt mit der Folch Methode gemessen [63]. Die Magnetresonanzspektroskopie zeigte zudem bei humanen Probanden eine gute Reproduzierbarkeit [71, 63, 72].

Dabei erfolgt in der Regel eine Bestimmung des Gesamtfettgehaltes des Pankreas, wobei die Fettverteilung im Pankreas sehr inhomogen ist. Neben Regionen mit erhöhtem Fettgehalt finden sich so auch Regionen, welche ganz frei von ektopen Fetteinlagerungen sind [72]. Eine alleinige Messung des Fettgehalts in den β -Zellen des Pankreas ist bisher nicht möglich.

1.2.4. Assoziation von Pankreasfettgehalt und Insulinsekretion

1.2.4.1. In vitro Daten

Viele Studien haben sich bereits mit den toxischen Auswirkungen erhöhter Konzentrationen von freien Fettsäuren auf die β -Zellfunktion in vitro beschäftigt. Hierbei kann eine ektoper Fetteinlagerung nur über die Inkubation der β -Zellen zusammen mit hohen FFA-Konzentrationen simuliert werden.

Gezeigt hat sich auf einen akuten Stimulus mit nicht-veresterten freien Fettsäuren hin eine sowohl erhöhte GSIS als auch eine erhöhte Glukose-unabhängige Insulinsekretion [73]. Bei einer chronischen Exposition in vitro verringert sich hingegen alleine die GSIS [74].

1 | Einleitung

Viele Studien untersuchen jedoch nicht die alleinige toxische Wirkung erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren, sondern direkt die Kombination aus erhöhten Glukose und erhöhten Fettsäurespiegeln, beispielsweise mit einer Lösung aus Glukose und Palmitat. Eine 72-stündige Bebrütung der β -Zellen mit diesen erhöhten Glukose- und Lipidkonzentrationen führte bereits zu einer verringerten GSIS, verringerten Glukosetransportern und damit einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zellen, einer reduzierten Mitochondrienaktivität und somit einer verminderten Insulinsekretion. Zudem konnte eine Reduktion der Calcium Konzentration, eine verminderte intrazelluläre Insulinkonzentration und eine reduzierte Fähigkeit der Insulinausschüttung gezeigt werden [75–78].

Es konnte aber auch eine Reversibilität dieser schädlichen Auswirkungen gezeigt werden, welche jedoch zeitabhängig war [78].

Um die Situation nicht nur in vitro darzustellen, sondern in vivo genauer zu simulieren, wurden einige Studien am Tiermodell durchgeführt.

1.2.4.2. Tiermodelle

Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte pankreatische Fetteinlagerung zu einer verminderten Anzahl der β -Zellen im Pankreas führen kann [63, 79, 58].

In obesen ZDF (Zucker Diabetic Fatty) Ratten zeigte sich ein höherer pankreatischer Gesamtfettgehalt im Vergleich zu altersgemachten schlanken Kontrolltieren. Eine Unterscheidung zwischen intrazellulärem und interzellulärem Fett erfolgte nicht. Mit zunehmender Störung des Glukosestoffwechsels und zunehmendem Alter stieg der pankreatische Fettgehalt in den ZDF Ratten an, während er in den Kontrolltieren ohne Stoffwechselstörung konstant blieb [63].

Bevor es zu einer ektopen Fetteinlagerung im Pankreas kam, zeigten sich bei den ZDF Ratten chronologisch zunächst erhöhte systemische Triglyzeridspiegel ohne Einschränkungen der Insulinsekretion und somit mit normalen Plasmaglukosekonzentrationen. Erst nach einigen Wochen des erhöhten Angebotes an Triglyzeriden, kam es zu einem Stadium der Hyperglykämie durch Abnahme der Anzahl an β -Zellen und somit verminderter Insulinsekretion [79].

Allerdings konnte im Mausmodell an prädiabetischen Tieren auch gezeigt werden, dass diese Vorgänge reversibel sind. Eine Reduktion der Hyperlipidämie bewirkte einen vermehrten Einbau von GLUT2 in die β -Zellmembran, ein erhöhtes

1 | Einleitung

Ansprechen der Insulinsekretion auf erhöhte Plasmaglukosekonzentrationen und eine Reduktion des Pankreasfettgehalts [58].

Nun stellt sich die Frage, ob diese negativen Effekte, die man bei einem Vorhandensein erhöhter Plasmaspiegel an freien Fettsäuren findet, auch bei einer lokalen Fetteinlagerung in den pankreatischen β -Zellen eine Rolle spielen und, ob diese lipotoxischen Effekte auch beim Menschen zu einer Abnahme der β -Zellfunktion führen. Mit letzterem haben sich verschiedene Forschungsgruppen beschäftigt.

1.2.4.3. Humane Studien

Im Gegensatz zu dem in vitro und im Tiermodell gezeigten Zusammenhang zwischen Insulinsekretion und ektooper Fetteinlagerung oder erhöhten FFA-Spiegeln, sind die Daten aus humanen Studien widersprüchlich.

Während in einigen Studien eine negative Assoziation zwischen Pankreasfettgehalt und Insulinsekretion im oGTT [80, 81], ermittelt mittels ^1H -MRS, beobachtet werden konnte, war diese Assoziation bei Erfassung der Insulinsekretion mithilfe des hyperglykämischen Clamp oder der Argininstimulation [82] nicht nachweisbar (Übersicht in **Tab. 2**).

Neben unterschiedlichen Ansätzen zur Berechnung der Insulinsekretion wurde auch der Pankreasfettgehalt unterschiedlich bestimmt. Während die Mehrzahl der Studien die ^1H -MRS verwendete [80, 82, 81], nutzen vereinzelte Studien die Computertomographie [83] zu Lasten einer schlechteren Quantifizierung und einer hohen Strahlenbelastung für die Probanden im Vergleich zur ^1H -MRS.

Studie	Probanden, Studiendesign	Messmethode		Hauptergebnis		Assoziation Insulinsekretion mit IGI
		Pankreas- fettgehalt	Insulin- sekretion	Pankreasfettgehalt	Assoziation Insulinsekretion	
[83]	Querschnittsstudie (n=154), davon T2D neu diagnostiziert (n=51) T2D >5J. (n=53) Kontrollgruppe (n=50)	CT	IGI	T2D neu 2,4 ± 2,0% T2D>5J. 4,0 ± 2,6% Kontrolle 1,9 ± 1,9%	Positive Korrelation mit IGI (p<0,01).	
[81]	Querschnittsstudie (n=51), davon NGT (n=28), IFG und oder IGT (n=23),	¹ H-MRS	Insulin Sekretion AUC (c- peptide)/ AUC (glukose)	IFG/IGT 8,3% ± 3,5, NGT 7,4 % ± 2,3	Negative Korrelation zur Insulinsekretion (r= -0,30) und Insulinausschüttung (r=-0,29)	
[84]	Querschnittsstudie (n= 36), davon T2D (n=12), NGT (n=24),	¹ H-MRS	IGI $\Delta I_{0-30}/\Delta G_{0-30}/HOMA_I$ R	T2D 20,4% (13,4–43,6), NGT 9,7% (7,0 –20,2)	Korrelation bei NGT (r=-0,644, p< 0.001) Keine bei T2D (r= 0,201, p : NS)	
[82]	Querschnittsstudie (n= 64), davon NGT (n=16), IFG (n=29), IFG/IGT (n=19);	¹ H-MRS	DI	NGT 7,6% (2,9 –13,4), IFG 12,1% (5,1–17,5), IFG/IGT 22,4%	keine Korrelation (r= -0,249, p < 0,05)	
[72]	Querschnittsstudie (n=56), davon NGT (n=28), IFG und oder IGT (n=14), T2D (n=14)	¹ H-MRS	Insulin Sekretion AUC (c- peptide)/ AUC (glukose)	NGT 1,95% (0,29-6,35) IFG/IGT 4,79% (1,55- 8,27), T2D 8,35% (5,64- 13,10)	Keine Korrelation bei NGT, IFT/IGT oder T2D Insulin secretion (p>0.7), AI (p>0.6), IGI (p>0.2)	

Tabelle 2: Übersicht der bisherigen Studien zur Assoziation von Pankreasfettgehalt und Insulinsekretion beim Menschen.

NGT: normal glucose tolerance, IFG: impaired fasting glucose, IGT: impaired glucose tolerance, T2D: Diabetes Typ-2, AUC: Area under the curve, HOMA_IR: Homeostasis Model Assessment für Insulinresistenz, CT: Computertomographie , IGI: Insulinogenic index , DI: Disposition index , AI: Adaptation index, NS: Nicht signifikant .

Studien mit CT und ¹H-MRS

Wie bereits beschrieben gibt es verschiedene Möglichkeiten den Pankreasfettgehalt zu bestimmen. Zuleisten einer schlechteren Quantifizierung und einer hohen Strahlenbelastung für die Probanden, kann man eine im Vergleich zur MRS preiswertere und besser verfügbare Computertomographie durchführen.

Vergleicht man die Insulinsekretion, bestimmt im oGTT mittels Insulinogenic index, mit der Pankreasfettmessung in der Computertomographie, zeigt sich eine Abnahme des Pankreasvolumens bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus und eine negative Korrelation zum Insulinogenic index. Der Pankreasfettanteil korreliert mit der Insulinresistenz ($p < 0,01$) [83].

In der ersten publizierten Studie mittels ¹H-MRS aus 2007 wurde der Gesamtfettanteil des Pankreas bei 12 Patienten mit Typ-2 Diabetes und 24 nicht-diabetischen Männern untersucht [80]. Für die β -Zellfunktion wurde aus den Insulin- und Glukosewerten während eines oGTT der Insulinogenic index, die frühe und späte Phase der Insulinsekretion und weitere Indices berechnet. Während der mittlere pankreatische Fettanteil mit 20,4% zwar in der Gruppe mit Typ-2 Diabetes verglichen zu 9,7% in der nicht-diabetischen Gruppe deutlich erhöht war, zeigte sich aber nur in der nicht-diabetischen Kontrollgruppe eine Korrelation zwischen Pankreasfett und Insulinsekretion. Möglicherweise spielen bei manifestem Typ-2 Diabetes weitere Faktoren neben dem Pankreasfett eine Rolle, sodass diese Assoziation überdeckt wird [80]. Allerdings konnte die negative Assoziation zwischen Insulinsekretion und Pankreasfettgehalt in einer weiteren Studie lediglich bei Probanden mit einem Prädiabetes, d.h. gestörter Glukosetoleranz und/oder gestörter Nüchternglukose, nicht aber bei stoffwechselgesunden Probanden nachgewiesen werden [81]. Diese negative Korrelation zeigte sich jedoch erst nach Adjustierung für die Insulinsensitivität, aber sowohl bei dem Zusammenschluss von Probanden mit IFG/IGT als auch bei Berechnung der Korrelation für jede einzelne Subpopulation. Zudem zeigte sich bei der Regressionsanalyse, dass der Pankreasfettgehalt einen größeren Einfluss auf die Insulinsekretion hat als der viszerale Fettgehalt [81]. Zwar wurden in beiden Studien vergleichbare Maße für die Insulinsekretion und die ¹H-MRS zur Quantifizierung des pankreatischen Fettgehaltes verwendet, allerdings sind in beiden Fällen die Gruppengrößen mit

1 | Einleitung

maximal 28 Probanden relativ klein, was die diskrepanten Ergebnisse insbesondere bei den normal-glukosetoleranten Probanden erklären könnte.

Eine weitere Studie wählte einen Clamp (kombinierter hyperinsulinämischer-euglykämischer Clamp und zudem hyperglykämischer Clamp mit Arginin Stimulation) zur Bestimmung der Insulinsekretion bei 29 Probanden mit einer gestörten Nüchternglukose, 16 mit einer gestörten Nüchternglukose und einer gestörten Glukosetoleranz und 16 gesunden Probanden in der Kontrollgruppe aus. Pankreas- und Leberfettgehalt wurden mit einer ^1H -MRS untersucht. Als Marker für die Insulinsekretion wurde hier der Disposition Index berechnet. Hierbei zeigte sich bei Probanden mit einer gestörten Glukosetoleranz oder eine kombinierten Störungen von Glukosetoleranz und Nüchternglukose zwar der höchste Anteil an pankreatischem Fett, eine Assoziation zur Insulinsekretion konnte jedoch nach Regressionsanalyse und Adjustierung für Alter und BMI nicht festgestellt werden [82]. Die Analyse erfolgte in der gesamten Studienkohorte ohne Unterscheidung zwischen NGT, IFG oder IFG/IGT. Kritisch betrachten sollte man die Verwendung des Disposition Index als einen Marker der Insulinsekretion, da dieser auch von der Insulinsensitivität der Probanden abhängt.

