

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H-U. Häring

**Akut- Effekte von Hyperinsulinämie und von einer
Erhöhung der Freien Fettsäuren auf die
Insulinsensitivität und den Intramyozellulären
Lipidgehalt bei Gesunden**

**Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard- Karls- Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Thomas Maier
aus
Hechingen
2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Jacob

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Schick

Meinen Eltern

1	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	BEDEUTUNG UND EPIDEMIOLOGIE DES TYP 2 DIABETES MELLITUS.....	1
1.2	PATHOGENESE DES TYP 2 DIABETES	1
1.3	PATHOGENESE DER INSULINRESISTENZ	3
1.3.1	BEDEUTUNG DER FREIEN FETTSÄUREN.....	3
1.3.2	MÖGLICHE MECHANISMEN.....	4
1.3.3	ROLLE INTRAMUSKULÄR GELEGENER LIPIDE.....	7
1.4	ZIELE DER ARBEIT.....	8
2	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>10</u>
2.1	PROBANDENKOLLEKTIV	10
2.2	STUDIENAUFBAU	11
2.3	STUDIENPROTOKOLL.....	12
2.4	HYPERINSULINÄMISCHER- EUGLYKÄMISCHER GLUKOSE- CLAMP.....	14
2.5	¹ H-MR-SPEKTROSKOPIE	14
2.5.1	PRINZIP	14
2.5.2	AUSWERTUNG DER SPEKTREN	17
2.6	BESTIMMUNGEN IM SERUM	18
2.7	STATISTIK.....	19
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>21</u>
3.1	STUDIE 1 (HI+F).....	21
3.1.1	METABOLISCHE PARAMETER IM SERUM	21
3.1.2	GIR.....	21
3.1.3	IMCL.....	22
3.2	STUDIE 2 (HI).....	22
3.2.1	METABOLISCHE PARAMETER IM SERUM	22
3.2.2	GIR.....	23
3.2.3	IMCL.....	23
3.3	STUDIE 3 (F)	23
3.3.1	METABOLISCHE PARAMETER IM SERUM	23
3.3.2	IMCL.....	24
3.4	STUDIE 1 (HI+F) vs. STUDIE 2 (HI) - EIN INTRAINDIVIDUELLER VERGLEICH	24

4	DISKUSSION.....	27
4.1	FETTINFUSION BEI HYPERINSULINÄMIE VERSCHLECHTERT DIE INSULINSENSITIVITÄT (BEKANNT).....	27
4.2	DER INTRAMYOZELLULÄRE FETTGEHALT WIRD EXPERIMENTELL AKUT ERHÖHT ..	28
4.3	BEDEUTUNG EINER VERMEHRTEN MUSKULÄREN LIPIDAKKUMULATION FÜR DIE PATHOGENESE DER INSULINRESISTENZ	29
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	33
5	ZUSAMMENFASSUNG	34
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	36
7	ANHANG- ABBILDUNGEN.....	45
7.1	STUDIE 1 (HI+F) VS. STUDIE 2 (HI).....	45
8	DANKSAGUNG.....	50
9	LEBENS LAUF.....	51

1 Einleitung

1.1 Bedeutung und Epidemiologie des Typ 2 Diabetes mellitus

Mit einer Prävalenz von 3-10 % ist der Typ 2 Diabetes eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Welt (1,2,3). Man geht davon aus, dass die Zahl der noch nicht diagnostizierten Fälle mindestens ebenso hoch liegt. Danach leben in der Bundesrepublik Deutschland etwa vier Millionen Menschen mit manifestem und ebenso viele mit nicht diagnostiziertem Typ 2 Diabetes. Von allen Formen des Diabetes mellitus macht der Typ 2 über 95% aus. Die Betroffenen erleiden häufig die typischen Spätfolgen, wie Retinopathie, Nephropathie und Polyneuropathie. Vor allen Dingen aber kommt es schon relativ früh zu arteriosklerotischen Veränderungen größerer Gefäße, insbesondere der Koronararterien, in deren Folge ein akuter Herzinfarkt auftreten kann. Häufig wird der Diabetes erst nach einem Gefäßereignis entdeckt. Diabetiker haben dabei ein deutlich erhöhtes Risiko, an einer koronaren Herzerkrankung zu sterben (4,5).

1.2 Pathogenese des Typ 2 Diabetes

Charakterisiert ist der Typ 2 Diabetes durch zwei Defekte, zum einen durch die Insulinresistenz und zum anderen durch eine gestörte β - Zellfunktion des Pankreas (6-8). Welche primäre Störung dem Typ 2 Diabetes zugrunde liegt, ist nach wie vor unklar. In den β - Zellen wird Insulin produziert. Insulin ist das entscheidende Hormon für die Regulation des Glukosestoffwechsels. Es steigert die Glukoseaufnahme des Muskel- und des Fettgewebes und aktiviert die Enzyme für die Glykogensynthese und die Glykolyse, zusätzlich hemmt Insulin die Lipolyse und stimuliert die Proteinsynthese. Unter Insulinresistenz versteht man eine verminderte Wirkung des Insulins an allen peripheren Zielzellen, sie betrifft also sowohl die Skelettmuskulatur, als auch das Fettgewebe und die Leber. Wenn im folgenden von Insulinresistenz die Rede ist, so ist die Insulinresistenz der Glukoseaufnahme gemeint. Die Insulinresistenz der Glukoseaufnahme ist bereits viele Jahre bevor sich der Diabetes mit erhöhten Blutzuckerwerten manifestiert

(9,10) u.a. mittels Glukose- Clamp- Technik, dem Goldstandard zur Messung der Insulinsensitivität (11), nachweisbar. Man stellt sich vor, dass in dieser Zeit die verminderte Insulinwirkung noch durch eine gesteigerte Insulinsekretion des Pankreas kompensiert werden kann. Erst wenn diese Kompensation versagt, so die Hypothese, entwickelt sich die Glukoseintoleranz mit Hyperglykämie (6-8).

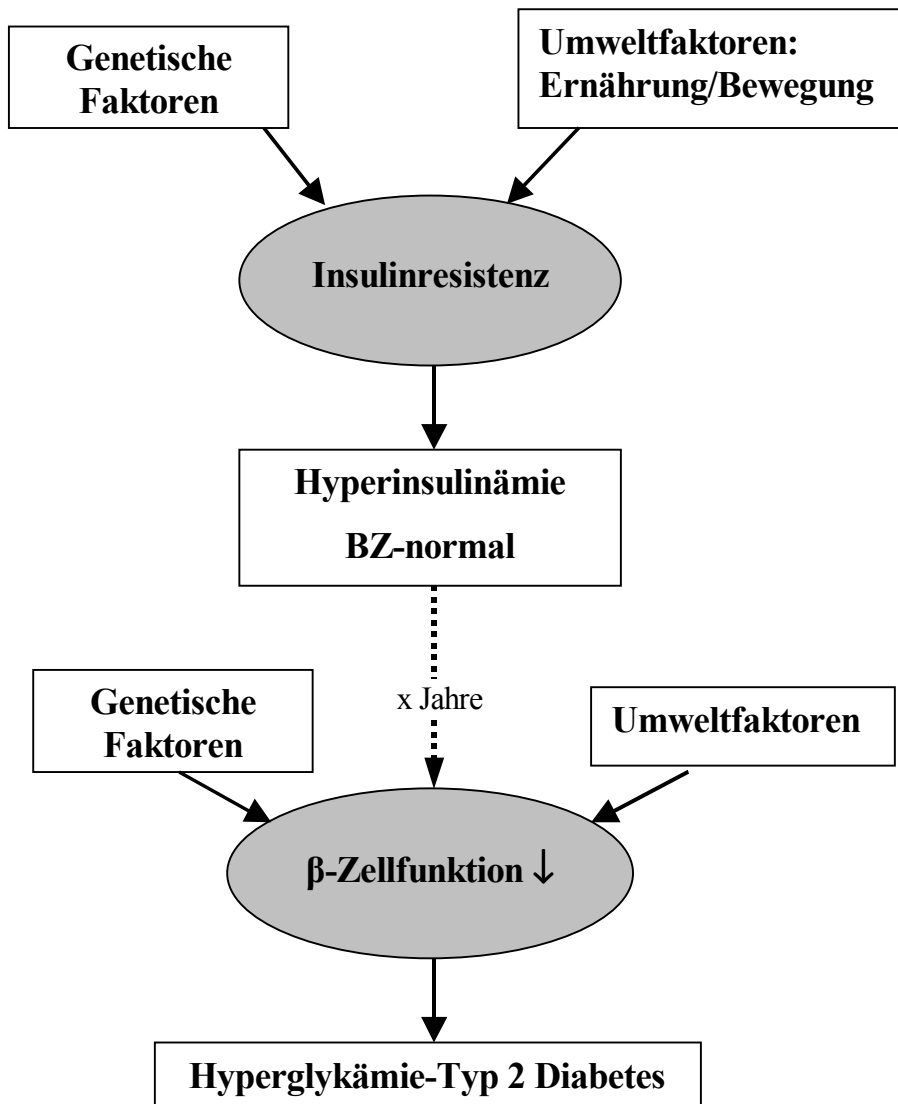


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus. Genetische Einflüsse und Umweltfaktoren gelten als Risikofaktoren für die Entwicklung der Insulinresistenz. Diese kann durch Hyperinsulinämie jahrelang kompensiert werden. Man nimmt an, dass sich der Typ 2 Diabetes manifestiert, wenn die β -Zellfunktion abnimmt.