In den verschiedenen Studien unterschied sich zudem das Patientenkollektiv. Eine negative Assoziation von Pankreasfettanteil und Insulinsekretion konnte in Studien gezeigt werden, welche an Probanden mit einem manifesten Typ-2 Diabetes oder einer prädiabetischen Form litten. Bei Tushuizen et al. zeigten die kleinen Kohorten zudem teilweise eine schlechte Vergleichbarkeit zwischen Kollektiv und Kontrollgruppe mit signifikant erhöhtem BMI bei der Gruppe der Probanden mit Typ-2 Diabetes. Hier könnte auch ein erhöhter viszeraler Fettanteil in dieser Gruppe eine Erniedrigung der Insulinsekretion bewirkt haben, was in anderen Studien bereits gezeigt werden konnte [85, 86]. Da der viszerale Fettanteil nicht separat bestimmt wurde, lässt sich diese These nicht nachprüfen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Studien zwar einige Gemeinsamkeiten haben, sich aber auch in wesentlichen Aspekten unterscheiden und es zudem keine größere Studie gibt, die den Einfluss des Pankreasfettgehaltes auf die Insulinsekretion an einer nicht-diabetischen Population beschreibt. Da die

1 | Einleitung

Resultate stark variieren und die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen Pankreasfett und Insulinsekretion besteht, noch nicht abschließend geklärt ist, besteht Bedarf für eine weitere Studie zu diesem Thema.

1.3. Ziele der Arbeit

Der Widerspruch der bisher vorhandenen Studienergebnisse zeigt die Notwendigkeit einer größeren, an einer nicht-diabetischen Population durchgeführten Studie zur Untersuchung der Assoziation zwischen Pankreasfett und Insulinsekretion.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass ein erhöhter Pankreasfettanteil gemessen in der Magnetresonanztomographie negativ assoziiert ist mit der im oGTT gemessenen Insulinsekretion.

Primäres Ziel:

- Untersuchung der Assoziation von Pankreasfett gemessen mittels ^1H -MRS und Insulinsekretion mittels Insulinogenic index

Sekundäres Ziel:

- Identifikation möglicher Einflussfaktoren, z.B.
 - Alter
 - Geschlecht
 - BMI

2. Material und Methoden

2.1. Material

Verbrauchsmaterialien

- Venenverweilkanüle (Vasofix[®] Safety, 22G (blau), Artikelnummer: 4268091S-01; 20G (rosa), Artikelnummer: 4268113S-01, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)
- Venenverweilkanülenverschluss (Mandrin Vasofix[®], 22G, Artikelnummer: 4215095; 20G, Artikelnummer: 4219104, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)
- Multiadapter (BD Vacutainer[®] Multisample Luer-Adapter, Artikelnummer: 367300, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Einmalhalter (BD Halter für die Blutentnahme mit BD Vacutainer[®] Röhrchen, Artikelnummer: 364815, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Einmalspritzen (Injekt[®], 2 ml: Artikelnummer: 2057895, 5ml: Artikelnummer: 2057903, 10ml: Artikelnummer: 2057926, B.Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland)
- Desinfektionsspray (Bode Cutasept[®] , Artikelnummer: 976820, Bode Chemie 22525 Hamburg, Deutschland)
- Tupfer (Pur Zellin 4x5 cm unsteril Rolle zu 500 Stück, Artikelnummer: 3548129, Paul Hartmann AG, 45659 Recklinghausen, Deutschland)
- Cosmopor IV Kanülenpflaster (Fixierpflaster, 8 x 6 cm, 50 Stück, Artikelnummer: 602895, Paul Hartmann AG, 45659 Recklinghausen, Deutschland)
- Einmalhandschuhe (Latex Gentle Skin Sensitive PF unsteril 100 Stück, Artikelnummer: V83003M, Rösner-Mautby Meditrade GmbH, 83088 Kiefersfelden, Deutschland)
- Zentrifuge (Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, 78532 Tuttlingen, Deutschland)
- Pipette (Eppendorf Research[®] plus 100-1000 µl, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (ep T.I.P.S. Reloads 50-1000 µl, Artikelnummer: 0030 073.460, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)

2 | Material und Methoden

- Cryovials, 2 ml, freistehend, steril, Artikelnummer:710513, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Deckelstopfen farbig (Cap-insert, rot, Artikelnummer: 710531 Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Röhrchen

- Serumröhrchen (BD Vacutainer® SSTTM II Advance Röhrchen, Artikelnummer: 366882, Volumen: 2,5 ml, Artikelnummer: 367953, Volumen: 8,5 ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- K2 EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen, Artikelnummer: 368841, Volumen: 2 ml, Artikelnummer: 368856, Volumen: 3 ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Glukoseröhrchen (Mikro-Probengefäß 1,3 ml, Fluorid Heparin/Glukose, gelb, Artikelnummer: 41.1505.015, Sarstedt AG & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland)
- RNA (PAXgene™ Blood RNA Röhrchen, Artikelnummer: 762165, Volumen 2,5 ml, Becton Dickinson GmbH, 69126 Heidelberg, Deutschland)
- Freie Fettsäuren (Mikro-Probengefäß 1,5 ml, mit Schraubverschluss, Artikelnummer: 710020, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland) versetzt mit 20 µl K2-EDTA und 40 µl-Orlistat-Stammlösung
- Versorgungsröhrchen (Probenröhrchen 1,5 ml, farblos, Artikelnummer: 710020, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland) + Schraubverschlüsse, grün mit Dichtring, Artikelnummer.: 710033, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland) + Schraubverschlüsse, blau mit Dichtring, Artikelnummer: 710032, Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland)
- Versorgungsröhrchen (5 ml, 75 x 13 mm, PS, Artikelnummer: 55.475.001, Sarstedt AG & Co., 51588 Nümbrecht, Deutschland)

Kits und Lösungen

- OGTT: Glukoselösung ACCU-CHEK® Dextrose O.G-T. (Roche Diagnostics GmbH, 42579 Heiligenhaus, Deutschland)

2 | Material und Methoden

- Freie Fettsäuren: NEFA-HR(2) (Wako Chemicals GmbH, 41468 Neuss, Deutschland)
- Orlistat 25 µg/ml Stammlösung, bestehend aus einer Verdünnung von zerriebenem Orlistat (Xenical®, Roche Pharma GmbH, 79639 Grenzach-Wyhlen, Deutschland) mit physiologischem NaCl in einer Konzentration von 1:4
- K2-EDTA 1,8 mg/ml Stammlösung (Artikelnummer ED2P-100G, Sigma-Aldrich GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland)
- Quantikine® HS, High Sensitivity ELISAs, Human – IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA)
- IL-18 ELISA (MBL, Nagoya, Japan)
- Total und High-molecular-weight Adiponectin (ALPCO Diagnostics, Salem, USA)

Geräte

- Insulin und C-Peptid: IMMULITE® 2000 (Global Siemens Healthcare Headquarters Siemens AG, 91052 Erlangen, Deutschland)
- Triglyceride: Cobas® c Systeme TRIGL (Roche Diagnostics GmbH, 42579 Heiligenhaus, Deutschland)
- Blutbild: Sysmex XE-2100 (Sysmex Deutschland GmbH, 22848 Norderstedt, Deutschland)
- HbA1c: VARIANT™ II Hämoglobin-Analysesystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, 80901 München, Deutschland)
- Glukose: Epos 5060 (Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland)
- Messgerät SECA 285 dp (seca austria, 22089 Hamburg, Deutschland)
- SECA 201 Umfangsmessband (seca austria, 22089 Hamburg, Deutschland)
- MRT 3T Philips Achieva (Philips GmbH Market DACH, 20001 Hamburg, Deutschland)
- ³¹P Spektrum: 14 cm zirkulare ³¹P Oberflächen Spule, transmit-receive coil (Philips GmbH Market DACH, 20001 Hamburg, Deutschland)
- ¹H Spektrum: 16-channel phased-array Empfänger Spule (Philips GmbH Market DACH, 20001 Hamburg, Deutschland)

2 | Material und Methoden

Softwarepakete

- Interview: DAIMON Computer Programm
- Programm No23 Recorder 2.0 (85376 Massenhausen, Deutschland)
- NUTS (Acorn NMR Inc, Livermore, CA, USA)
- SAS Version 9.4 TS Level 1M0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Nationale Kohorte

Die Nationale Kohorte ist eine Langzeit-Bevölkerungsstudie, um Ursachen und Risikofaktoren für verschiedene Volkskrankheiten, z.B. Herz-Kreislauferkrankungen, Krebs, Diabetes mellitus, Demenz und Infektionserkrankungen zu identifizieren. Ein Zusammenschluss deutscher Forschungseinrichtungen will deutschlandweit 200 000 Menschen im Alter von 20-69 Jahren untersuchen, um Strategien zur Früherkennung und Prävention dieser Krankheiten zu entwickeln.

Zusammengeschlossen haben sich Institute aus der Helmholtz-Gemeinschaft, verschiedene Universitäten und andere Forschungsinstitute, darunter das Deutsche Diabetes-Zentrum.

Die seit 2007 entwickelte Nationale Kohorte soll drei große Ziele verfolgen:

1. Eine Plattform für zukünftige epidemiologische Studien darstellen.
2. Wichtige epidemiologische und grundlegende Fragen im Bereich der chronischen Krankheiten klären.
3. International mit anderen großen prospektiven Studien kooperieren.

Zum Untersuchungsprogramm der Nationalen Kohorte gehört zum einen eine körperliche Untersuchung der Probanden, aber auch eine genaue Befragung über die jeweiligen Lebensgewohnheiten. Zusätzlich werden Blutproben entnommen, die in einer zentralen Bioprobenbank gelagert werden.

Die Studienteilnehmer sollen über einen Zeitraum von 10-20 Jahren beobachtet werden. Falls in diesem Zeitraum eine der oben erwähnten Krankheiten bei einem Probanden in Erscheinung tritt, kann retrospektiv versucht werden die wahrscheinliche Ursache der Erkrankung zu identifizieren.

2 | Material und Methoden

2.2.2. Machbarkeitsstudie

Während der Jahre 2009-2012 befand sich die Nationale Kohorte in der Vorbereitungsphase. Einen Teil dieser Phase stellten verschiedene Machbarkeitsstudien in unterschiedlichen Forschungsinstituten dar. Ziel war es die Studienabläufe zu etablieren, um bei dem Start der Nationalen Kohorte einen reibungslosen Studienablauf zu gewährleisten. Im Rahmen einer dieser Machbarkeitsstudien, welche im Deutschen Diabetes-Zentrum stattfand, wurden die Daten zu der hier vorliegenden Arbeit erhoben.

2.2.3. Probandenselektion

Studienteilnehmer wurden mittels Werbeanzeige und über das Einwohnermeldeamt Düsseldorf gesucht. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf geprüft und von dieser positiv bewertet (Ethiknummer: 3619). Die Teilnehmer erhielten eine ausführliche Aufklärung über den Studienablauf und mögliche Risiken und unterschrieben eine Einverständniserklärung sowohl zur Basisstudie als auch separate Einverständniserklärungen zum oGTT und zum MRT.

Die Probandendaten wurden pseudonymisiert mittels einer Rekrutierungsnummer. Zusätzlich erhielt jeder Proband eine interne Identifikationsnummer (NK-Nummer) für das Bioprobenprotokoll, die Laborbestimmungen und die MRT-Messungen.

2.2.4. Studiendesign

Die für die Querschnittstudie relevanten Daten wurden bei den Probanden zwischen Juli und September 2011 mittels MRT und Blutabnahme erhoben. Zudem erhielten die Probanden ein standardisiertes Interview und anthropometrische Messungen. Hierzu kamen die Patienten an einem bis maximal zwei Tagen in das Deutsche Diabetes-Zentrum.

2.2.5. Studienuntersuchungen

Anthropometrie, Blutdruckmessung und Interview

Die Probanden wurden gebeten sich bis auf die Unterwäsche zu entkleiden. Zu Messung von Gewicht und Körpergröße wurde das Messgerät SECA 285 verwendet, die Erfassung von Körpergröße (in cm) und Körpergewicht (in kg) erfolgte auf eine Nachkommastelle genau. Aus den erhobenen Daten konnte der jeweilige Body Mass Index (BMI) der Probanden durch folgende Formel bestimmt werden:

2 | Material und Methoden

$$\text{BMI} = \text{kg/m}^2 \text{ (kg: Körpergewicht, m: Körpergröße)}$$

Gemessen wurden außerdem Taillen- und Hüftumfang in cm mit einem unelastischen Maßband (SE-CA 201). Die Probanden wurden aufgefordert sich mit hüftbreit geöffneten Beinen mit dem Rücken zu einem Ganzkörperspiegel hinzustellen. Der Bauch sollte dabei nicht eingezogen werden und die Probanden möglichst ruhig atmen. Das Maßband wurde horizontal ohne Einschnüren um den Körper geführt. Der Taillenumfang wurde in der Mitte zwischen der untersten Rippe und dem Beckenkamm gemessen, der Hüftumfang am weitesten nach hinten ausladenden Punkt des Gesäß.

Systolische und diastolische Blutdrücke wurden in mmHg nach Riva Rocci im Anschluss an eine zehnmünütige Ruhephase am sitzenden Probanden gemessen. Auf eine korrekte Manschettengröße wurde geachtet. Jeder Proband nahm an einem standardisierten Interview teil, in welchem die genaue Reihenfolge der Fragen vorgegeben war. Sowohl die Fragen als auch die Antworten der Studienteilnehmer wurden direkt im Computerprogramm (Software: DAIMON) aufgezeichnet. Ein Mitschnitt des Interviews erfolgte bei gegebenem Einverständnis mittels des Programms No23 Recorder 2.0. Im Vorfeld des Interviews wurden die Probanden über das bevorstehende Interview aufgeklärt und ihr Einverständnis eingeholt. Ziel des Interviews war es bereits durch einen Arzt diagnostizierte Erkrankungen, Diagnosezeit und Behandlung dieser Erkrankungen, eventuelle Medikamenteneinnahmen und spezifische Lebensgewohnheiten, wie Alkohol- oder Tabakkonsum zu erfragen.

Blutabnahme und Probenverarbeitung

Die Probanden erschienen am Morgen des Studientages nüchtern im Deutschen Diabetes-Zentrum. Vor der Blutentnahme wurden die Probanden nach Bluterkrankungen, Medikamenteneinnahme, Nahrungsaufnahme und Alkoholkonsum innerhalb der letzten 24 Stunden befragt. Absolute Kontraindikation für die Blutentnahme stellte eine Hämophilie dar, relative Kontraindikation die Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten. Nach Gabe ihres Einverständnisses erhielten die Probanden unter aseptischen Bedingungen eine Venenverweilkanüle. Präferierter Ort für die Lage der Venenverweilkanüle war eine Vene der Ellenbeuge, zweite Wahl der Handrücken. Es wurde darauf geachtet, nicht länger als eine Minute den Arm zu stauen. Direkt im Anschluss an die Anlage der

2 | Material und Methoden

Venenverweilkanüle erfolgte die erste Blutentnahme (Zeitpunkt -45), weitere Entnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 0 (direkt vor dem Trinken der oGTT Lösung), 30, 60 und 120 Minuten nach Beendigung des Trinkens. Die Blutentnahmeröhrchen wurden vor ihrer Verwendung mit der NK Nummer des Probanden, dem Abnahmezeitpunkt und dem Material (Serum, Plasma, DNA, RNA) mittels eines Aufklebers versehen.

Zeitpunkt (min)				
-45	0 (direkt vor Start des oGTT)	30	60	120
Klinische Chemie ¹	Insulin, C-Peptid	Insulin, C-Peptid	Insulin, C-Peptid	Insulin, C-Peptid
Kleines Blutbild	Glukose	Glukose	Glukose	Glukose
DNA	Metabolomics			Metabolomics
Freie Fettsäuren	Immunmarker			Immunmarker
HBA1c	RNA			

Tabelle 3: Blutabnahmeschema.

¹: Kreatinin, Harnsäure, Cholesterin, HDL, LDL, Triglyzeride, GOT, GPT, γ -GT, Ferritin.

Klinische Chemie (Serum):

Die Abnahme von 20 ml Blut für die Serumgewinnung erfolgte in drei Röhrchen, welche direkt nach der Abnahme zweimal um 180° geschwenkt wurden. Nach einer Standzeit von 30 bis maximal 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen 30 Minuten lang bei einer Temperatur von +4°C mit 2000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Serum in ein Analyseröhrchen dekantiert. Dieses wurde gekühlt bei +6°C innerhalb von 2 Stunden zusammen mit dem Röhrchen zur Messung des kleinen Blutbildes gekühlt in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf gebracht.

2 | Material und Methoden

Kleines Blutbild (EDTA):

2 ml Blut wurde zur Analyse des kleinen Blutbildes in ein EDTA-Röhrchen abgenommen und nach 4-6maligem Schwenken des Röhrchens im Kühlschrank bei 6°C gelagert. Anschließend wurde das Röhrchen ebenfalls gekühlt in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf transportiert (s.o.).

DNA (EDTA):

Im Anschluss an die Blutentnahme in zwei EDTA Röhrchen (4 ml+6 ml) wurden diese geschwenkt und von einem 200 µl in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde vom Institut für Umweltmedizinische Forschung weiter verarbeitet. Das verbleibende EDTA Blut wurde zur späteren Extraktion der DNA bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

HbA1c (EDTA):

Zur Bestimmung des HbA1c wurde ein 3 ml EDTA Röhrchen verwendet. Dieses wurde bei Raumtemperatur bis zur Analyse innerhalb von 24 Stunden gelagert.

Freie Fettsäuren (EDTA mit 40 µl Orlistat-Stammlösung):

Das Mikro-Probengefäß wurde mit 1 ml Probandenblut gefüllt und geschwenkt. Anschließend wurde es auf Eis gelagert bis es in der Hormonanalytik des Deutschen Diabetes Zentrums weiter verarbeitet wurde.

Insulin und C-Peptid (Serum):

Blutentnahme erfolgte in ein 3,5 ml Serumröhrchen welches im Anschluss an die Abnahme geschwenkt wurde. Nach einer 30-45minütigen Standzeit bei Raumtemperatur wurde dieses Röhrchen bei 2000 g und +4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand zur weiteren Verarbeitung auf zwei Kryoröhrchen verteilt und bei -20°C eingefroren. Die weitere Analyse von Insulin und C-Peptid erfolgte in der Hormonanalytik des Deutschen Diabetes-Zentrums.

Glucose (Heparinat mit Kaliumfluorid):

Zur Bestimmung der Glukose wurde den Probanden 1 ml Blut mit einer Einmalspritze entnommen und in ein Mikro-Probengefäß mit Kaliumfluorid-Heparinat zur Glukosebestimmung umgefüllt. Dieses wurde ca. 10 Mal um 180°

2 | Material und Methoden

geschwenkt und anschließend im Stehen bei Raumtemperatur bis zur Analyse innerhalb von 4 Stunden gelagert.

Metabolomics (EDTA):

Dieses Röhrchen wurde 30 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 2000 g und 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und auf zwei Kryoröhrchen verteilt, welche bei -20°C eingefroren wurden.

RNA (PAXGene®--Röhrchen):

Dieses Röhrchen wurde nach Befüllung mit 2,5 ml Probandenblut mindestens 10 Mal geschwenkt, anschließend in einer lichtgeschützten Box mindestens 2 Stunden gelagert und anschließend bei einer Temperatur von -20°C eingefroren.

Immunmarker (Serum):

Die Abnahme von 8,5ml erfolgte in ein Serumröhrchen. Nach einer Standzeit von 30-45 Minuten wurde das Röhrchen bei 2000xg und +4°C zentrifugiert, der Überstand in zwei Kryoröhrchen verteilt und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Oraler Glukosetoleranztest (oGTT)

Um eine eventuelle Störung des Glukosestoffwechsels bei den Probanden festzustellen, wurde ein standardisierter oraler Glukosetoleranztest mit 75 g Glukose durchgeführt. Dieser dient durch die Bestimmung der Blutglukose einerseits der Diagnostik des Diabetes mellitus und seiner Vorstadien andererseits auch zusammen mit der Bestimmung von Insulin und C-Peptid zu mehreren Zeitpunkten dazu, Indizes der Insulinsekretion und –sensitivität zu berechnen.

Nach einer 12 Stündigen Fastenzeit erfolgte zunächst eine Nüchtern-Blutentnahme zwischen 7 und 11 Uhr morgens mit Bestimmung von Glukose, Insulin und C-Peptid. Im Anschluss an diese erste Blutentnahme wurden die Probanden gebeten eine standardisierte Glukoselösung innerhalb von 5 Minuten zu trinken (Dextro-O.G.T.-Saft mit 75 g Glukose in 300 ml Flüssigkeit). Weitere Blutentnahmen folgten jeweils 30, 60 und 120 Minuten nach Beendigung des Trinkens. In der Zwischenzeit wurden die Probanden angehalten sich nicht körperlich zu betätigen. Zudem durfte keine Nahrung oder Flüssigkeit zu sich genommen werden und die Probanden mussten auf das Rauchen verzichten. Zeigten die Probanden Symptome einer

2 | Material und Methoden

Unterzuckerung oder vertragen die häufigen Blutentnahmen nicht, wurde der Test vorzeitig beendet.

2.2.6. Laborchemische Bestimmungen

Messungen erfolgten im Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf mittels dem Cobas® c Systeme TRIGL der Firma Roche für folgende Parameter:

Gesamtcholesterin (GC)

Zunächst wird der Cholesterinester durch die Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Anschließend erfolgt die Umsetzung zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid durch die Cholesterinoxidase. Wasserstoffperoxid bildet nun mit 4-Aminoantipyrin und Phenol einen roten Farbstoff, welcher direkt proportional zur Cholesterinkonzentration ist und mittels Extinktionszunahme photometrisch gemessen wird.

HDL-Cholesterin

Die Bestimmung erfolgt mittels Präzipitationsmethode. Der Probe werden Mg^{2+} und Phosphorwolframsäure zugegeben, wodurch es zur Ausfällung aller Bestandteile mit Ausnahme des HDL-Cholesterins kommt. Anschließend erfolgt im Überstand die Umsetzung analog zu den im Abschnitt „Gesamtcholesterin“ genannten chemischen Reaktionen, ebenso wie die photometrische Messung.

LDL-Cholesterin

Werte für das LDL-Cholesterin werden mittels Friedewald-Formel berechnet.

$$LDL = GC - HDL - TG/5 \text{ (gemessen in mg/dL).}$$

Bei hohen Triglyceridkonzentration (≥ 400 mg/dL) kann die LDL-Konzentration nicht bestimmt werden.

Triglyceride

Die Messung basiert auf einer enzymatischen Reaktion bei der unter Verwendung einer Lipoproteinlipase Triglycerid in Glycerin und drei freie Fettsäuren gespalten wird. Darauf folgend kommt es zu einer Oxidierung von Glycerin durch die Glycerinphosphatoxidase zu Dihydroacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. H_2O_2 bildet dann mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol einen roten Farbstoff,

2 | Material und Methoden

welcher photometrisch gemessen wird. Dieser ist proportional zur Triglyceridkonzentration der Probandenprobe.

Kleines Blutbild:

Das kleine Blutbild wurde von dem Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf mit dem Gerät Sysmex XE-2100 analysiert. Die Messung der Anzahl von Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt dabei in der gleichen Messkammer. Unterschieden werden sie dabei durch ihre Unterschiedliche Größe. 4 µl der Blutprobe werden dafür mit einem Verdünnungsreagenz vermischt und anschließend durch eine Kapillaröffnung gesaugt. Gemessen wird dann ein elektrischer Impuls, den die Zellen bei Durchtritt durch eine Messöffnung erzeugen und der je nach Zellgröße unterschiedlich hoch ist. Gemessen wird die Anzahl der Impulsänderungen.

Zur Berechnung des mittleren korpuskulären Volumens (MCV) benötigt man den Hämatokrit (HKT) und die Anzahl roter Blutkörperchen (RBC) welche dividiert werden ($MCV = HKT : RBC$).

Der mittlere korpuskuläre Hämoglobingehalt (MCH) berechnet sich folgendermaßen:

$MCH = \text{Hämoglobin (HGB)} : \text{rote Blutkörperchen (RBC)}$.

Die mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration berechnet sich durch die Parameter Hämoglobin dividiert durch Hämatokrit.

Zur Analyse der Anzahl von Leukozyten und Granulozyten wurden zunächst die Erythrozyten der Blutprobe durch Zusatz von dem Reagenz Stromatolyser-fb lysiert. Die restlichen in der Blutprobe vorhandenen Zellen wurden mittels einer Durchflusszytometrie quantifiziert.

Freie Fettsäuren:

Die Bestimmung der freien Fettsäuren erfolgte mittels eines Farbtests NEFA-HR(2) der Firma Wako. Freie Fettsäuren werden hierbei zunächst zu Acyl-CoA, AMP und Phosphorsäure umgesetzt. Unter der Zugabe von Acyl-CoA-Oxidase entsteht 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid. Durch die Zugabe Peroxidase und 3-Methyl-N-Ethyl-N-Anilin (MEHA) und 4-Aminoantipyrin (4-AA) kommt es zur Bildung eines blau-violetten Farbkomplexes, welcher durch eine Absorptionsmessung quantifiziert wird. Die Menge lässt nun auf die Konzentration der freien Fettsäuren in der vorliegenden Probe schließen.