1.3 Pathogenese der Insulinresistenz

Für die Entwicklung einer verminderten Insulinsensitivität spielt eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle (12,13). Bei der Mehrzahl aller gesunden Nachkommen von Typ 2 Diabetikern kann bereits eine Insulinresistenz festgestellt werden (13, 14). Doch nicht nur genetische Faktoren, sondern auch Einflüsse des Lebensstils, insbesondere die Ernährungsweise und die sportliche Aktivität, haben eine große pathogenetische Bedeutung (Abbildung 1). Häufig findet sich Insulinresistenz auch bei normoglykämischen Patienten mit Adipositas und bei Patienten mit Dyslipoproteinämie, bzw. bei Patienten mit arterieller Hypertonie (15-18). Eine fettreiche Ernährung gilt als ein Risikofaktor für die Entwicklung des Typ 2 Diabetes (19-24). Eine Gewichtsreduktion geht ebenso wie sportliches Ausdauertraining mit einer Verbesserung der Insulinsensitivität einher (25-32).

Die oft zu beobachtende Koinzidenz von Fett- und Glukosestoffwechselstörungen führte dazu, dass der Fettmetabolismus zunehmend an Bedeutung für das pathogenetische Verständnis des Typ 2 Diabetes gewonnen hat (33).

1.3.1 Bedeutung der Freien Fettsäuren

Einen wichtigen Einfluss auf die Insulinsensitivität scheinen die Freien Fettsäuren (FFS) zu haben. Dabei korreliert die Konzentration der FFS negativ mit der Insulinsensitivität (10,34,35). Epidemiologische Studien zeigen, dass ein erhöhter Nüchternspiegel an FFS ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes ist (36). Es wird derzeit angenommen, dass diese vermehrten FFS das Resultat einer vermehrten Lipolyse im Fettgewebe sind (37-39). Experimentell gelingt es, durch eine mehrstündige Fettinfusion bei zuvor insulinsensiblen Probanden akut eine Verminderung der Glukoseaufnahme hervorzurufen (40-45). Entscheidend ist dabei die Zeitdauer der Fettinfusion. Während unter einer zweistündigen Infusion keine wesentlichen Veränderungen auftraten (46,47), wurde von mehreren Gruppen gezeigt, dass es nach einer vierstündigen Fettinfusion zu einem signifikantem

Abfall der Glukoseinfusionsrate (GIR) im Glukose- Clamp und damit der insulin-stimulierten Glukoseaufnahme kommt (40-45).

1.3.2 Mögliche Mechanismen

Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, die erklären können, wie ein hohes Angebot an FFS zu Insulinresistenz führt. Einmal kommt es zu einer Substrat-Kompetition im Skelettmuskel zwischen FFS und Glukose („Randle-Mechanismus“) (48). Energie wird vermehrt aus der Lipidoxidation gewonnen, wohingegen die Glukoseutilisation vermindert wird. In der Folge steigt die intrazelluläre Glukose-6-Phosphat- Konzentration an, was nachfolgend zu einer Hemmung der Hexokinase und letztlich konsekutiv zu einem Rückgang der Glukoseaufnahme führt (Abbildung 2). Bereits 1963 demonstrierten Randle et al. diese Zusammenhänge am perfundierten Rattenherz (48). Als alleinige Ursache wird der Randle Mechanismus allerdings kontrovers diskutiert. Neuere klinische Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Substrat-Kompetition nur einen Teil des fettinduzierten Abfalls der Glukoseaufnahme erklärt (43,44). Zusätzlich wurde eine Störung der Insulin- Signal- Transduktion auf Post- Rezeptorebene beschrieben, in deren Folge der Glukosetransport gehemmt wird (49-56). In diesem Zusammenhang wird eine verminderte Aktivität der IRS-1 (insulin- related-substrate) assoziierten PI 3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) diskutiert (49,50). Die PI-3-Kinase ist ein Schlüsselenzym u.a. für die Translokation des Glukosetransporters Glut-4 in die Muskelzellmembran. Es konnte gezeigt werden, dass FFS und Di- Acyl- Glycerole (DAG) die Proteinkinase C θ aktivieren, was zur Phosphorylierung und Inhibition der Tyrosin- Kinase- Aktivität des Insulin-Rezeptors führt mit der Folge einer Abnahme der IRS-1 assoziierten PI-3-Kinase-Aktivität (Abbildung 3). (50,57). Auch die Arbeiten von Roden et al. und Boden et al., in denen die Effekte einer Lipidinfusion auf den Glukosestoffwechsel untersucht wurden (siehe 1.3.2), stehen zum Teil in Widerspruch zu den Aussagen von Randle (41-45). Beide Arbeitsgruppen konnten zwar bei einer Fettinfusion ebenfalls, wie von Randle postuliert, einen Rückgang der Glukose- Oxidation bei

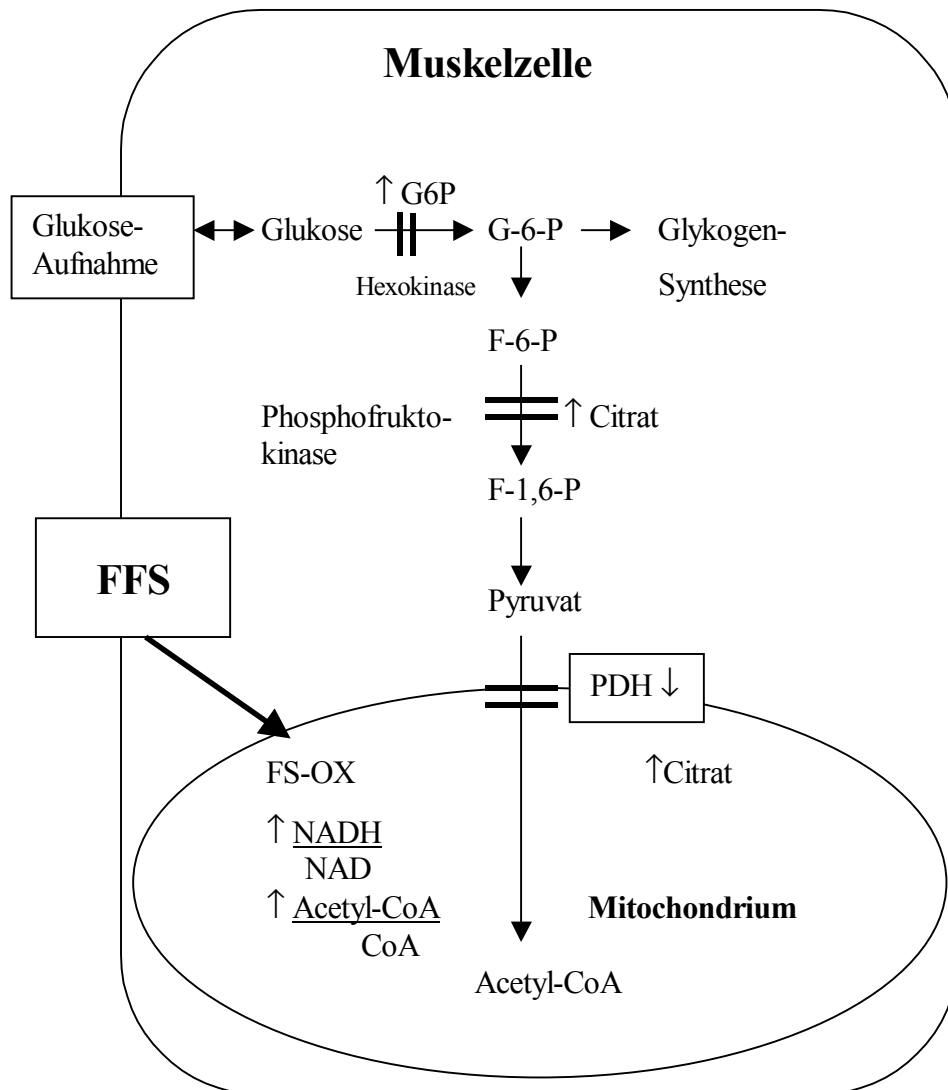


Abbildung 2: Gezeigt wird der Randle-Mechanismus (Substratkompetition, 48). Ein hohes Angebot an Freien Fettsäuren führt zu einer gesteigerten Fettsäure-Oxidation (FS-OX) in deren Folge das Verhältnis von NADH/NAD ebenso zunimmt wie das Verhältnis von Acetyl-CoA/CoA, was eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) zur Folge hat. Die Citrat-Konzentration nimmt ebenfalls zu, wodurch die Phosphofruktokinase gehemmt wird und infolge dessen die Glukose-6-Phosphat-Konzentration ansteigt. Daraus resultiert eine Hemmung der Hexokinase und führt so letztlich zu einer Abnahme der Glukoseaufnahme

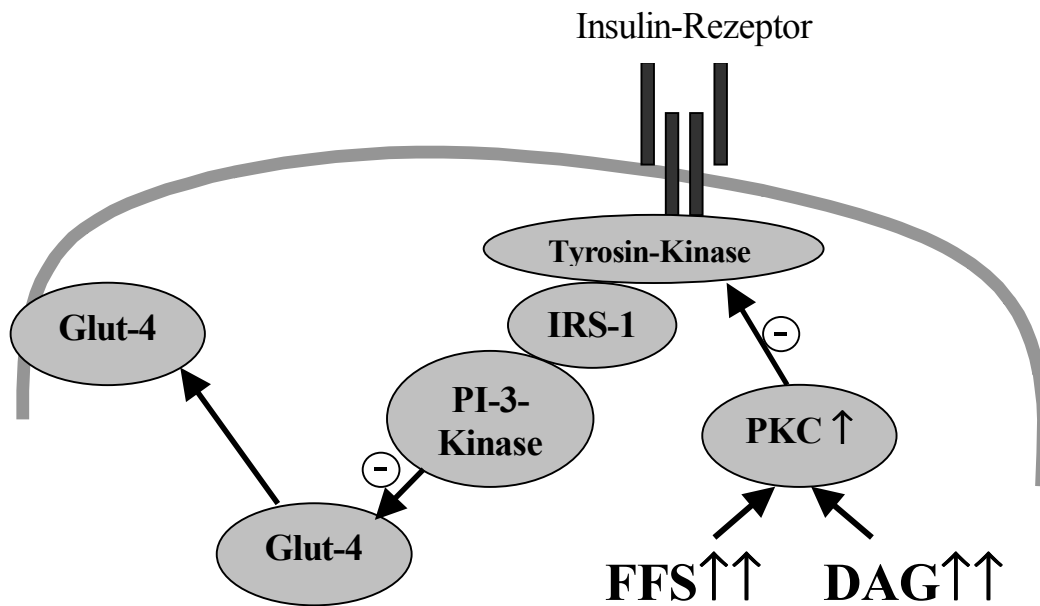


Abbildung 3: Gezeigt sind die möglichen Folgen eines erhöhten Angebotes an FFS und an Di- Acylglycerolen (DAG) im Zytosol der Muskelzelle: FFS und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC), was zu einer Phosphorylierung und Inhibition der Tyrosinkinase des Insulinrezeptors und nachfolgend zu einer Reduktion der IRS-(Insulin- Related-Substrate) abhängigen PI-3-Kinase- Aktivität führt (50,57). Die PI-3-Kinase ist ein Schlüsselenzym für die Translokation des Glut-4-Transporters in die Muskelzellmembran.