2 | Material und Methoden

HBA1c:

Die Bestimmung erfolgte im VARIANT™ II Hämoglobin Analysesystem mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromographie (HPLC). Hierbei kommt es zu einer Auftrennung von normalen und glykolisiertem Hämoglobin und anschließender Messung der relativen Anteile.

Insulin und C-Peptid:

Insulin und C-Peptid Bestimmung erfolgte mittels des IMMULITE 2000.

Messung von Insulin

Die Messung des Insulins erfolgte mit einem Festphasen Chemilumineszenz-Assay. Als Festphase dient eine Kugel, welche mit einem murinen monoklonalen anti-Insulin-Antikörper beschichtet ist. Die flüssige Phase bildeten zwei Antikörper (polyklonaler (Schaf) anti-Insulin-Antikörper, monoklonaler (Maus) anti-Insulin-Antikörper), welche beide an eine alkalische Phosphatase konjugiert sind.

Die Inkubationszeit zwischen Probandenprobe, Kugel und Reagenz beträgt 60 Minuten. Es kommt zur Bildung eines Antikörper-Sandwichkomplex. Im folgenden Schritt werden die ungebundene Probe und das Enzymkonjugat bei einer Waschung entfernt. Das anschließend zugegebene Chemilumineszenzsubstrat wird durch an die gebundenen Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase umgesetzt. Das proportional zum gebundenen Enzym generierte Lumineszenz kann daraufhin detektiert werden.

Messung von C-Peptid

Die Messung des C-Peptids erfolgte mit einem Zweiphasen Assay. Als Festphase, dient eine Kugel, welche mit einem monoklonalen Maus anti-C-Peptid-Antikörper beschichtet ist. Die Flüssigphase stellt eine aus Rinderkalbsdarm gewonnene alkalische Phosphatase dar, welche an einen monoklonalen Maus anti-C-Peptid Antikörper in Pufferlösung konjugiert ist.

Sowohl Reagenz, als auch Kugel werden zusammen mit der Patientenprobe für 30 Minuten inkubiert. Es kommt zur Bildung eines Antikörper-Sandwichkomplex zwischen dem C-Peptid der Probandenprobe und dem monoklonalen Maus anti-C-Peptids des Reagenz und der Kugel. Im folgenden Schritt werden die ungebundene Probandenprobe und das Enzymkonjugat bei einer Waschung entfernt. Das zugegebene Chemilumineszenzsubstrat wird durch die alkalische Phosphatase

2 | Material und Methoden

umgesetzt und das Lumineszenzsignal, das proportional zum gebundenen Enzym ist, wird gemessen.

Glukose:

Die Blutglukose Messung erfolgte mittels eines EPOS 5060 Analyzer der Firma Eppendorf. Das Messprinzip beruht auf einer Reaktion der in der Probe enthaltenen Glukose mit dem Enzym Glukoseoxidase. Es kommt zur Umsetzung zu D-Glukonsäure und H₂O₂. Wasserstoffperoxid wird anschließend oxidiert und es entsteht ein Messsignal an einer Platinelektrode, welches erfasst wird und eine Aussage über die Höhe der Glukosekonzentration liefert. Die erhaltenen Ergebnisse für die Vollblutglukose werden gemäß folgender Formel auf die Plasmaglukose umgerechnet:

Plasmaglukose [mg/dl]=Vollblutglukose [mg/dl] *1,11

Interleukine 6,18 und Adiponectin:

Die Bestimmung erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Hier wurde nach dem Protokoll vorgegeben durch die Firmen vorgegangen.

Metabolomics, Immunmarker, RNA, DNA

Die Proben fanden keine Anwendung in dieser Dissertation.

2.2.7. ¹H-MRS

Die Probanden erhielten zur Bestimmung des Ganzkörperfettanteils und zur Bestimmung des Pankreasfettgehalts eine MRT-Untersuchung im 3.0 Tesla Achieva-MRT der Firma Philips. Im Vorfeld musste eine Nüchternperiode von zwei Stunden eingehalten werden. Zudem erhielten die Probanden einen Fragebogen, um die MRT-Tauglichkeit zu überprüfen. Abgefragt wurden vorausgegangene Operationen und das eventuelle Vorhandensein magnetischer Gegenstände im Körper des Probanden (beispielsweise ein Herzschrittmacher). Probanden mit Verdacht auf magnetische Implantate oder Gegenstände im Körper (z.B. nach Metallsplitterverletzung), großflächigen Metallimplantaten oder Klaustrophobie wurden von der MRT-Untersuchung ausgeschlossen.

Zur Bestimmung des subkutanen und viszeralen Fettanteils der Probanden wurden transversale T1-gewichtete Aufnahmen mit einem Turbofaktor von 7, einer Echo-

2 | Material und Methoden

Zeit (time echo, TE) von 38 ms und einer Repetitionszeit (time repetition, TR) zwischen 400 und 510 ms erstellt. Hierbei wurde eine quadratische Körperspule verwendet. Die Messdauer aller Aufnahme des gesamten Körpers dauerten ca. 15 Minuten. Die Probanden befanden sich hierbei in Bauchlage mit über dem Kopf ausgestreckten Armen.

Zur pankreatischen Fettbestimmung wurde ein volume of interest (VOI) von 2 x 1 x 1 cm³ wurde vorzugsweise im Corpus des Pankreas positioniert und darauf geachtet, eine Messung von viszeralem Fettgewebe zu vermeiden. Es wurde hierbei eine Repetitionszeit von 4 s und eine Echo-Zeit von 10 ms verwendet.

Daten der MRS wurden mittels NUTS-Software analysiert [72, 87].

2.2.8. Berechnete Indizes für die Insulinsekretion und –sensitivität aus dem oGTT

Aus den erhobenen Werten von Glukose (G), Insulin (I) und C-Peptid (CP) zu den entsprechenden Zeitpunkten des oGTT wurden folgende Indices berechnet:

Insulinogenic index (IGI) [88]

- IGI-Insulin (IGI-I)

$$IGI-I = \Delta I_{30} / \Delta G_{30} = (I_{30} - I_0) / (G_{30} - G_0)$$

- IGI-C-Peptide (IGI-CP)

$$IGI-CP = \Delta CP_{30} / \Delta G_{30} = (CP_{30} - CP_0) / (G_{30} - G_0)$$

OGIS (Oral Glucose Insulin Sensitivity) [37]

$$OGIS = f(G_0, G_{90}, G_{120}, I_0, I_{90}, D)$$

f: Funktion, G: Glukose zu den Zeitpunkten 0, 90, 120, I: Insulin zu den Zeitpunkten 0, 90, D: orale Glukose Dosierung

Die zugrundeliegende Funktion des komplexen mathematischen Modells steht beispielsweise unter folgendem Link zur Verfügung:
<http://www.isib.cnr.it/bioing/ogis/home.html>.

Disposition Index (DI) [25]

$$DI = OGIS \times IGI-I_{tot}$$

IGI-I_{tot} wird berechnet als die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) von Insulin in Bezug auf die AUC von Glukose:

$$IGI-I_{tot} = AUC(I_{0-120}) / AUC(G_{0-120})$$

Adaptation Index (AI) [39]

$$AI = OGIS) \times IGI-CP_{tot}$$

IGI-CP_{tot} wird berechnet als AUC von C-Peptid in Bezug auf die AUC von Glukose:

$$IGI-CP_{tot} = AUC (CP_{0-120}) / AUC (G_{0-120})$$

2.2.9. Statistik

Für die Erhebung und Dokumentation der Daten wurden hauptsächlich Microsoft Word und Excel verwendet. Die Darstellung der Messdaten erfolgte als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Median mit Interquartilsabstand (IQR) für nicht-normalverteilte Variablen. Vergleiche zwischen 2 Gruppen wurden mittels des Student t-Tests für unverbundenen Stichproben (für normalverteilte Variablen) bzw. mittels des Wilcoxon-signed rank Tests für nicht-normalverteilte Variablen durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Korrelation zwischen dem Pankreasfettgehalt und möglichen Einflussvariablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, da auch nicht-normalverteilte Daten vorlagen. Im Gegensatz zu der Pearson-Korrelation sind hier keine absoluten Werte ausschlaggebend, sondern die Werte werden nach Rängen sortiert und gehen so in die Rechnung der Korrelation mit ein.

Nicht-normalverteilte Variablen gingen in die weiteren Auswertungen als logarithmierte Werte zur Basis e ein. In der multivariaten linearen Regressionsanalyse mittels der SAS-Analyse-Software (SAS Version 9.4 TS Level 1M0; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) wurde die Assoziation zwischen Pankreasfettgehalt und Indizes der Insulinsekretion unter Berücksichtigung der wesentlichen Störfaktoren (Confounder) Alter, Geschlecht und BMI analysiert. Darüber hinaus wurde explorativ der Einfluss der verschiedenen erhobenen Variablen auf die prähepatische Insulinsekretion (gemessen als IGI-CP) mittels linearer Regression unter Adjustierung auf die Confounder Alter, Geschlecht und BMI untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Deskription der Kohorte

Insgesamt wurden durch Zeitungsanzeigen 146 Probanden angeworben (**Abb. 2**), von denen zwei aufgrund fehlender Basisdaten ausgeschlossen wurden. 144 Probanden nahmen sowohl an dem standardisierten Interview als auch an den Blutuntersuchungen teil. Von diesen wollten 10 nicht am oGTT teilnehmen, bei weiteren 7 Probanden lag ein bereits diagnostizierter Diabetes mellitus oder keinerlei Information zu einer vorbestehenden Diabeteserkrankung vor. Somit nahmen 127 Probanden am oGTT teil. Bei 29 Probanden war es nicht möglich eine MRT-Untersuchung durchzuführen. Gründe hierfür waren u.a. Klaustrophobie oder metallische Implantate. Bei 2 weiteren Probanden waren die Daten der Gesamtkörperfettverteilung aus dem MRT aufgrund von Artefakten nicht auswertbar, so dass 96 Probanden in der Analyse verblieben.

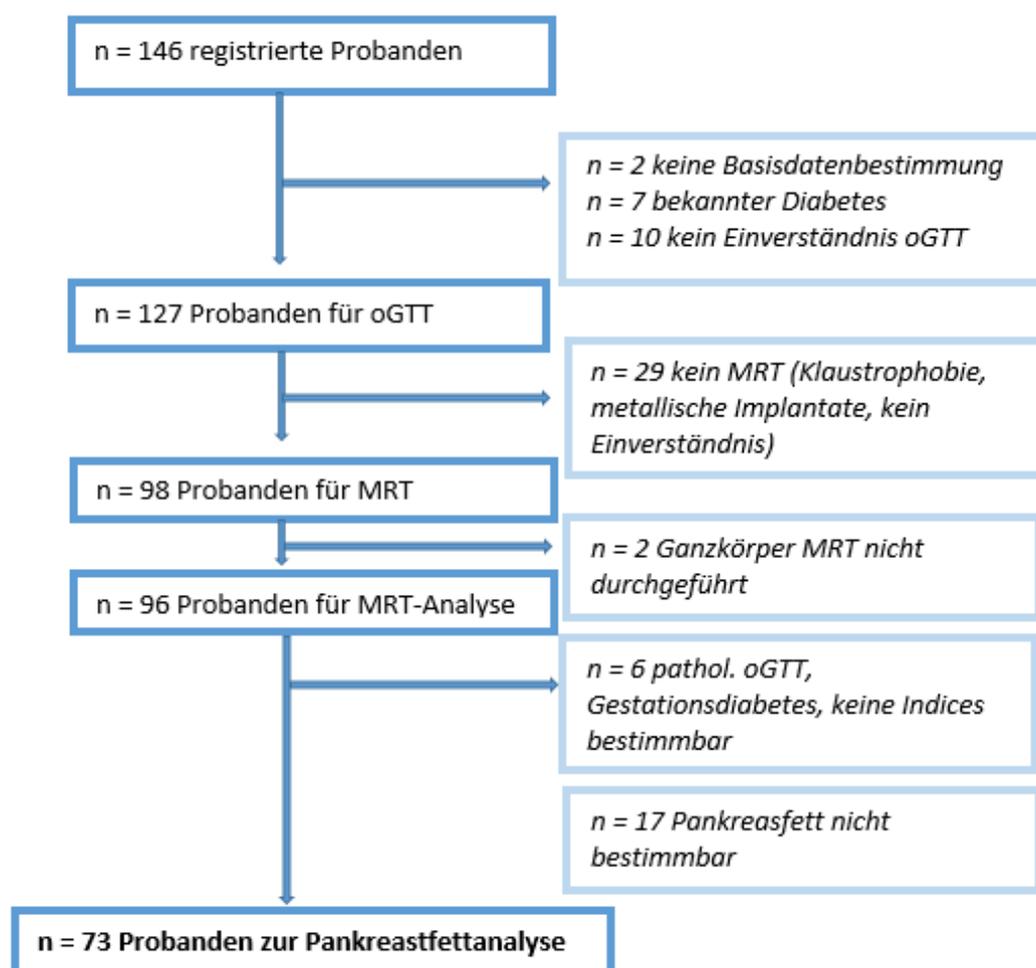


Abbildung 2: Flussdiagramm der Probandenselektion

3 | Ergebnisse

6 weitere Probanden wurden aufgrund eines neu entdeckten Diabetes mellitus im oGTT, einer Vorgeschichte eines Gestationsdiabetes oder fehlenden Insulinmesswerten zur Berechnung der Insulinsekretionsindizes aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei weiteren 17 Probanden war es nicht möglich den Pankreasfettanteil im MRT zu bestimmen. Dies lag zum Teil an der Schwierigkeit das Pankreas überhaupt in den MRT Bildern auszumachen oder an einer falschen Positionierung des Voxels zur Messung des Pankreasfettgehaltes. Am Ende gingen 73 Probanden mit vollständigen Daten für den Pankreasfettanteil und die Insulinsekretion in die Analyse für diese Doktorarbeit ein.

3 | Ergebnisse

	Gesamte Kohorte	Männer	Frauen	p-Wert
n	73	32	41	
Alter (Jahre)	57±11	59±11	56±12	0,22
BMI (kg/m ²)	25,4 [23,5; 28,4]	25,9 [24,5; 28,2]	25,2 [21,9; 28,5]	0,34
Taillenumfang (cm)	89±12	96±9	84±11	<0,0001
Blutdruck systolisch (mmHg)	123±15	128±15	119±14	0,03
Blutdruck diastolisch (mmHg)	73±9	75±9	72±8	0,18
Gesamtcholesterin (mg/dl)	223 [203; 246]	220 [181; 240]	224 [211; 246]	0,27
HDL-Cholesterin (mg/dl)	63 [52; 76]	57 [46; 65]	67 [58; 82]	0,0004
LDL-Cholesterin (mg/dl)	146 [122; 164]	152 [118; 169]	143 [124; 158]	0,62
Triglyzeride (mg/dl)	92 [65; 140]	120 [80; 179]	90 [59; 133]	0,14
FFA (µmol/l)	447 [380; 608]	409 [335; 527]	497 [420; 681]	0,03
Subkutane Fettmasse (10 ³ cm ³)	20 [17; 26]	17 [14; 20]	25 [18; 30]	<0,0001
Viszerale Fettmasse (10 ³ cm ³)	3,3 [1,9; 5,0]	4,7 [3,4; 6,7]	2,3 [1,3; 3,5]	<0,0001
HCL (%)	2,0 [0,5; 4,2]	3,3 [0,9; 4,7]	1,2 [0,4; 3,8]	0,08
Pankreasfettanteil (%)	7,0 [3,0; 11,2]	6,7 [3,0; 10,2]	7,2 [3,0; 13,9]	0,75
hsCRP (mg/dl)	0,09 [0,06; 0,19]	0,07 [0,05; 0,14]	0,10 [0,06; 0,24]	0,04
IL-6 (pg/ml)	1,02 [0,53; 1,61]	1,03 [0,41; 1,56]	1,02 [0,69; 1,67]	0,61
IL-18 (pg/ml)	230 [175; 332]	253 [213; 366]	200 [152; 282]	0,03
Adiponectin total (µg/ml)	6,10 [4,96; 8,94]	5,29 [4,11; 6,52]	7,40 [5,71; 11,38]	<0,0001
Adiponectin HMW (µg/ml)	2,95 [2,20; 4,78]	2,38 [1,67; 3,10]	4,56 [2,83; 6,97]	<0,0001

Tabelle 4: Basischarakteristika

Die Daten sind als Mittelwert ± SD bzw. Median und IQR [25% Quartile; 75% Quartile] angegeben. Angegeben ist der p-Wert für den Vergleich zwischen Männern und Frauen, analysiert mittels Student's t-Test (normalverteilte Variablen) bzw. Wilcoxon-signed rank Test (nicht-normalverteilte Variablen). n = Anzahl, HDL: High-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, FFA: free fatty acids, HCL: hepatocellulärer Fettgehalt, hsCRP: high sensitivity C-reaktives Protein, IL: Interleukin, HMW: high-molecular weight

Basischarakteristika der Kohorte

Von den untersuchten 73 Probanden waren 56% weiblich und 44% männlich. Das Durchschnittsalter lag bei 57±11 Jahren und der mittlere BMI knapp im Bereich einer Präadipositas gemäß den Kriterien der WHO (**Tab. 4**). Die mittleren Blutdruckwerte ebenso wie die Blutfette (Gesamtcholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin und

3 | Ergebnisse

Triglyzeride) zeigten keine Auffälligkeiten, allerdings unterschieden sich erwartungsgemäß Männer und Frauen bezüglich des Taillenumfanges ebenso wie in den Werten für HDL-Cholesterin und FFA.

Probanden hatten mehr subkutane als viszerale Fettmasse, wobei Männer im Vergleich zu Frauen mehr viszerale und weniger subkutane Fettmasse hatten. Dagegen war der mittlere Gesamtfettanteil des Pankreas mit 7,0% bei beiden Geschlechtern vergleichbar, der hepatozelluläre Lipidgehalt (HCL) war mit 2,0% im Normbereich, Männer wiesen aber einen tendenziell höheren Leberfettgehalt auf.

	Alle	Männer	Frauen	p-Wert
NGT/IGT/IFG/ IFG+IGT (n)	64/2/5/2	-	-	-
HbA1C (%)	5,5 ± 0,38	5,5±0,4	5,5±0,38	0,97
Glukose nüchtern (mg/dl)	83 [80; 89]	87 [83; 95]	81 [79; 84]	0,003
Glukose 2 h (mg/dl)	100 [85; 112]	98 [82; 117]	102 [85; 110]	0,92
Insulin nüchtern (mU/l)	6,2 [5,0; 9,2]	7,3 [5,1; 10,5]	6,0 [5,0; 7,5]	0,07
Insulin 2h (mU/l)	39,4 [26,9; 65,6]	35,4 [23,1; 71,2]	45,2 [28,7; 63,4]	0,34
C-Peptid nüchtern (ng/ml)	1,9 [1,4; 2,3]	2,0 [1,5; 2,7]	1,8 [1,3; 2,2]	0,21
C-Peptid 2 h (ng/ml)	9,9 [7,8; 13,0]	9,8 [7,2; 12,7]	9,9 [8,1; 13,0]	0,46
IGI-I (au)	140 [112; 201]	146 [106; 234]	130 [113; 183]	0,89
IGI-CP (au)	1292 [1008; 1729]	1235 [876; 1408]	1377 [1060; 1753]	0,13
AI (au)	0,45 [0,37; 0,51]	0,44 [0,37; 0,51]	0,45 [0,38; 0,56]	0,34
DI (au)	2,41 [1,93; 3,24]	2,48 [1,85; 3,66]	2,40 [1,94; 2,89]	0,46
OGIS (ml·min⁻¹·m⁻²)	444 [393; 493]	427 [377; 465]	464 [412; 509]	0,09

Tabelle 5: Charakteristika des Glukosestoffwechsels in der Kohorte

Die Daten sind als Mittelwert ± SD bzw. Median und IQR [25% Quartile; 75% Quartile] angegeben. Angegeben ist der p-Wert für den Vergleich zwischen Männern und Frauen, analysiert mittels Student's t-Test (normalverteilte Variablen) bzw. Wilcoxon-signed rank Test (nicht-normalverteilte Variablen). NGT: normale Glukosetoleranz, IGT: impaired glucose tolerance, IFG: impaired fasting glucose, IGI-I: Insulinogenic index Insulin, IGI-CP: Insulinogenic index C-Peptid, AI: Adaptation index, DI: Disposition index.

Der HbA1c Wert lag mit 5,5% im Bereich einer euglykämischen Stoffwechselkontrolle [89], die Plasmaglukose lag im Mittel sowohl nüchtern als auch nach zwei Stunden des oGTT im Normalbereich, wenn auch die Frauen geringere Nüchternplasmaglukosespiegel aufwiesen (**Tab. 5**). 88,2% des Kollektives hatte eine normale Glukosetoleranz, 2,6% eine gestörte

3 | Ergebnisse

Nüchtern glukose, 6,6% eine gestörte Glukosetoleranz und 2,6% eine Kombination aus beidem.

3.2. Korrelationsanalysen mit Pankreasfettgehalt

Als nächstes wurde analysiert, welche der erhobenen Variablen mit dem Pankreasfettgehalt korrelieren (**Tab. 6**). Neben einer positiven Assoziation zwischen dem Alter der Probanden und dem Pankreasfettgehalt fand sich erwartungsgemäß eine positive Korrelation mit allen Markern des Körperfettgehaltes (Gewicht, BMI, Taillen- und Hüftumfang, subkutane und viszerale Fettmasse sowie HCL), wobei die stärkste Assoziation mit dem BMI und dem Gastkörperfettgehalt zu beobachten ist. Die Assoziation mit dem HCL ist am schwächsten. Es fand sich dagegen keine Korrelation mit den Lipidparametern (Triglyzeride, Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterin, FFA).

Bezüglich des Kohlenhydratstoffwechsels war der Pankreasfettgehalt positiv mit dem HbA1c assoziiert. Alle weiteren Glukose-, Insulin- und C-Peptidwerte im oGTT zeigten keine Korrelation zum Pankreasfettgehalt, ebenso wie die berechneten Indizes der Insulinsekretion. Lediglich mit dem OGIS als Maß für die Insulinsensitivität war die Tendenz zu einer inversen Korrelation zu beobachten ($r=-0,19$; $p=0,08$).

Als Marker für eine Entzündungsreaktion im Körper dient das CRP, welches eine positive Korrelation mit dem Pankreasfettgehalt zeigt, ebenso wie das Interleukin 6.

3.3. Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflussfaktoren des Pankreasfettgehaltes

Um zu untersuchen, ob die mögliche Assoziation zwischen dem Pankreasfettgehalt und der Insulinsekretion durch weitere Störfaktoren überdeckt worden ist, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und in verschiedenen Modellen für die möglichen Confounder Alter, Geschlecht und BMI als Standardmaß für den Körperfettanteil adjustiert. Dabei beschreibt der Parameterschätzer β den Koeffizienten für die jeweilige untersuchte Variable in der linearen Regressionsgleichung unter Berücksichtigung der jeweils aufgeführten Störfaktoren, dazu ist der korrespondierende p-Wert angegeben (**Tab. 7**). Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht-normalverteilte Variablen als logarithmierte Werte in die Regressionsanalysen eingegangen sind.

3 | Ergebnisse

Variable	Spearman Rangkorrelationskoeffizient	p-Wert
Alter (Jahre)	0,33	0,004
BMI (kg/m ²)	0,36	0,0006
Taillenumfang (cm)	0,33	0,003
Hüftumfang (cm)	0,21	0,056
Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	-0,04	0,714
HDL-Cholesterin (mg/dl)	-0,14	0,226
LDL-Cholesterin (mg/dl)	0,01	0,904
Triglyzeride (mg/dl)	-0,23	0,104
FFA (μmol/l)	-0,19	0,099
Subkutane Fettmasse (10 ³ cm ³)	0,28	0,009
Viszerale Fettmasse (10 ³ cm ³)	0,38	0,0001
Gesamtfettmasse (10 ³ cm ³)	0,39	<0,0001
HCL (%)	0,26	0,016
GOT (U/l)	0,04	0,754
GPT (U/l)	0,07	0,568
γ-GT (U/l)	0,11	0,326
hsCRP (mg/dl)	0,28	0,013
IL-6 (pg/ml)	0,24	0,035
IL-18 (pg/ml)	0,10	0,113
Adiponektin gesamt (μg/ml)	-0,03	0,830
Adiponectin HMW (μg/ml)	0,02	0,865
HbA1c (%)	0,23	0,044
Glukose nüchtern (mg/dl)	0,15	0,184
Glukose 2 h (mg/dl)	0,15	0,157
Insulin nüchtern (mU/l)	0,004	0,971
Insulin 2 h (mU/l)	0,15	0,174
C-Peptid nüchtern (ng/ml)	0,12	0,328
C-Peptid 2 h (ng/ml)	0,17	0,151
IGI-I (au)	-0,08	0,473
IGI-CP (au)	-0,09	0,415
AI (au)	-0,01	0,948
DI (au)	-0,03	0,831
OGIS (ml·min ⁻¹ ·m ⁻²)	-0,19	0,077

Tabelle 6: Korrelation mit Pankreasfettgehalt

Angegeben ist der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient sowie der zugehörige p-Wert für die Korrelation des jeweiligen Parameters mit dem Pankreasfettgehalt.