gesteigerter Fettsäure- Oxidation im Sinne der Substrat-Kompetition feststellen. Während sich diese Veränderungen jedoch bereits in den ersten 120 min der Lipidinfusion einstellten, kam es erst nach 3-4 Stunden zu einem signifikanten Rückgang der Glukoseaufnahme (41-45). Folglich kann die Substrat-Kompetition nicht die alleinige Ursache der verminderten Glukoseaufnahme sein. Es müssen noch weitere Veränderungen in der Zelle die Glukoseaufnahme beeinträchtigen. Boden et al. fanden darüber hinaus einen dosisabhängigen Effekt der FFS. Mittlere Konzentrationen von FFS (~550 $\mu\text{Mol/l}$) führten zu einer gleichmäßigen Reduktion sowohl der Glukose- Oxidation als auch der Glykogensynthese. Auch diese Beobachtung lässt sich am ehesten mit einer direkten Hemmung des Glukosetransports oder der Glukose- Phosphorylation erklären, nicht dagegen mit

einer vermehrten Glykogenspeicherung der nicht oxidierten Glukose. Nur bei hohen Konzentrationen an FFS ($\sim 750 \mu\text{Mol/l}$) fand sich darüber hinaus noch eine zusätzliche Hemmung der Glykogensynthetase- Aktivität (41-43). Roden et al. untersuchten die Änderungen der Glukose-6-Phosphat-Konzentration unter einer Lipid + Heparin- Infusion (44,45). Nach der Aufnahme in die Zelle wird die Glukose zunächst zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phosphat ist dann das Ausgangssubstrat für die weiteren Glukose- Stoffwechselwege (Abbildung 2). Da in diesen Untersuchungen eine durch FFS induzierte Reduktion der Glukose-Oxidation und der Glykogensynthese beobachtet werden konnte, müsste man gemäß des Randle- Mechanismus einen Anstieg der Glukose-6-Phosphat-Konzentration infolge mangelnder Weiterverwertung erwarten, bevor es durch diesen Anstieg zu einer Abnahme der Glukose- Aufnahme kommt. Der Randle- Mechanismus setzt schließlich eine erhöhte Konzentration an Glukose-6-Phosphat für die Hemmung der Hexokinase voraus. Dagegen fanden Roden et al. unter einer Lipidinfusion eine geringere insulinstimulierte Zunahme der Glukose-6-Phosphat-Konzentration als unter einer NaCl- Kontrollinfusion. Dies spricht gegen eine Schlüsselrolle der Substratinhibition. Demnach müssten die Freien Fettsäuren vielmehr eine Störung bereits auf der Ebene der Glukose- Phosphorylation oder des Glukose- Transports verursachen (44,45). Dabei kann die Ursache für den gestörten Glukose- Transport auf allen Schritten der Insulin- Signal- Transduktion liegen.

1.3.3 Rolle intramuskulär gelegener Lipide

In den letzten Jahren ergaben sich Hinweise dafür, dass neben den subkutan und viszeral gelegenen Fettspeichern auch intramuskulär gelegene Lipide existieren, die in der Pathogenese der Insulinresistenz eine besondere Rolle spielen könnten. Im Tiermodell gelang es, durch eine fettreiche Ernährung Insulinresistenz zu verursachen (23,24,58,59). Interessanterweise ließ sich zudem das Nahrungsfett im Muskel wiederfinden, wo es akkumulierte (23,24). Auch bei Typ 2 Diabetikern findet man einen höheren Fettgehalt in Muskelbiopsien im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (60). Früher gab es nur zwei Möglichkeiten, den intramuskulären Fettgehalt zu bestimmen: entweder durch eine Muskelbiopsie oder

durch den Vergleich von Dichtesignalen im CT-, bzw. MR- Bild. Beide Methoden haben große Nachteile: Die Muskelbiopsie ist zum einen ein invasives Verfahren, zum anderen werden lange Aufbereitungsverfahren benötigt, ehe man aus den gewonnen Extrakten, die zu untersuchenden Substanzen bestimmen kann. Alle diese Schritte können zu Fehlern der Untersuchungsergebnisse führen. Die CT- und MR- Bilder auf der anderen Seite erlauben nur eine sehr ungenaue Quantifizierung der muskulären Lipide. Inzwischen macht es der technische Fortschritt möglich, den Fettgehalt im Muskel nichtinvasiv mittels ^1H -MR Spektroskopie zu messen. Eine unterschiedliche geometrische Anordnung der in der Muskelzelle selbst gelegenen Fette und der extramyozellulär gelegenen Fette erlaubt dabei zudem die Differenzierung zwischen diesen beiden Kompartimenten (61-63). Während die intramyozellulär gelegenen Lipide (IMCL) als kugelförmige Tröpfchen im Zytosol der Muskelzellen vorliegen, ordnen sich die extramyozellulären Lipide (EMCL) in Septen parallel zu den Muskelfasern an (61). Mit diesem Verfahren konnte man nicht nur belegen, dass beim Menschen ein intramyozelluläres Lipidkompartiment nachweisbar ist, sondern zudem dass der Gehalt der intramyozellulären Lipide (IMCL) auch bei Nachkommen von Typ 2 Diabetikern und bei gesunden Personen ohne Familienanamnese mit dem Grad der Insulinresistenz korreliert (64-66). Interessanterweise wiesen auch insulinresistente, schlanke Probanden gegenüber einer gepaarten Kontrollgruppe mehr Fett in den Muskelzellen auf (64). Demnach scheint die intramyozelluläre Lipidakkumulation keineswegs die sekundäre Folge einer generalisierten Ueberladung mit Lipiden bei Adipositas zu sein, sondern könnte vielmehr in engem Zusammenhang mit der Insulinresistenz stehen.

1.4 Ziele der Arbeit

Bisher wurde der intramyozelluläre Fettgehalt lediglich an unterschiedlichen Probandenkollektiven unter der Fragestellung, ob eine Korrelation mit der Insulinsensitivität besteht, gemessen. Unbekannt ist aber bislang, ob diese intramyozellulären Lipide relativ statisch sind oder ob sie innerhalb kurzer Zeit aufgebaut werden können. Weiterhin ist bisher unklar, welche Faktoren dabei eine Rolle spielen. Einem hohen Serumspiegel an FFS und einer Hyperinsulinämie

könnte dabei eine wichtige Bedeutung zukommen. Bisher wurde mehrfach beschrieben, dass eine Fett- + Heparin- Infusion über mehr als vier Stunden während eines hyperinsulinämischen Glukose- Clamps eine Insulinresistenz der Glukoseaufnahme induziert. Bei diesen Experimenten hat man allerdings nur, neben der Glukoseaufnahme im Gesamtkörper, die Glykolyse- Rate, die Glykogensynthese und die Auswirkungen auf die Fettsäure- Oxidation im Organismus untersucht (40-45). Dagegen gibt es bislang keine Informationen über mögliche Veränderungen des lokalen, besonders des muskulären Lipidpools. Dabei ist zu erwarten, dass gerade die Kombination aus Fett- + Heparin- Infusion und Hyperinsulinämie ideale Voraussetzungen für die Neubildung von Triglyceriden im Muskel schaffen, da zum einen ausreichend Substrat angeboten wird und zum anderen, durch die Hyperinsulinämie, Schlüsselenzyme der Lipidsynthese aktiviert werden (67). Besonders interessant wäre dabei, ob eine Zunahme des IMCL mit einer Reduktion der GIR assoziiert ist. In Analogie zu den Experimenten von Boden und Roden haben wir deshalb über einen Zeitraum von sechs Stunden Fett-+Heparin infundiert und gleichzeitig einen euglykämischen, hyperinsulinämischen Glukose- Clamp durchgeführt und dabei in engen Zeitfenstern den Verlauf des IMCL in zwei unterschiedlichen Skelettmuskeln (M.tibialis ant. und M.soleus) mittels ¹H-MR Spektroskopie gemessen.

Dabei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Kann experimentell innerhalb weniger Stunden eine Zunahme des IMCLs erreicht werden ?
2. Reicht Hyperinsulinämie allein, bzw. die Erhöhung der Freien Fettsäuren alleine aus, um den intramyozellulären Lipidgehalt zu erhöhen?
3. Verändert sich die Insulinsensitivität während der Untersuchungen ?
4. Kann die Hypothese bestätigt werden, wonach ein Anstieg des IMCL mit einer Verschlechterung der Insulinsensitivität assoziiert ist?

2 Material und Methoden

2.1 Probandenkollektiv

Die Auswahl der Probanden erfolgte über das sogenannte TÜFF- Projekt (Tübinger Familien- Früherfassung), einer groß angelegten, prospektiven Studie zur (Früh-) Erfassung metabolischer Störungen. Alle Personen, die ins TÜFF- Projekt aufgenommen wurden, wurden im Rahmen dieses Projekts metabolisch umfassend charakterisiert.