HCL: hepatocellulärer Fettgehalt, HDL: high-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, FFA: free fatty acids, GOT: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase, CRP: C-reaktives Protein, IL: Interleukin, HMW: high-molecular weight, IGI-I: Insulinogenic index Insulin, IGI-CP: Insulinogenic index C-Peptid, AI: Adaptation index, DI: Disposition index, OGIS: oral glucose insulin sensitivity.

3 | Ergebnisse

Variable	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Alter (Jahre)	0,06	<0,0001	0,06	<0,001	n.a.		n.a.	
Subkutane Fettmasse (10^3 cm^3)	0,84	0,030	1,14	0,011	0,83	0,04	0,57	0,438
Viszerale Fettmasse (10^3 cm^3)	0,59	0,0005	0,91	<0,0001	0,55	0,008	0,47	0,057
FFA ($\mu\text{mol/l}$)	-0,002	0,125	-0,002	0,119	-0,002	0,051	-0,002	0,043
HCL (%)	0,21	0,013	0,21	0,013	0,13	0,097	0,09	0,267
CRP (mg/dl)	0,28	0,056	0,31	0,046	0,15	0,284	0,10	0,466
IL-6 (pg/ml)	0,28	0,066	0,28	0,065	0,01	0,929	-0,05	0,752
IL-18 (pg/ml)	0,25	0,333	0,26	0,333	0,33	0,169	0,29	0,212
Adiponectin total ($\mu\text{g/ml}$)	-0,01	0,965	0,0003	0,999	0,16	0,598	0,25	0,417
Adiponectin HMW ($\mu\text{g/ml}$)	0,013	0,955	-0,06	0,891	0,17	0,460	0,23	0,314
HbA1c (%)	0,99	0,036	0,99	0,037	0,29	0,519	0,25	0,584
IGI-I (au)	-0,21	0,249	-0,21	0,254	-0,14	0,381	-0,15	0,337
IGI-CP (au)	-0,17	0,351	-0,18	0,354	-0,13	0,427	-0,09	0,549
AI (au)	-0,065	0,902	-0,06	0,911	-0,46	0,336	-0,67	0,160
DI (au)	-0,11	0,732	-0,12	0,735	-0,22	0,444	-0,50	0,103
OGIS ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	-1,38	0,089	-1,43	0,088	-0,11	0,894	0,69	0,429

Tabelle 7: Regressionsanalyse

Modell 1: keine Adjustierung, Modell 2: Adjustierung für Geschlecht, Modell 3: Adjustierung für Geschlecht, Alter, Modell 4: Adjustierung für Geschlecht, Alter, BMI, HCL: hepatocellulärer Fettgehalt, FFA: free fatty acids, IGI-I: Insulino-genic index Insulin, IGI-CP: Insulino-genic index C-Peptid, AI: Adaptation index,

DI: Disposition index, OGIS: oral glucose Insulin sensitivity, CRP: C-reaktives Protein, IL: Interleukin, HMW: high-molecular weight.

3 | Ergebnisse

Es zeigt sich beim subkutanen und viszeralen Fettanteil eine Assoziation zum Pankreasfett in Modell 1-3, die nach Berücksichtigung des BMI in Modell 4 verschwindet. Auch der Leberfettgehalt zeigt nach Alters- und BMI Adjustierung keine Korrelation mehr zum Pankreasfett.

Alle Insulinsekretionsindizes zeigen analog zur Korrelationsanalyse keine Assoziation zum Pankreasfettgehalt im rohen Modell (Modell 1), und auch die Adjustierung auf mögliche Störfaktoren ändert dies nicht. Allein der OGIS zeigt auch nach Adjustierung auf das Geschlecht eine grenzwertige inverse Assoziation ($p=0,09$), die aber bereits nach Adjustierung auf das Alter vollständig verloren geht. Ähnlich verhält es sich mit der initial nachweisbaren Assoziation von HbA1c und Pankreasfettgehalt.

Die grenzwertig signifikante Assoziation zwischen den Entzündungsmarkern hsCRP bzw. Il-6 und Pankreasfettgehalt ist nach Adjustierung auf das Alter nicht mehr nachweisbar. Lediglich eine sehr schwache inverse Assoziation zwischen FFA-Spiegeln und Pankreasfettgehalt ist auch noch nach Adjustierung auf alle Störfaktoren nachweisbar.

In einer Sensitivitätsanalyse wurde die 9 Probanden mit IFG und/oder IGT von der Analyse ausgeschlossen, um zu untersuchen, ob dadurch die zugrundeliegende Assoziation bei den Probanden mit NGT verzerrt wurde. Hier zeigte sich aber keine nennenswerte Veränderung der beobachteten Assoziationen.

Es zeigt sich also bei allen erhobenen Werten, dass die Assoziation mit dem Pankreasfettgehalt wesentlich vom Gesamtkörperfettanteil, gemessen als BMI, bestimmt wird.

3.4. Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflussfaktoren der Insulinsekretion

Da der Pankreasfettgehalt im Wesentlichen durch den Gesamtkörperfettgehalt bestimmt zu sein scheint und keine Assoziation mit der Insulinsekretion aufweist, wurde eine explorative Analyse durchgeführt. Hier wurde untersucht welche der erhobenen Daten mit der Insulinsekretion assoziiert sind und welche Störfaktoren für die Assoziation existieren. Als Maß für die Insulinsekretion wurde hierbei der Adaptation index (AI; Tab. 8) verwendet, der die prähepatische Insulinsekretion unter Berücksichtigung der vorherrschenden Insulinsensitivität repräsentiert.

3 | Ergebnisse

Variable	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4	
	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert	β	p-Wert
Alter (Jahre)	0,16	0,19	0,18	0,14	n.a.		n.a.	
Subkutane Fettmasse (10^3 cm^3)	0,24	0,007	0,25	0,01	0,23	0,02	0,29	0,12
Viszerale Fettmasse (10^3 cm^3)	0,08	0,06	0,14	0,003	0,14	0,01	0,13	0,04
Triglyzeride (mg/dl)	0,19	0,001	0,20	0,001	0,20	0,002	0,19	0,003
FFA ($\mu\text{mol/l}$)	0,04	0,65	0,02	0,86	0,01	0,90	0,01	0,95
HCL (%)	0,04	0,06	0,04	0,03	0,04	0,07	0,03	0,18
Pankreasfettgehalt (%)	-0,003	0,90	-0,003	0,91	-0,03	0,34	-0,04	0,16
CRP (mg/dl)	0,68	0,04	0,63	0,07	0,54	0,13	0,44	0,22
IL-6 (pg/ml)	0,06	0,07	0,05	0,08	0,05	0,23	0,03	0,37
IL-18 (pg/ml)	-0,03	0,64	-0,01	0,83	-0,01	0,90	-0,02	0,79
Adiponectin total ($\mu\text{g/ml}$)	-0,14	0,04	-0,23	0,002	-0,22	0,004	-0,21	0,007
Adiponectin HMW ($\mu\text{g/ml}$)	-0,08	0,10	-0,15	0,008	-0,14	0,01	-0,13	0,02
HbA1c (%)	-0,01	0,91	-0,01	0,91	-0,08	0,47	-0,09	0,41

Tabelle 8: Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflussfaktoren der Insulinsekretion, gemessen als AI

Modell 1: keine Adjustierung; Modell 2: Adjustierung für Geschlecht; Modell 3: Modell 2 plus Alter; Modell 4: Modell 3 plus BMI
HCL: hepatocellulärer Fettgehalt, FFA: free fatty acids, CRP: C-reaktives Protein, IL: Interleukin, HMW: high molecular weight

3 | Ergebnisse

Dabei zeigte sich, dass sowohl die verschiedenen Fettkompartimente (subkutan und viszeral) und die ektope Fettspeicherung in der Leber interessanterweise positiv mit der Insulinsekretion assoziiert bzw. grenzwertig assoziiert waren, ebenso wie die systemischen Triglyzeridspiegel, aber nicht die FFA-Spiegel. Allerdings blieben lediglich die Assoziation mit der viszeralen Fettmasse und den Triglyzeriden nach Adjustierung auf Alter, Geschlecht und BMI signifikant ($p < 0,05$).

Umgekehrt waren sowohl die Gesamt- als auch HMW-Adiponektinspiegel invers mit der Insulinsekretion auch nach Adjustierung auf BMI im vollen Modell noch assoziiert.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Pankreasfettanteil zwar mit dem Alter, verschiedenen Maßen des Körperfettgehaltes, dem HbA1c und CRP als proinflammatorischem Marker korreliert, jedoch nicht mit Indices der Insulinsekretion. Allerdings wird die beobachtete Korrelation v.a. durch den BMI bzw. den Körperfettanteil bestimmt, da alle Assoziationen nach Adjustierung auf den BMI nicht mehr nachweisbar waren, wohingegen Alter und Geschlecht eine untergeordnete Rolle spielen.

Einfluss von Alter auf den Pankreasfettgehalt

Bezüglich einer Korrelation zwischen Alter und Pankreasfett finden sich in der Literatur widersprüchliche Daten. Während sich nach Adjustierung auf unterschiedliche Verteilung des Geschlechts bei Heni et al. [81] ebenso wie bei Lim et al. [83] keine Korrelation zwischen Alter und Pankreasfett fand, zeigten andere Studien, unter anderem auch die hier vorliegenden Daten, eine Korrelation zwischen dem Alter des Kollektives und deren Pankreasfettanteil auch nach Adjustierung für das Geschlecht [80, 82, 69, 80]. In der detaillierten Analyse von Saisho et al. wurde mittels CT-Untersuchung an 135 Kindern und über 1800 erwachsenen Probanden gezeigt, dass das Pankreasvolumen in der Kindheit und bei Jugendlichen zunächst zunimmt, im Alter zwischen 20-60 Jahren ein Plateau erreicht und danach stetig abnimmt. Der Anstieg des Pankreasvolumens im Kindes- und Jugendalter betrifft dabei sowohl den Parenchym- als auch den Fettanteil des Pankreas. Mit zunehmendem Alter steigt dann jedoch speziell der Pankreasfettgehalt an und der Parenchymanteil des Pankreas nimmt ab, was bei Menschen mit Typ-2 Diabetes nicht verstärkt festgestellt werden konnte. Zudem wurde der Einfluss eines zunehmenden BMI auf das Pankreasvolumen bestimmt. So steigt mit zunehmendem BMI das Gesamtpankreasvolumen, bestehend aus Parenchym- und Fettanteil an. Betrachtet man die Relation zwischen Parenchym- und Fettanteil zeigt sich jedoch, dass sich die Relation hinsichtlich eines vermehrten Fettgehaltes des Pankreas verschiebt.

Bei Heni et al. war das Probandenkollektiv im Durchschnitt 14 Jahre jünger als bei den vorliegenden Daten ($43,1 \pm 11,4$ vs. 57 ± 11 Jahre), sodass sich deutlich mehr Probanden in der Plateauphase befunden haben und dadurch keine Assoziation mit dem Alter zu beobachten war, während in der vorliegenden Studie mehr Probanden

4 | Diskussion

deutlich über 60 Jahren alt waren und sich damit in der Phase des zunehmenden Abfalls des Pankreasvolumens und Anstiegs des Pankreasfettanteils befanden. Dem gegenüber beschreibt Lim et al. zwar ebenfalls ein älteres Patientenkollektiv (T2D: $51,8 \pm 8,5$), unterscheidet bei den Berechnungen jedoch nicht zwischen Probanden mit Typ-2 Diabetes und normal glukosetoleranten Probanden. Ob diese fehlende Unterscheidung zwischen Probanden mit Typ-2 Diabetes und normal glukosetoleranten Probanden einen Unterschied macht, ist kontrovers. Saisho et al. zeigen in ihrer Computertomographie basierten Studie keinen Einfluss des Glukosehaushaltes auf die Assoziation zwischen Alter und Pankreasfett [69], wohingegen dies in einer neueren $^1\text{H-MRS}$ basierten Studie durchaus unterschiedliche Ergebnisse bringt [72].

Zusammenfassend kann man feststellen, dass je jünger ein Probandenkollektiv ist, sich eine geringe Assoziation zwischen Pankreasfettgehalt und Alter zeigt, was auch die positive Assoziation bei den vorliegenden, an einem relativ alten Probandenkollektiv untersuchten Daten, erklärt. Zudem wird die Korrelation zwischen dem Alter des Kollektives und dem Pankreasfettanteil möglicherweise noch von anderen Einflussfaktoren, wie einer gestörten Glukosetoleranz oder einem erhöhten BMI überdeckt. Der Einfluss des BMI kann nur bei einer Studie ausgeschlossen werden, welche eine Unterscheidung zwischen dem Parenchym- und dem Fettanteil des Pankreas, wie Saisho et al. es taten, macht.