Aus diesem Gesamtkollektiv wurden sechs gesunde, schlanke Männer ausgewählt. Alle hatten einen unauffälligen oGTT gemäß der Kriterien der WHO (68,69). Die anthropometrischen Daten der Probanden sind in Tabelle 1 aufgeführt. Keiner der Probanden nahm zum Zeitpunkt der Studie Medikamente ein. Die Teilnehmer wurden angewiesen, drei Tage vor der Untersuchung eine Standardkost einzuhalten und sich nicht ungewöhnlich körperlich zu belasten. Alle Probanden wurden über die Studie und die möglichen Gefahren der Untersuchungen informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die gesamte Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen überprüft und genehmigt.

Tabelle 1: Auflistung der Probanden mit Angabe des Alters, body mass index (BMI), waist to hip ratio (WHR) und des Körperfettanteils.

Nr.	Alter	BMI (kg/m ²)	WHR	Körperfett (%)
3	25	23,3	0,78	21
4	22	21,5	0,79	18
5	32	23,2	0,83	21
10	33	21,2	0,9	17
9	25	18,7	0,84	12
7	31	21,7	0,97	7
Mittelwert	28,0 ± 1,86	21,6 ± 0,69	0,8 ± 0,03	16,0 ± 2,25

2.2 Studienaufbau

Es wurden insgesamt drei Unterstudien durchgeführt, um die Auswirkungen von Hyperinsulinämie und von einer Erhöhung der Freien Fettsäuren auf das IMCL und die Insulinsensitivität zu untersuchen. In Studie 1 wurde die Kombination aus hohen FFS- Spiegeln und Hyperinsulinämie untersucht, in Studie 2 inwieweit eine Hyperinsulinämie allein und in Studie 3 inwieweit eine Erhöhung der Freien Fettsäuren allein zu einem Anstieg des IMCLs führt (Abbildung 4).

Bei allen drei Studien blieben die Probanden während der gesamten Untersuchung in der Kernspinnröhre, so dass alle 30 Minuten eine ^1H -MR Spektroskopie der Unterschenkelmuskulatur zur Messung des IMCLs im M.tibialis anterior und im M.soleus erfolgen konnte.

Studie 1: Effekte von erhöhten zirkulierenden FFS bei gleichzeitiger Hyperinsulinämie auf das intramyozelluläre Fett und die Insulinsensitivität (F+HI)

An dieser Teilstudie nahmen alle sechs Probanden teil. Die supraphysiologischen Konzentrationen zirkulierender FFS wurden durch eine sechsstündige Infusion einer 20%igen Triglyceridemulsion (1,5 ml/min Intralipid 20, ®Pharmacia & Upjohn) und Heparin (Bolus von 250 IE und anschließend konstante Rate von 0,4 IE/kg*min, ®Braun, Deutschland) erreicht. Die zusätzliche Heparin- Infusion diente dabei der Spaltung der Triglyceride in FFS und Glycerol über eine Aktivierung der Lipase. Gleichzeitig wurde ein hyperinsulinämischer, euglykämischer Glukose- Clamp zur Ermittlung der GIR durchgeführt (s.u.).

Studie 2: Effekte von Hyperinsulinämie ohne erhöhte Plasmaspiegel der FFS auf das IMCL und die Insulinsensitivität (HI)

6 Probanden nahmen an dieser Kontrollstudie teil. Es wurde wie in Studie 1 ein sechsstündiger, hyperinsulinämischer, euglykämischer Glukose- Clamp durchgeführt. Statt der Triglyceridemulsion wurde aber NaCl (®Delta- Pharma) mit einer konstanten Rate von 1,5ml/min infundiert.

Studie 3: Effekte erhöhter FFS- Konzentrationen im Serum auf das IMCL ohne Hyperinsulinämie (F)

An dieser zweiten Kontrollstudie nahmen nur 3 Probanden teil. Bei dieser Untersuchung wurde über sechs Stunden lediglich eine 20%ige Triglyceridemulsion (1,5 ml/min Intralipid 20, ®Pharmacia &Upjohn) und Heparin (Bolus von 250 IE und anschließend konstante Rate von 0,4 IE/kg*min, ®Braun, Deutschland) infundiert. Es wurde kein Glukose- Clamp durchgeführt.

2.3 Studienprotokoll

Die Untersuchungen begannen morgens um 6 Uhr. Die Probanden kamen nüchtern in die Klinik. Zunächst wurden zwei Verweilkanülen gelegt, eine für die Blutabnahmen in eine rechte Unterarmvene und eine für die Infusionen in eine linke Unterarmvene. Aus technischen Gründen im Kernspin war es nicht möglich, den Unterarm mit Hilfe einer elektrischen Heizmanschette zu erwärmen, um das Blut zu arterialisieren. Dann wurde der rechte Unterschenkel der Probanden in der Kernspinspule positioniert und, um Bewegungen weitestgehend auszuschließen, mit einer festen Schaumstoffunterlage fixiert. Nach der Abnahme des Nüchternblutes und der Messung des IMCLs vor der Infusion (= basal) erfolgte der Start des euglykämischen- hyperinsulinämischen Glukose- Clamps (Studien 1 und 2) und der Fett-(Studien 1 und 3) bzw., NaCl-(Studie 2) Infusion. In halbstündigen Abständen erfolgten die Messungen des intramyozellulären Fettgehalts mittels ¹H- MR-Spektroskopie (s.a. Abbildung 4).

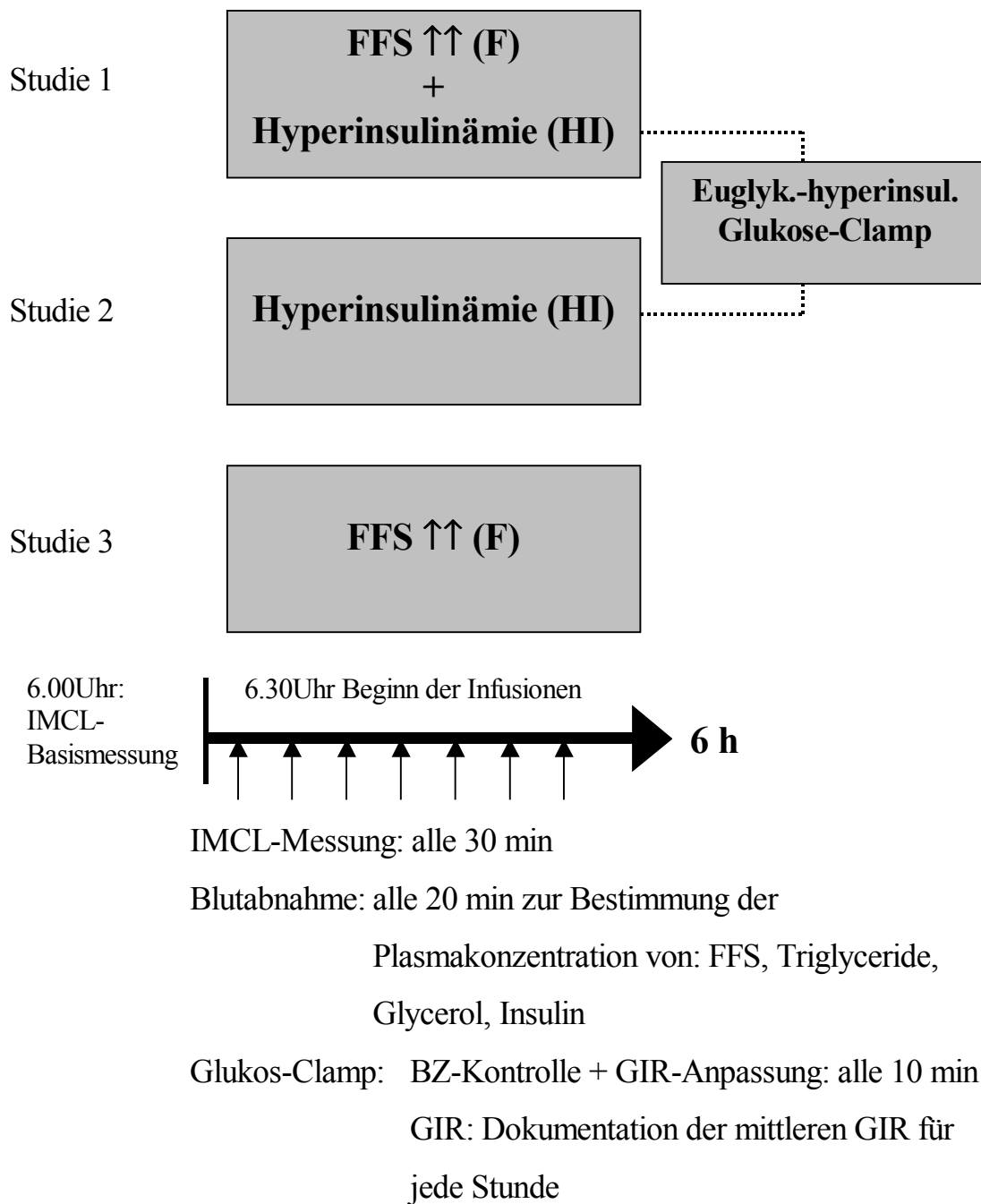


Abbildung 4: Studiendesign: erhöhte FFS- Spiegel wurden durch eine Fett + Heparin-Infusion erreicht (Studie 1+3), Hyperinsulinämie im Rahmen des durchgeführten hyperinsulinäm- euglykäm. Glukose-Clamp (Studie 1+2). IMCL (intramyozellulärer Lipidgehalt), GIR (Glukose- Infusions- Rate).

2.4 Hyperinsulinämischer- euglykämischer Glukose- Clamp

Die hyperinsulinämisch- euglykämische Glukose- Clamp- Technik erlaubt die Quantifizierung der insulin-stimulierten Glukoseaufnahme unter standardisierten Bedingungen. Die Durchführung des Clamps geschah nach dem von DeFronzo et al. beschriebenen Protokoll (11). Insulin (Insuman ®, Höchst, Deutschland) wurde nach einer Bolusgabe mit einer kontinuierlichen Rate von 1,0 mU/kg*min infundiert, wodurch konstante Serum- Insulin- Konzentrationen erzielt werden konnten. Die Plasma- Glukose wurde durch eine exogene Glukose- Infusion (40%, 400g Glukose/1000ml H₂O, ®Delta- Pharma) im euglykämischen Bereich konstant gehalten. Dazu wurde der Blutzucker alle zehn Minuten gemessen und anschließend nach dem Feedback- Prinzip die Glukoseinfusionsrate variiert. Da bei einem hyperinsulinämischen Glukose- Clamp hohe Insulinspiegel erreicht werden (Infusionsrate 1 mU/kg*min), wird bei Gesunden die endogene hepatische Glukoseproduktion, annähernd komplett supprimiert (70). Daher entspricht die zur Aufrechterhaltung der Euglykämie erforderliche Glukose- Infusions- Rate (GIR) im wesentlichen der vom Gewebe aufgenommenen Glukosemenge und kann damit als indirektes Maß für die Insulinsensitivität herangezogen werden.

2.5 ¹H-MR-Spektroskopie

2.5.1 Prinzip

Die Protonen Magnetresonanz- Spektroskopie (¹H MRS) ermöglicht eine nicht-invasive Bestimmung der muskulären Lipide mit Differenzierung der Anteile von intramyozellulärem Fett und extramyozellulärem Fett der Lipozyten (61-63). Elektronenmikroskopische Bilder zeigen das intramyozelluläre Fett (IMCL) als kugelförmige Tropfen, während sich das extramyozelluläre Fettkompartiment (EMCL) in Septen parallel zu den Muskelfaserbündeln anordnet (61). Die

unterschiedlichen geometrischen Anordnungen dieser Fettkompartimente bewirken aufgrund von Suszeptibilitätsunterschieden differierende Larmorfrequenzen und ermöglichen somit eine Trennung der beiden Kompartimente in den Spektren. Bei paralleler Ausrichtung der Muskelfaserbündel bezüglich des statischen Magnetfeldes B_0 beträgt die Frequenzdifferenz bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla etwa 13-15 Hz. Abbildung 6 a zeigt ein Spektrum aus dem M.tibialis anterior, in dem die Trennung der beiden Lipidkompartimente deutlich zu erkennen ist. Im M.soleus ist die Aufspaltung zwischen EMCL und IMCL aufgrund der gefiederten Muskelfaseranordnung deutlich geringer (Abb. 6 b).

Die MR- Untersuchungen wurden an einem 1,5 Tesla- Ganzkörpertomographen (Magnetom Vision, Siemens, Erlangen) vorgenommen. Zur Einstrahlung der Hochfrequenz und zum Auslesen der Signale wurde die zirkular polarisierte Extremitätenspule des Herstellers verwendet. Nach Positionierung der Probanden und Fixation des Beins wurden zunächst T1-gewichtete Querschnittsbilder zur Darstellung der Unterschenkeltopographie aufgenommen, mit deren Hilfe die einzelnen Muskelgruppen gut voneinander abgegrenzt werden konnten (Abbildung 5). Zur Volumenselektion der $(11 \times 11 \times 20)$ mm³ großen Volumenelemente (VoI) für die MRS- Untersuchungen wurde eine single- voxel STEAM- Technik (Stimulated Echo Acquisition Mode) Technik eingesetzt. Vor der Akquisition der Spektren erfolgte eine manuelle Optimierung der Magnetfeldverteilung innerhalb des VoI's (Shim). Dieser Vorgang ist relativ zeitaufwendig (ca. 5 min pro VoI), jedoch unabdingbar, um ausreichend schmale Spektrallinien und somit eine gute Separierung der intra- und extramyozellulären Lipid- Komponenten zu erzielen. Zur Vermeidung von Signalverlusten durch transversale Relaxationsprozesse wurde für die STEAM- Sequenz eine kurze Echozeit ($T_E = 10$ ms) gewählt. Die Repetitionszeit T_R betrug 2 s. Um die Lipidsignale mit einem ausreichenden Signal- zu- Rausch- Verhältnis darstellen zu können, wurden für jedes Spektrum 40 Akquisitionen aufgenommen und gemittelt. Das dominierende Wassersignal wurde mittels eines frequenzselektiven Sättigungspulses unterdrückt.

Der IMCL- Gehalt wurde in zwei physiologisch unterschiedlichen Muskelgruppen gemessen, dem schnell kontrahierenden M.tibialis anterior und dem langsam kontrahierenden M.soleus. Da der M.tibialis anterior sehr inhomogen von

Fettsepten durchzogen ist, wurde das VoI in einem möglichst fettseptenfreien Bereich positioniert. Der M. soleus dagegen ist sehr gleichmäßig von Fettlamellen durchzogen, so dass das VoI ohne Schwierigkeiten in einen repräsentativen Bereich gelegt werden konnte.

Bei eigenen Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der gemessenen IMCL- Werte lag der Schwankungsbereich zwischen 2 und 10 % beim M. tibialis anterior, beim M. soleus betrug die Variation 2-15 % (62). Die Möglichkeit einer separierten Quantifizierung von IMCL und EMCL mittels ¹H-MR-Spektroskopie belegen auch Untersuchungen bei Patienten mit Lipodystrophie, einer seltenen Krankheit unklarer Ätiologie, die mit extrem verringerten subkutanen und septalen Fettdepots einhergeht. In den Spektren konnte, dem Krankheitsbild entsprechend, kein EMCL-Signal, jedoch ein deutliches IMCL-Signal detektiert werden (71,72).

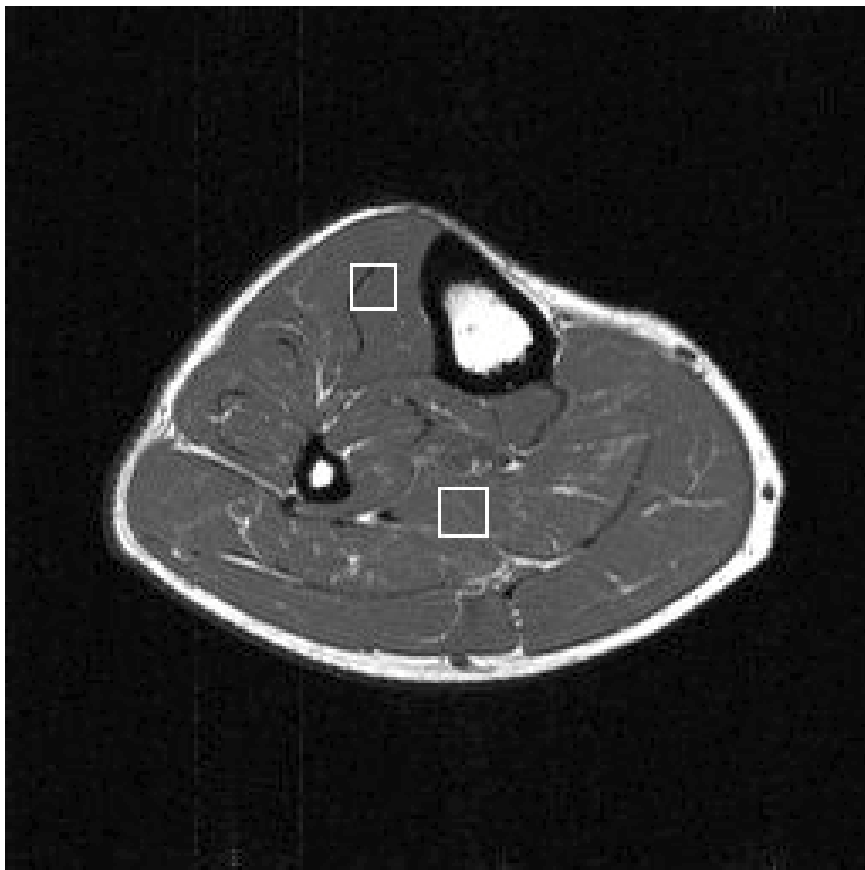


Abbildung 5: T1-gewichtetes Spin- Echo des Unterschenkels, Voxellage in einem möglichst fettseptenfreien Bereich im M. soleus und im M. tibialis anterior

2.5.2 Auswertung der Spektren

Die akquirierten Spektren wurden in der Zeitdomäne mit einer Gaußfunktion gefiltert (Zentrum bei 0 ms, Halbwertsbreite bei 150 ms) und nach der Fouriertransformation einer Phasenkorrektur nullter und erster Ordnung unterzogen. Die Signalintensitäten wurden durch Integration in festen Integrationsgrenzen möglichst objektiv bestimmt, wobei die Basislinie jeweils vom Untersucher festgelegt wurde. Vergleichende Bestimmungen an einzelnen Spektren ergaben intra- und interindividuelle Variationen der bestimmten Integrale von weniger als 5 %.

Als interne Referenz zur Skalierung der chemischen Verschiebungen und der Signalintensitäten diente das Methyl- Signal von Creatin bei 3,05 ppm. Die Creatinkonzentration ist innerhalb einer Muskelgruppe gleichmäßig verteilt und von der Insulinsensitivität unabhängig. Zur Bestimmung der Lipidsignale wurden die Integrale der CH₂-Signale von intramyozellulärem Fett im Bereich von 1,3-1,5 ppm bezogen auf das Integral des Creatin- Methyl- Signals im Bereich von 3,0-3,1 ppm bestimmt. Man erhält so den IMCL/Creatin- Quotienten, der als Maß für den intramyozellulären Lipidgehalt dient (Abbildung 6).