Assoziation von Adipositas sowie speziellen Fettdepots mit dem Pankreasfettgehalt

In den vorliegenden Daten zeigt sich eine starke Korrelation zwischen dem Pankreasfettanteil und allen Parametern, welche die Fettmasse des Körpers (BMI, Gesamtfettmasse des Körpers) oder spezielle Fettdepots der Probanden beschreiben (viszerale Fettmasse, subkutane Fettmasse, hepatozellulärer Fettanteil), wobei die Gesamtfettmasse und die viszerale Fettmasse die stärkste Korrelation zeigen. Diese gesteigerte ektopische Fettspeicherung bei steigender Gesamtfettmasse des Körpers konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden und ist in Leber- und Muskelgewebe mit einer steigenden Insulinresistenz assoziiert [64, 90].

Auch die meisten anderen Studien zeigen die starke Assoziation von BMI und dem Pankreasfettgehalt, wobei es keine Rolle spielt ob dieser mittels $^1\text{H-MRS}$ oder der Computertomographie bestimmt wurde [82, 81, 69]. Lediglich Tushuizen et al. zeigen keine Korrelation zwischen BMI und Pankreasfett [84]. Die relative kleine

4 | Diskussion

Kohorte (n=36) und der sehr hohe mittlere BMI der Probanden (T2D: 31,3 ±1) könnten ein Grund hierfür sein. Zudem differenzierte Tushuizen in der Beschreibung der Korrelation seiner Baseline Charakteristika mit dem Pankreasfett nicht zwischen Nicht-Diabetikern und Probanden mit Typ-2 Diabetes. So hätte sich eventuell eine Korrelation zwischen BMI und Pankreasfett der Probanden gezeigt, wenn dieses wie bei den vorliegenden Daten alleine für die nicht-diabetische Population berechnet worden wäre. Durch das Matching der Kontrollgruppe bezüglich des BMI (T2D: 31,3 ±1, NGT: 29,1 ±1) bei einer so kleinen Fallzahl der Kohorte, erhält man eine sehr kleine Streuung des BMI, was es zudem unwahrscheinlich macht eine Korrelation zwischen BMI und Pankreasfettgehalt darzustellen.

Übereinstimmend mit bereits publizierten Daten aus anderen ¹H-MRS Studien weist der viszerale Fettgehalt eine starke Korrelation zum Pankreasfettgehalt auf [82, 81]. Diese Assoziation wird in der vorliegenden Arbeit zwar durch die Adjustierung auf den BMI als Maß für den Gesamtkörperfettanteil stark vermindert, bleibt aber noch grenzwertig signifikant, während alle anderen Assoziationen zwischen Fettdepots (subkutan, Leberfettgehalt) komplett verschwinden. Dies zeigt, dass insbesondere die viszerale Fettmasse besonders eng mit dem Pankreasfettanteil assoziiert ist, beziehungsweise, dass es sich bei einem Großteil des mittels ¹H-MRS gemessenen Pankreasfettes wohl um viszerales Fett handelt [72].

Auch computertomographische Studien zeigten, dass der viszerale Fettanteil des Menschen eng mit sowohl Insulinsekretion als auch Insulinresistenz zusammen hängt [85, 86].

Durch die Korrelation zwischen pankreatischem Fettgehalt und BMI konnte gezeigt werden, dass das Pankreas einen weiteren Ort für eine ektope Fettspeicherung darstellt, wenn auch eine klare Unterscheidung der exakten Lokalisation des Fettgewebes innerhalb des Organs (inter- vs. intralobulär vs. parenchymatös) besteht. Allerdings konnte die für eine ektope Fettspeicherung in Leber- und Muskelgewebe beobachtete Assoziation mit einer Funktionseinschränkung [64] für das Pankreas in der vorliegenden Studie ebenso wie in weiteren Arbeiten nicht gezeigt werden [72, 80, 82]. Allerdings weiß man bereits, dass neben einem möglichen Einfluss einer ektope Fettspeicherung auf die Insulinsekretion es noch weitere Einflussfaktoren gibt, so z.B. eine Inflammation, eine erhöhte Anzahl an frei zirkulierenden Fettsäuren oder auch erhöhte Aminosäurespiegel.

4 | Diskussion

Assoziation von Entzündungsparametern mit dem Pankeasfettgehalt

Die grenzwertig signifikante Assoziation zwischen den Entzündungsmarkern hsCRP bzw. Il-6 verliert sich nach Adjustierung für das Alter der Kohorte. Dies war bei einer nicht-diabetischen Population durchaus zu erwarten. Der zuvor beschriebene Einfluss einer Inflammation auf die Insulinsekretion zeigte sich auch bisher nur bei Probanden, welche bereits eine gestörte Glukosehomöostase hatten [49, 91]. So wurde die Inflammation erst dann ausgelöst, wenn bereits erhöhte Glukose- oder Lipidspiegel vorlagen, dann führte sie wiederum aber zu einer weiteren Abnahme der β -Zellfunktion.

Weitere Einflussfaktoren der Insulinsekretion

Da die ursprüngliche Hypothese, dass ein erhöhter pankreatischer Fettgehalt zu einer eingeschränkten Insulinsekretion führt, nicht bestätigt werden konnte, wurde nach weiteren Einflussfaktoren der Insulinsekretion gesucht. Als Parameter der Insulinsekretion wurde dabei der Adaptation Index verwendet. Dabei zeigte sich eine positive Assoziation zwischen Insulinsekretion und verschiedenen Parametern, welche den Lipidhaushalt der Probanden beschreiben (subkutanes Fett, viszerales Fett, Triglyzeride, hepatozellulärer Fettgehalt). Diese zunächst kontrovers erscheinende Assoziation lässt sich möglicherweise drauf zurückführen, dass die erhobenen Daten an einer nicht-diabetischen Population erhoben wurden. So kommt es möglicherweise, ähnlich wie in Tierstudien [63] und auch im in vitro Modell [16] gezeigt, bei erhöhten Fetteinlagerungen zunächst zu einer Steigerung der Insulinsekretion. Diese Steigerung kann jedoch bei chronisch erhöhter Exposition nicht aufrechterhalten werden. Zudem führen die lipotoxischen Effekte nach einiger Zeit zu einer Abnahme der β -Zellfunktion. Würde man das Kollektiv also über einen längeren Zeitraum beobachten, käme es möglicherweise erst im Laufe der Zeit zu einer Abnahme der β -Zellfunktion und einer damit einhergehenden Störung im Glukosehaushalt. Warum sich diese positive Assoziation jedoch besonders stark bei den Triglyzeriden zeigt und es hingegen keine Assoziation zu den freien Fettsäuren gibt, ist fraglich. Die in Tierstudien und auch in vitro gezeigte zunächst gesteigerte Insulinsekretion wurde nämlich meist durch eine erhöhte Konzentration von freien Fettsäuren, eventuell in Kombination mit Glukose, untersucht.

Eine inverse Assoziation zeigte sich bei den Gesamt- als auch bei den HMW-Adiponektinspiegeln. Diese Assoziation blieb auch im vollen Modell, nach Adjustierung für den BMI, noch bestehen. Auch dies könnte als

4 | Diskussion

Kompensationsmechanismus des noch gesunden Probandenkollektives gewertet werden.

4.1. Limitationen und methodische Einschränkungen

Nach einer Anwerbung von zunächst 146 Probanden konnten im Endeffekt nur 73 Probanden mit in die Datenaquirierung eingehen. Viele der Probanden fielen aus der Studie aufgrund der Wahl der $^1\text{H-MRS}$. Diese Methode ist zwar nicht invasiv, verbietet jedoch auch die Teilnahme von Probanden mit metallischen Implantaten. Auch die Enge des MRT Gerätes schließt Probanden mit einer bestehenden Klaustrophobie aus der Studie aus. Zu guter Letzt war es nicht immer möglich das Pankreas in der $^1\text{H-MRS}$ überhaupt sicher darzustellen, was weitere 17 Probanden aus der Studie ausschloss. Ein weiteres Problem nicht nur der $^1\text{H-MRS}$, sondern bei allen in vivo Methoden zur Messung des Pankreasfettgehaltes ist, dass nicht unterschieden werden kann zwischen Fett in den β -Zellen und interzellulärem Fettanteil. Ein Vergleich zwischen der $^1\text{H-MRS}$ und einer invasiven Pankreasfettmessung in Ratten zeigte jedoch eine gute Validität der Methode, wobei auch hier nur der Gesamtfettanteil im Pankreas bestimmt werden konnte [63]. Die untersuchte Kohorte von 73 Probanden ist nicht unbedingt repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung. Das Durchschnittsalter mit 57 ± 11 Jahren ist vergleichsweise alt und es wäre wünschenswert gewesen mehr jüngere Probanden mit in die Studie einzubeziehen. Der BMI mit durchschnittlich 25,4 repräsentiert den deutschen Durchschnitt allerdings gut.

Der orale Glukosetoleranztest ist zwar der Goldstandart zur Bestimmung einer Glukosetoleranzstörung, stellt aber im Vergleich zum Clamp die Insulinsekretionsantwort auf einen definierten Glukosereiz weniger genau dar [35]. So kann eine alleinige orale Glukoseaufnahme auch zu einer verminderten Insulinsekretion durch Störungen im GLP System hervorgerufen werden. Dies wird durch Messung mittels Clamp verhindert, was jedoch wiederum keine physiologische Glukosebelastung darstellt.

Der hier benutzte Insulinogenic index hat sich allerdings als valide im Vergleich zu Clamp Messungen gezeigt [88].

4 | Diskussion

4.2. Ausblick

Die vorliegende, erstmals an einer größeren, nicht-diabetischen Population durchgeführte, Studie zeigt, dass der Pankreasfettanteil nicht mit der Insulinsekretion zusammenzuhängen scheint.

So haben andere Variablen, wie erhöhter viszeraler Fettanteil oder BMI, einen größeren Einfluss auf die Insulinsekretion.

Mit dem weiteren Fortschritt der Technik wäre es wünschenswert, wenn in Zukunft in der ^1H -MRS zwischen intrazellulären und interzellulärem Fett im Pankreas unterschieden werden kann, um Probanden noch genauer zu differieren und weitere mögliche Ursachen für eine gestörte Insulinsekretion herauszustellen. So könnte man eventuell zeigen, dass Probanden welche zwar einen hohen BMI und einen hohen Anteil an viszeralem Fett besitzen, jedoch niedrige intrazelluläre Pankreasfettwerte aufweisen, einen gewissen Schutzfaktor gegenüber der Entwicklung eines Typ-2 Diabetes besitzen.

Außer Acht lassen sollte man jedoch auch nicht die Tatsache, dass die Krankheitsentstehung des Typ-2 Diabetes ein multifaktorielles Geschehen darstellt und es sehr viele Einflussfaktoren auf die Insulinsekretion gibt. An der Erforschung dieser Einflussfaktoren und dem Zusammenhang zueinander wird in Zukunft weiter gearbeitet werden müssen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Insulinfreisetzung aus den β -Zellen	S. 8
Abbildung 2	Flussdiagramm der Probandenselektion	S. 41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Grenzwerte der Blutglukose bei venöser Blutentnahme	S. 5
Tabelle 2	Übersicht der bisherigen Studien zur Assoziation von Pankreasfett und Insulinsekretion beim Menschen	S. 22
Tabelle 3	Blutabnahmeschema	S. 32
Tabelle 4	Basischarakteristika	S. 43
Tabelle 5	Glukosestoffwechsel	S. 44
Tabelle 6	Spearman Korrelation mit Pankreasfett	S. 46
Tabelle 7	Regressionsanalyse	S. 47
Tabelle 8	Lineare Regressionsanalyse zu unabhängigen Einflußfaktoren der Insulinsekretion, gemessen als AI	S. 49

6. Literaturverzeichnis

- 1 *Marengoni A, Rizzuto D, Wang H et al.* Patterns of Chronic Multimorbidity in the Elderly Population. *Journal of the American Geriatrics Society* 2009: 225–230
- 2 *Wild S, Roglic G, Green A et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes care* 2004; 27: 1047–1053
- 3 *Gambert SR, Pinkstaff S.* Emerging Epidemic: Diabetes in Older Adults: Demography, Economic Impact, and Pathophysiology. *Diabetes Spectrum* 2006: 221–2228
- 4 *H. Hauner, L. von Ferben, I. Köster.* Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. Sekundärdatenanalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1992: 645–655
- 5 *Rathmann W, Haastert B, Icks A et al.* High prevalence of undiagnosed diabetes mellitus in Southern Germany: target populations for efficient screening. The KORA survey 2000. *Diabetologia* 2003: 182–189
- 6 *Alderman MH, Cohen H, Madhavan S.* Diabetes and cardiovascular events in hypertensive patients. *Hypertension* 1999: 1130–1134
- 7 *Köster I, Ferber L, Hauner H.* Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998-2001. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2003: 2632–2638
- 8 *Koster I, Ferber L von, Ihle P et al.* The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia* 2006: 1498–1504
- 9 American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2010: 62–69
- 10 *Kerner W, Brückel J.* Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes-Gesellschaft. Diabetologie und Stoffwechsel* 2011: 107–110
- 11 *Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften, Timon W.* Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* 2005: 1333–1346
- 12 *Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D.* The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 2013: 46–57
- 13 *DeFronzo RA.* Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009: 773–795
- 14 *Samuel VT, Shulman GI.* The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *Journal of Clinical Investigation* 2016: 12-22
- 15 *Run Y, Hongxiang H, Shlomo M.* Insulin Secretion and Action. *Endocrinology* 2005: 311–319
- 16 *Giudice J, Leskow FC, Arndt-Jovin DJ et al.* Differential endocytosis and signaling dynamics of insulin receptor variants IR-A and IR-B. *Journal of Cell Science* 2011: 801–811