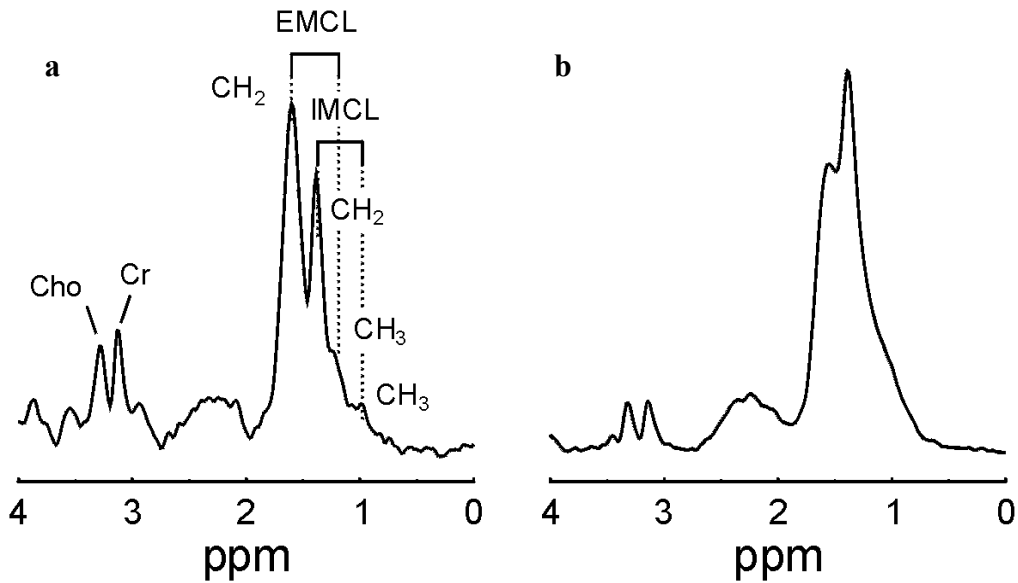


Abbildung 6: Spektren aus beiden Muskelgruppen. (a) *M. tibialis ant.*, (b) *M. soleus*. Spektrum a ist stellvertretend für beide Spektren beschriftet (Cho = Cholin, Cr = Creatin, EMCL = extramyozelluläres Fett, IMCL = intramyozelluläres Fett). Zu erkennen ist die deutlich bessere Aufspaltung in EMCL und IMCL im *M. tibialis ant.*

2.6 Bestimmungen im Serum

Alle Analysen wurden mit kommerziell erhältlichen Methoden durchgeführt. Die Serumwerte für Insulin (MEIA ABBOTT, Wiesbaden, Deutschland), Freie Fettsäuren (WAKO Chemikalien, Neuss, Deutschland), Triglyceride und Glycerol (Sigma diagnostics, Deisenhofen, Deutschland) wurden im Zentrallabor der Universität Tübingen bestimmt. Die Plasmaspiegel von Insulin, der FFS, der Triglyceride und von Glycerol wurden alle 20 Minuten ermittelt. Die Blutzuckerspiegel wurden während des Glukose- Clamps im Vollblut alle 10 Minuten an einem automatischen Glukoseanalysator (YSI, Yellow Springs Instruments, Ohio, USA) mit der Glukoseoxidase- Methode bestimmt.

2.7 Statistik

Zunächst erfolgte eine Überprüfung, ob es infolge der durchgeführten Interventionen innerhalb der Studie 1, bzw. der Studie 2 zu statistisch signifikanten Änderungen der gemessenen Parameter (Insulin, FFS, Glycerol, Triglyceride, IMCL, GIR) kam. Dies wurde mittels gepaartem T- Test berechnet. Dazu wurde für Insulin, FFS, Glycerol, Triglyceride und IMCL der Anfangs- und der Endwert (0 min vs. 360 min) verglichen. Für die Glukose- Infusions- Rate wurde die mittlere GIR der zweiten (60-120 min) und der sechsten Stunde (300-360 min) herangezogen. Die GIR der zweiten Stunde wurde vor dem Hintergrund ausgewählt, dass in bisherige Studien, vor allen Dingen ab der dritten bis vierten Stunde Veränderungen der Insulinsensitivität zu beobachten waren (35-40), wohingegen eine zweistündige Lipidinfusion zu keiner Reduktion der Glukose-Aufnahme führte (41,42). Als Referenz für die Insulinempfindlichkeit der Probanden diente daher die mittlere GIR der zweiten Stunde aus Studie 1 (HI+F).

Die Bewertung der Effekte der einzelnen Interventionen auf das IMCL und die GIR erfolgte durch einen intraindividuellen Vergleich der Studien 1 (HI+F) mit der Studie 2 (HI).

In Studie 3 (F) war die Fallzahl für eine statistische Auswertung zu gering (nur 3), so dass hier lediglich die Mittelwerte \pm Standardfehler berechnet wurden. Die Varianzanalyse für wiederholte Messungen wurde verwendet, um die zeitabhängigen Parameter, die während der sechsstündigen Untersuchung erhoben wurden, auf signifikante Unterschiede zu testen. Von Interesse war dabei ein Vergleich der zeitabhängigen Parameter zwischen Studie 1(HI+F) und Studie 2 (HI).

Dabei ist der Faktor Gruppe, der die beiden Studien beschreibt ein „between groups“ – Faktor. Der zweite Faktor, die Zeit ist ein „within groups“ – Faktor. Er beschreibt die Unterschiede zwischen Beginn und Ende der Untersuchungen. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wurden nur die wesentlichen Punkte in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Ausgewählt wurden immer die Messwerte zum Zeitpunkt 0 min (= nüchtern = baseline) und zum Zeitpunkt 360 min (Ende der Untersuchung). Lediglich bei der Glukose- Infusions- Rate (GIR) wurde die

mittlere GIR der zweiten Stunde mit der mittleren GIR der sechsten Stunde verglichen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Effekte der einzelnen Faktoren werden folgendermaßen bezeichnet:

p₁ beschreibt den Effekt des Faktors Gruppe, d.h. Unterschiede der einzelnen Parameter zwischen Studie 1 und Studie 2.

p₂ beschreibt den Effekt des Faktors Zeit, d.h. Unterschiede zwischen Anfang und Ende der Untersuchung. Aufgrund der geringen Aussagekraft dieses Wertes für die bei diesen Untersuchungen ermittelten Daten wurde er im Ergebnisteil nicht berücksichtigt.

p₁₂ beschreibt den Effekt der Wechselwirkung zwischen den Faktoren Gruppe und Zeit. d.h. die Unterschiede zwischen Anfang und Ende der Versuchsphase in Abhängigkeit davon, ob lediglich eine Hyperinsulinämie bestand (Studie2) oder ob zusätzlich eine Lipidinfusion durchgeführt wurde (Studie 1: HI+F)
In den Tabellen zur Statistik sind die Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Parameter und die p- Werte der T- Tests und der Varianzanalyse für wiederholte Messungen angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Studie 1 (HI+F)

3.1.1 Metabolische Parameter im Serum

Glukose, Insulin:

Bei den sechs Probanden, die an Studie 1 (und auch an Kontrollstudie- Studie 2) teilnahmen, lag der Nüchternblutzucker bei $91 \pm 6,6$ mg/dl . Die Blutzuckerspiegel wurden während der gesamten Untersuchung konstant im euglykämischen Bereich gehalten (Abbildung 8a). Der Serum- Insulin- Spiegel lag zu Beginn bei $4,6 \pm 1,2$ μ U/ml und stieg dann infolge der Insulininfusion signifikant an und erreichte nach 360 min einen fast 13-mal höheren Wert als zu Beginn ($57,8 \pm 3,6$ μ U/ml, $p < 0,0005$ vs. baseline; Tabelle 2; Abbildung 8b).

FFS, Triglyceride, Glycerol:

Die Serumkonzentration der FFS nahm von nüchtern $417,5 \pm 93,2$ μ mol/l auf $3733,2 \pm 235,3$ μ mol/l nach 360 min signifikant zu ($p < 0,0005$ vs. baseline). Ebenso stiegen die Serumspiegel der Triglyceride von $55,5 \pm 9,1$ mg/dl auf $294,3 \pm 61,9$ mg/dl ($p=0,009$ vs. baseline) und von Glycerol von $55,1 \pm 10,0$ μ mol/l auf $970,5 \pm 81,8$ μ mol/l nach 360 min signifikant an ($p < 0,0005$ vs. baseline; Tabelle 2; Abbildung 10a,b,c).

3.1.2 GIR

Die Glukoseinfusionsrate (GIR) nahm in der ersten Stunde kontinuierlich zu, erreichte dann in der zweiten Stunde ein Maximum bei $\sim 9,5$ mg/kg*min und nahm anschließend wieder kontinuierlich bis zum Ende der Untersuchung ab. In den statistischen Berechnungen wurde die mittlere GIR der zweiten Stunde mit der mittleren GIR in der sechsten Stunde verglichen (Abbildung 9a und 9b). Die GIR betrug in der zweiten Stunde im Mittel $8,5 \pm 0,9$ mg/kg*min und in der sechsten

Stunde $5,1 \pm 1,1$ mg/kg*min. Dies entspricht einer Abnahme um 40 % ($p=0,012$ vs. baseline; Tabelle 3).

3.1.3 IMCL

Nach sechsstündiger Fettinfusion und gleichzeitiger Hyperinsulinämie stieg der intramyozelluläre Lipidgehalt im M. soleus signifikant an, von anfangs $11,9 \pm 2,5$ AU (Arbitrary Units) um 17 % auf $13,9 \pm 2,3$ AU ($p = 0,003$) nach 360 min (Abbildung 11a,12a) und im M. tibialis ant. von anfangs $2,8 \pm 0,4$ AU um 64 % auf $4,6 \pm 0,5$ AU ($p = 0,009$) nach 360 min (Tabelle 4; Abbildung 11b,12b).

3.2 Studie 2 (HI)

3.2.1 Metabolische Parameter im Serum

Glukose, Insulin:

In Studie 2 (Hyperinsulinämie + NaCl) betrug der Blutzuckerspiegel im Nüchternblut $87 \pm 8,5$ mg/dl und wurde während der gesamten Untersuchung in diesem Bereich gehalten. Die basale Konzentration von Insulin im Serum lag bei $5,5 \pm 1,2$ μ U/ml und stieg dann auf $61,4 \pm 7,5$ μ U/ml nach 360 min an ($p = 0,001$ vs. baseline; Tabelle 2; Abbildung 8).

FFS, Triglyceride, Glycerol:

Im Nüchternblut ergaben sich für FFS Werte von $417,7 \pm 122,8$ μ mol/l für Triglyceride $81,3 \pm 19,4$ mg/dl und für Glycerol $57,2 \pm 11,4$ μ mol/l). Bei alleiniger Hyperinsulinämie in Studie 2 nahmen die Plasmakonzentrationen der FFS, Triglyceride und von Glycerol signifikant ab, ein steady state war nach ~100 min erreicht. Nach 360 min lagen die Plasmaspiegel der FFS $5,8 \pm 2,8$ μ mol/l ($p=0,02$ vs. baseline), der Triglyceride bei $39,8 \pm 7,2$ mg/dl ($p=0,022$ vs. baseline) und von Glycerol bei $14,0 \pm 1,2$ μ mol/l ($p=0,01$ vs. baseline; Tabelle 2; Abb. 10).

3.2.2 GIR

Im Gegensatz zu Studie 1 nahm die GIR bis zum Erreichen eines steady state nach ~200 min weiter zu. In der zweiten Stunde wurden im Mittel $7,0 \pm 1,3$ mg/kg*ml Glukose infundiert, in der sechsten Stunde im Mittel $12,9 \pm 1,0$ mg/kg*ml, was einer Zunahme um 84 % entspricht ($p=0,006$ vs. baseline; Tabelle 3; Abbildung 9).

3.2.3 IMCL

In Studie 2 kam es unter alleiniger Hyperinsulinämie zu keiner signifikanten Änderung des IMCLs. Hier blieb das IMCL sowohl im M.soleus als auch im M.tibialis ant. konstant. Für beide Muskeln ergab sich praktisch keine Änderung des IMCLs (M.soleus: $11,4 \pm 1,6$ AU zu Beginn $11,0 \pm 1,4$ AU, nach 360 min, $p=0,237$, Abbildung 11a,12a; M.tibialis ant. anfangs: $2,1 \pm 0,4$ AU, nach 360 min: $2,2 \pm 0,4$ AU, $p=0,502$; Tabelle 4; Abbildung 11b, 12b).

3.3 Studie 3 (F)

3.3.1 Metabolische Parameter im Serum

Glukose, Insulin:

Der Blutzuckerspiegel blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum im euglykämischen Bereich. Die Insulinspiegel im Serum lagen zu Beginn der Untersuchung bei $4,3 \pm 1,1$ μ U/ml und verdoppelten sich im Laufe der Untersuchung auf $8,6 \pm 2,7$ μ U/ml (Tabelle 2).

FFS, Triglyceride, Glycerol:

Die Nüchtern- Konzentrationen der FFS lagen bei $516,0 \pm 17$ μ mol/l, der Triglyceride bei $64,0 \pm 5$ mg/dl von Glycerol bei $105,3 \pm 11,7$ μ mol/l. Sowohl die Werte der FFS und Triglyceride als auch die Werte von Glycerol stiegen während der Lipidinfusion rasch an und erreichten am Ende der Untersuchung vergleichbare Werte wie in Studie 1. Nach 360 min betrug die Serum- Konzentrationen der FFS

3834,5 \pm 588,5 μ mol/l, der Triglyceride 421,5 \pm 78,5mg/dl und von Glycerol 1236,6 \pm 197,6 μ mol/l (Tabelle 2).

3.3.2 IMCL

In Studie 3 (F) nahm das IMCL im M.soleus von 12,4 \pm 2,3 AU zu Beginn auf 13,9 \pm 2,7 AU, im M.tibialis ant. von 2,2 \pm 1,2 AU auf 2,9 \pm 1,3 AU nach 360 min zu (Tabelle 4; Abbildung12).

3.4 Studie 1 (HI+F) vs. Studie 2 (HI) - ein intraindividueller Vergleich

Insulin, FFS, Glycerol, Triglyceride:

Die Varianzanalyse für wiederholte Messungen ergab für Insulin keinen Unterschied zwischen den beiden Studien ($p_1 = 0,62$; Tabelle 2). Für FFS ($p_1 < 0,0005$), Triglyceride ($p_1 = 0,011$) und Glycerol ($p_1 < 0,0005$) ergaben sich in Studie 1 (HI+F) höhere Werte während der Untersuchung als in Studie 2 (HI).

GIR:

Die mittlere Glukose- Infusions- Rate in der zweiten Stunde war in beiden Studien nicht signifikant verschieden (ermittelt mit ungepaartem t- Test; $P = 0,133$). Dagegen ergab sich für den zeitlichen Verlauf von der zweiten zur sechsten Stunde ein signifikanter Unterschied ($p_{12} = 0,002$) zwischen den beiden Studien. In Studie 1 nahm die GIR von der zweiten bis zur sechsten Stunde um 40 % ab, in Studie 2 dagegen um 84 % zu (Tabelle 3).

IMCL:

Die Ausgangswerte des IMCLs in Studie 1 waren vergleichbar mit denen in Studie 2 (M.soleus: $p = 0,647$; M.tibialis ant.: $p = 0,207$). Dagegen lag das IMCL insgesamt im Laufe der Untersuchung in Studie 1 höher als in Studie 2 (M.soleus: $p_1 = 0,176$; M.tibialis ant.: $p_1 = 0,002$). Die erhöhten Insulin- und FFS- Spiegel in Studie 1 führten zu einem signifikanten Anstieg des IMCL in beiden Muskelgruppen (M.soleus +17 % nach 360 min - $p = 0,003$; M.tibialis ant. +64 % nach 360 min - p

=0,009; siehe 3.1.2). Dagegen blieb das IMCL in Studie 2 unter alleiniger Hyperinsulinämie konstant (siehe 3.2.3). Für den zeitlichen Verlauf ergab sich damit ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Studien (M.soleus: $p_{12} = 0,001$; M.tibialis ant.: $p_{12} = 0,014$; Tabelle 4, Abbildungen 11 und 12).

Tabelle 2: Metabolische Parameter vor und am Ende der Untersuchungen. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, sowie die Ergebnisse aus den gepaarten (0 vs. 360 min) t-tests und der Varianzanalyse zwischen Studie 1 und Studie 2 (HI+F vs. HI).

	HI+F	HI	HI+F vs. HI	F
FFS ($\mu\text{mol/l}$)				
0 min	417,5 \pm 93,2	417,7 \pm 122,8	$p_1 < 0,0005$	516,0 \pm 17
360 min	3733,2 \pm 235,3	5,8 \pm 2,8		3834,5 \pm 588,5
0 min vs. 360 min	$p < 0,0005$	$p = 0,02$		
Triglyc. (mg/dl)				
0 min	55,5 \pm 9,1	81,3 \pm 19,4	$p_1 = 0,011$	64,0 \pm 5
360 min	294,3 \pm 61,9	39,8 \pm 7,2		421,5 \pm 78,5
0 min vs. 360 min	$p = 0,009$	$p = 0,022$		
Glycerol ($\mu\text{mol/l}$)				
0 min	55,1 \pm 10,0	57,2 \pm 11,4	$p_1 < 0,0005$	105,3 \pm 11,7
360 min	970,5 \pm 81,8	14,0 \pm 1,2		1236,6 \pm 197,6
0 min vs. 360 min	$p < 0,0005$	$p = 0,01$		
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)				
0 min	4,6 \pm 1,2	5,5 \pm 1,2	$p_1 = 0,62$	4,3 \pm 1,1
360 min	57,8 \pm 3,6	61,4 \pm 7,5		8,6 \pm 2,7
0 min vs. 360 min	$p < 0,0005$	$p = 0,001$		

Tabelle 3: Mittlere Glukose- Infusions- Rate (GIR) in Studie 1 (HI+F) und Studie 2 (HI) während der zweiten und sechsten Stunde.

	GIR 2.Std. (mg/kg*min)	GIR 6.Std. (mg/kg*min)	Änderung in %	2.Std. vs. 6.Std.	Varianzanalyse
HI+F	8,5 ± 0,9	5,1 ± 1,1	-40 ± 8,8	p = 0,012	
HI	7,0 ± 1,3	12,9 ± 1,0	+84 ± 31,7	p = 0,006	
HI+F vs. HI	p = 0,133 (2.Std.)				p₁₂ = 0,002

Tabelle 4: Intramyozellulärer Lipidgehalt vor und nach der Untersuchung. Daten der Studien 1 (HI+F), 2 (HI) und 3 (F).

	IMCL (AU) 0 min	IMCL (AU) 360 min	Änderung in %	0 min vs. 360 min	Varianzanalyse
M.soleus					
HI+F.	11,9 ± 2,5	13,9 ± 2,3	17 ± 1,7	p = 0,003	
HI	11,4 ± 1,6	11,0 ± 1,4	-3 ± 2,4	p = 0,237	
F	12,4 ± 2,3	13,9 ± 2,7	12 ± 2,8		
HI vs. HI+F	p = 0,647 (basal)				p ₁ = 0,176 p₁₂ = 0,001
M.tibialis					
HI+F	2,8 ± 0,4	4,6 ± 0,5	64 ± 23,2	p = 0,009	
HI	2,1 ± 0,4	2,2 ± 0,4	5 ± 4,4	p = 0,502	
F	2,2 ± 1,2	2,9 ± 1,3	32 ± 11,3		
HI vs. HI+F	p = 0,207 (basal)				p₁ = 0,002 p₁₂ = 0,014

4 Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen machen deutlich, dass das intramyozelluläre Lipid-Kompartiment sehr schnell reguliert und aufgebaut wird. Dabei spielen die Konzentrationen der zirkulierenden Substrate (Insulin und FFS) eine bedeutende Rolle.