- 17 *Kumashiro N, Erion DM, Zhang D et al.* Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011: 16381–16385
- 18 *Koonen, Debby P Y, Jacobs RL, Febrario M et al.* Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 2007: 2863–2871
- 19 *Sadur CN, Yost TJ, Eckel RH.* Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1984; 59: 1176–1182
- 20 *Roden M.* Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes-- pathogenesis and clinical relevance. *Nature Clinical Practice Endocrinology Metabolism* 2006: 335–348
- 21 *Turner N, Cooney GJ, Kraegen EW et al.* Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *Journal of Endocrinology* 2014; 220: T61-79
- 22 *Nowotny B, Zahiragic L, Krog D et al.* Mechanisms underlying the onset of oral lipid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* 2013: 2240–2248
- 23 *Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E et al.* Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014: 9597–9602
- 24 *Roden M.* Does endurance training protect from lipotoxicity? *Diabetes* 2012: 2397–2399
- 25 *Kahn BB, Pedersen O.* Suppression of GLUT4 expression in skeletal muscle of rats that are obese from high fat feeding but not from high carbohydrate feeding or genetic obesity. *Endocrinology* 1993; 132: 13–22
- 26 *Rothman DL, Shulman RG, Shulman GI.* ³¹P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation* 1992: 1069–1075
- 27 *Roden M, Price TB, Perseghin G et al.* Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *The Journal of Clinical Investigation* 1996: 2859–2865
- 28 *Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG.* Insulin degradation: progress and potential. *Endocrine Review* 1998: 608–624
- 29 *Pfutzner A, Forst T.* Elevated intact proinsulin levels are indicative of Beta-cell dysfunction, insulin resistance, and cardiovascular risk: impact of the antidiabetic agent pioglitazone. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2011: 784–793
- 30 *Halban PA.* Differential rates of release of newly synthesized and of stored insulin from pancreatic islets. *Endocrinology* 1982: 1183–1188
- 31 *Gold G, Gishizky ML, Grodsky GM.* Evidence that glucose "marks" beta cells resulting in preferential release of newly synthesized insulin. *Science* 1982: 56–58

- 32 *Rorsman P, Renstrom E.* Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003: 1029–1045
- 33 *Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985: 412–419
- 34 *Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME et al.* Assessment of Pancreatic β -Cell Function: Review of Methods and Clinical Applications. *Current Diabetes Reviews* 2014: 2–42
- 35 *Roden M.* *Clinical Diabetes Research; 2007, Kapitel 2-4: 7-67*
- 36 *Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G.* Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Research Clinical Practice* 2006: 298–301
- 37 *Mari A, Pacini G, Murphy E et al.* A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes care* 2001: 539–548
- 38 *Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK et al.* Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993: 1663–1672
- 39 *Ahren B, Pacini G.* Impaired adaptation of first-phase insulin secretion in postmenopausal women with glucose intolerance. *The American journal of physiology* 1997: E701-7
- 40 *DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R.* Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology* 1979: E214-23
- 41 *Deacon CF, Ahren B.* Physiology of incretins in health and disease. *Review of Diabetic Studies* 2011: 293–306
- 42 *Faerch K, Vaag A, Holst JJ et al.* Impaired fasting glycaemia vs impaired glucose tolerance: similar impairment of pancreatic alpha and beta cell function but differential roles of incretin hormones and insulin action. *Diabetologia* 2008: 853–861
- 43 *Shen J, Chen Z, Chen C et al.* Impact of incretin on early-phase insulin secretion and glucose excursion. *Endocrine* 2013: 403–410
- 44 *Rask E, Olsson T, Soderberg S et al.* Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2004: 624–631
- 45 *Salehi M, Auling B, D'Alessio DA.* Effect of glycemia on plasma incretins and the incretin effect during oral glucose tolerance test. *Diabetes* 2012: 2728–2733
- 46 *Zhang T, Li C.* Mechanisms of amino acid-stimulated insulin secretion in congenital hyperinsulinism. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2013: 36–43
- 47 *Floyd JC, Fajans SS, Conn JW et al.* Stimulation of insulin secretion by amino acids. *Journal of Clinical Investigation* 1966: 1487–1502
- 48 *Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L et al.* Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes* 2005: 2674–2684

- 49 *Boni-Schnetzler M, Thorne J, Parnaud G et al.* Increased interleukin (IL)-1beta messenger ribonucleic acid expression in beta -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1beta in human islets by glucose and autostimulation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2008: 4065–4074
- 50 *Zhao G, Dharmadhikari G, Maedler K et al.* Possible role of interleukin-1beta in type 2 diabetes onset and implications for anti-inflammatory therapy strategies. *PLoS computational biology* 2014: e1003798
- 51 *Böni-Schnetzler M, Boller S, Debray S et al.* Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology* 2009: 5218–5229
- 52 *Maedler K, Sergeev P, Ris F et al.* Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *Journal of Clinical Investigation*. 2002: 851–860
- 53 *Maedler K, Spinass GA, Lehmann R et al.* Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50: 1683–1690
- 54 *Mudaliar H, Pollock C, Ma J et al.* The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose. *PloS one* 2014: e108844
- 55 *Itoh Y, Kawamata Y, Harada M et al.* Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 2003: 173–176
- 56 *Graciano MF, Valle M, Kowluru A et al.* Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. *Islets* 2014: 213–223
- 57 *Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC et al.* Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *The Journal of biological chemistry* 2004: 51049–51056
- 58 *Lee Y, Hirose H, Ohneda M et al.* Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994: 10878–10882
- 59 *Yuzefovych L, Wilson G, Rachek L.* Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2010: E1096-105
- 60 *Piro S, Anello M, Di Pietro C et al.* Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism* 2002: 1340–1347
- 61 *Yin J, Peng Y, Wu J et al.* Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and beta-cell dysfunction. *Journal of leukocyte biology* 2014: 47–52
- 62 *Donath MY, Boni-Schnetzler M, Ellingsgaard H et al.* Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. *Physiology (Bethesda)* 2009: 325–331

- 63 *Lingvay I, Esser V, Legendre JL et al.* Noninvasive quantification of pancreatic fat in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2009: 4070–4076
- 64 *Szendroedi J, Roden M.* Ectopic lipids and organ function. *Current Opinion in Lipidology* 2009: 50–56
- 65 *Anderwald C, Bernroider E, Krssak M et al.* Effects of insulin treatment in type 2 diabetic patients on intracellular lipid content in liver and skeletal muscle. *Diabetes* 2002: 3025–3032
- 66 *Ruberg FL, Chen Z, Hua N et al.* The relationship of ectopic lipid accumulation to cardiac and vascular function in obesity and metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2010: 1116–1121
- 67 *Smits MM, van Geenen, Erwin J M.* The clinical significance of pancreatic steatosis. *Nature Reviews Gastroenterology Hepatology* 2011: 169–177
- 68 *Kim SY, Kim H, Cho JY et al.* Quantitative assessment of pancreatic fat by using unenhanced CT: pathologic correlation and clinical implications. *Radiology* 2014: 104–112
- 69 *Saisho Y, Butler AE, Meier JJ et al.* Pancreas volumes in humans from birth to age one hundred taking into account sex, obesity, and presence of type-2 diabetes. *Clinical Anatomy* 2007: 933–942
- 70 *Hu HH, Kim H, Nayak KS et al.* Comparison of fat-water MRI and single-voxel MRS in the assessment of hepatic and pancreatic fat fractions in humans. *Obesity (Silver Spring)* 2010: 841–847
- 71 *Szczepaniak EW, Malliaras K, Nelson MD et al.* Measurement of pancreatic volume by abdominal MRI: a validation study. *PloS one* 2013: e55991
- 72 *Begovatz P, Koliaki C, Weber K et al.* Pancreatic adipose tissue infiltration, parenchymal steatosis and beta cell function in humans. *Diabetologia* 2015: 1646–1655
- 73 *Giacca A, Xiao C, Oprescu AI et al.* Lipid-induced pancreatic beta-cell dysfunction: focus on in vivo studies. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 2011: E255-62
- 74 *Dubois M, Kerr-Conte J, Gmyr V et al.* Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration. *Diabetologia* 2004: 463–469
- 75 *Somesh BP, Verma MK, Sadasivuni MK et al.* Chronic glucolipotoxic conditions in pancreatic islets impair insulin secretion due to dysregulated calcium dynamics, glucose responsiveness and mitochondrial activity. *BMC cell biology* 2013: 31
- 76 *El-Assaad W, Joly E, Barbeau A et al.* Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology* 2010: 3061–3073
- 77 *Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK et al.* Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 2008: 424–431

- 78 *Poitout V, Amyot J, Semache M et al.* Glucolipototoxicity of the Pancreatic Beta Cell. *Biochimica et biophysica acta* 2010: 289–298
- 79 *Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS et al.* Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents. *International journal of obesity* 2010: 396–400
- 80 *Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ et al.* Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes care* 2007: 2916–2921
- 81 *Heni M, Machann J, Staiger H et al.* Pancreatic fat is negatively associated with insulin secretion in individuals with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance: a nuclear magnetic resonance study. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2010: 200–205
- 82 *van der Zijl, N J, Goossens GH, Moors, C C M et al.* Ectopic fat storage in the pancreas, liver, and abdominal fat depots: impact on β -cell function in individuals with impaired glucose metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2011: 459–467
- 83 *Lim S, Bae JH, Chun EJ et al.* Differences in pancreatic volume, fat content, and fat density measured by multidetector-row computed tomography according to the duration of diabetes. *Acta diabetologica* 2014: 739–748
- 84 *Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ et al.* Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes care* 2007: 2916–2921
- 85 *Wagenknecht LE, Langefeld CD, Scherzinger AL et al.* Insulin sensitivity, insulin secretion, and abdominal fat: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family Study. *Diabetes* 2003: 2490–2496
- 86 *Utzschneider KM, Carr DB, Hull RL et al.* Impact of intra-abdominal fat and age on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 2004: 2867–2872
- 87 *Machann J, Thamer C, Stefan N et al.* Follow-up whole-body assessment of adipose tissue compartments during a lifestyle intervention in a large cohort at increased risk for type 2 diabetes. *Radiology* 2010: 353–363
- 88 *Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G.* Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006: 298–301
- 89 *Cox M, Edelmann D.* Tests for Screening and Diagnosis of Type 2 Diabetes. *Clinical Diabetes* 2009: 132–138
- 90 *Shulman GI.* Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England journal of medicine* 2014: 1131–1141
- 91 *Choudhury S, Ghosh S, Gupta P et al.* Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF-kappaB and SAPK/JNK pathway. *Free radical research* 2015: 1371–1383

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. univ. Michael Roden, für die Erarbeitung des Themas, der Initiierung der Studie und der wissenschaftlichen Betreuung und Unterstützung bei dem Erstellen dieser Arbeit.

Auch möchte ich Frau Dr. med. Bettina Nowotny danken, die mir stets betreuend zur Seite stand mit allzeit guten Ratschlägen, konstruktiver Kritik und einem offenen Ohr für jedwede Probleme bei der Erstellung der Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Deutschen Diabetes Zentrums, die bei der Durchführung der Studie geholfen haben.

Danken möchte ich im besonderen Franziska Wallscheid, die während des Studiums weit mehr als nur eine Kommilitonin geworden ist. Nur durch die gegenseitige Motivation, die vielen guten Gespräche und das Anhalten zum Weiterarbeiten ist es zur Fertigstellung dieser Arbeit gekommen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meiner Familie. Nur durch Ihre Unterstützung habe ich sowohl das Studium als auch die Dissertation überhaupt beendet. Sie waren stets an meiner Seite, ob mit aufbauenden Worten, Ablenkung oder auch mal einem kleinen Motivationstritt. Auch in schwersten Zeiten konnte ich mir ihres Rückhaltes auf Erden oder im `wonderland` immer sicher sein und dafür bin ich unendlich dankbar.