4.1 Fettinfusion bei Hyperinsulinämie verschlechtert die Insulinsensitivität (bekannt)

Während die Glukose- Infusions- Rate (GIR) in Studie 2 (NaCl statt Intralipid®) bis zum Erreichen eines Steady- State kontinuierlich zunahm, induzierte eine sechsstündige Erhöhung der FFS eine signifikante Reduktion der Glukose- Infusions- Rate im Glukose- Clamp bei zuvor insulinsensiblen Probanden. Da der größte Teil (>80%) der infundierten Glukosemenge unter hyperinsulinämischen Bedingungen vom Skelettmuskel aufgenommen wird (73), kann die GIR als indirektes Maß für die Insulinsensitivität der Muskulatur herangezogen werden. Die Abnahme der insulin-stimulierten Glukoseaufnahme in den Skelettmuskel wird dabei eher noch unterschätzt, da eine Fettinfusion auch in der Leber Insulinresistenz verursacht (74). Man muss daher davon ausgehen, dass die hepatische Glukoseproduktion trotz hoher Insulinspiegel nicht mehr vollständig supprimiert wird (74-77). Zur infundierten Glukosemenge addiert sich demnach die endogen produzierte Glukosemenge.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Arbeiten von Boden und Roden, die ebenfalls eine fettinduzierte Reduktion der GIR bei gesunden Probanden beobachten konnten (41-45) In der Literatur wird neben Substrat-Kompetition eine gestörte Insulin- Signal- Transduktion als Grund für die Verschlechterung der Insulinsensitivität angesehen (41-45, 49-56). Dabei fand man eine (durch erhöhte FFS induzierte) Aktivierung der Proteinkinase C (siehe Einleitung Abbildung 3). Dies führt zu einer Phosphorylierung und Inhibition der Tyrosin- Kinase des Insulin-Rezeptors und nachfolgend zu einer verminderten Aktivität der IRS-abhängigen PI-3-Kinase (49,50,57). Die PI-3-Kinase ist ein Schlüsselenzym für die

Translokation des Glukosetransporters Glut-4 in die Muskelzellmembran(siehe Einleitung).

4.2 Der intramyozelluläre Fettgehalt wird experimentell akut erhöht

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination aus erhöhten FFS im Serum und Hyperinsulinämie innerhalb kurzer Zeit einen signifikanten Anstieg des intramyozellulären Lipidgehalts bewirkt. Dies gilt sowohl für den roten M. soleus als auch und besonders für den gemischten M. tibialis anterior. Demnach wird die Lipidsynthese in der Muskelzelle sehr rasch stimuliert. Frühere Arbeiten von Boden und Roden mit vergleichbarem Studiendesign beschränkten sich darauf, neben der Glukoseaufnahme und Glukoseutilisation, die Auswirkungen einer Koinfusion von Fett und Insulin auf die muskuläre Fettsäure- Oxidation zu messen, ein Aufbau muskulärer Lipide aus diesen Fettsäuren wurde dabei bisher noch nicht beachtet (40-45).

In Studie 2 (HI) konnte bei alleiniger Hyperinsulinämie kein Effekt auf das intramyozelluläre Fett beobachtet werden. Durch die hohen Insulinspiegel war die Lipolyse nahezu vollständig supprimiert und infolge dessen waren die FFS im Serum bis an die Nachweisgrenze abgesunken. Obwohl Insulin die Enzyme für die Triglycerid- Synthese aktiviert (67), ließ sich ohne gleichzeitig hohe Spiegel der FFS keine Zunahme des intramyozellulären Fetts nachweisen. Koopmans et al. konnten dagegen im Tiermodell zeigen, dass eine länger andauernde Hyperinsulinämie (bis 12 h) trotz weitgehender Suppression der Lipolyse (FFS im Serum) zu einer Erhöhung der Lipogenese führt (78). Ein Vergleich dieser Arbeit ist aber nicht so ohne weiteres möglich, weil Tiermodelle nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind, und zudem die Hyperinsulinämie über einen längeren Zeitraum bestand. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine länger dauernde Hyperinsulinämie auch beim Menschen zu einem IMCL- Anstieg führt (z.B. über de novo Synthese von Triglyceriden aus Kohlenhydraten).

In Studie 3 sollten die Effekte erhöhter FFS im Serum ohne gleichzeitig bestehende Hyperinsulinämie untersucht werden. Bei den untersuchten Probanden wurde eine Zunahme des intramyozellulären Fetts beobachtet, die allerdings weit hinter dem in

Studie 1 (HI+F) beobachteten IMCL- Anstieg zurückblieb. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein isolierter Effekt der FFS so nicht zu bestimmen ist, da die erhöhten FFS sowohl die Insulin- Clearance senken (79,80) als auch zu einer Stimulation der Insulinsekretion führen (81-83) und sich die Insulinspiegel deshalb im Laufe der Untersuchung in etwa verdoppelten. Die im Vergleich zu Studie 1 zwar nur moderat erhöhten Insulinspiegel könnten zu einem Teil zum IMCL- Anstieg beigetragen haben. Insgesamt war die Fallzahl zu klein, um zuverlässige Aussagen und statistische Signifikanz- Berechnungen zu machen.

4.3 Bedeutung einer vermehrten muskulären Lipidakkumulation für die Pathogenese der Insulinresistenz

Es ist bekannt, dass der intramyozelluläre Lipidgehalt negativ mit der Insulinsensitivität der Glukoseaufnahme, wie sie mit der Glukose- Clamp- Technik quantifiziert wird, korreliert. Während die vorliegende Arbeit untersuchte, ob die IMCL- Pools akut ansteigen können, gibt es mittlerweile klare Daten, die die Möglichkeit einer akuten Reduktion dieser Lipide belegen. Mehrere Arbeiten konnten eine signifikante Reduktion der intramyozellulären Lipide nach einer Ausdauerbelastung beobachten (84,85). Seit Jahren bekannt ist, dass v.a. sportliches Ausdauertraining bei submaximaler Belastung ($VO_2\text{max} < 70\%$) die muskuläre Kapazität der Lipidoxidation steigert (86-89). Gerade der intramyozelluläre Lipid-Pool stellt einen Energiespeicher dar, auf den die Muskelzelle schnell zurückgreifen kann.

Mikrodialyse- Studien zeigen, dass die intramuskulären Lipide streng hormonell reguliert sind und geringste Insulin- Konzentrationen die Lipolyse reduzieren (90-92). Diese insulinvermittelte Anitlipolyse scheint bei nicht diabetischen Personen mit Insulinresistenz gestört zu sein (90,91). In der Muskelzelle gibt es eine Autoregulation, mit Hilfe derer die Zelle den Lipidumsatz lokal reguliert und dem Bedarf anpasst (93-95). Dabei spielt Malonyl- CoA eine wichtige Rolle. Malonyl- CoA ist ein allosterischer Inhibitor der Carnityl- Palmitoyltransferase I (CPT I), dem Enzym, das den Transfer der FFS in die Mitochondrien kontrolliert (96), wo sie oxidiert werden. Durch körperliche Aktivität wird der muskuläre Malonyl- CoA

Gehalt reduziert, was die Hemmung der CPT I aufhebt und damit die muskuläre Lipidoxidation stimuliert (95).

Somit ist gut vorstellbar, dass einer gestörten Regulation des Lipidumsatzes eine zentrale Bedeutung für die Entstehung der Insulinresistenz zukommt. Ein vermehrter intramyozellulärer Lipidgehalt führt insbesondere bei einer Dysregulation der insulinvermittelten Antilipolyse zu einem vermehrten Anfall an FFS. Liegen zusätzlich noch hohe Konzentrationen von Malonyl- CoA vor, wie etwa bei mangelnder körperlicher Belastung, so könnte das (im Verhältnis zum Bedarf) zu hohe Angebot an Freien Fettsäuren über Substrat-Kompetition oder über eine direkte Störung der Insulin- Signal- Transduktion die insulinstimulierte Glukoseaufnahme vermindern (49,50,52,53,55,57, Abbildung 7). Auch die beim Abbau von Triglyceriden ebenfalls entstehenden Di- Acyl- Glycerole (DAG; siehe Einleitung Abbildung 3) können über eine Aktivierung der Proteinkinase C die Insulin- Signal- Transduktion stören (50,57).

Die unphysiologisch hohen Insulin- und FFS- Konzentrationen, die im sechsstündige Experiment in Studie 1 erzielt wurden, stellen sicherlich Extrembedingungen dar, dennoch kann die Untersuchung modellhaft die Folgen einer fettreichen Ernährung skizzieren. Postprandial finden sich ebenfalls erhöhte Insulin- und FFS- Spiegel, also Bedingungen, die die Lipideinlagerung fördern. Die mit der Ernährung zugeführten Fettsäuren werden in den ersten 24 h nach dem Essen zu 40 % vom Skelettmuskel aufgenommen (97). Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine dreitägige, fettreiche Diät zu einem signifikanten IMCL- Anstieg und zu einer signifikanten Reduktion der Insulinsensitivität der Glukoseaufnahme bei gesunden, insulinsensiblen Probanden führt (98). Die o.g. Zusammenhänge legen nahe, dass die Lipide intramyozellulär vor allen Dingen dann akkumulieren, wenn sie aufgrund mangelnder körperlicher Aktivität nicht (regelmäßig) abgebaut oder/und über eine fettreiche Ernährung vermehrt zugeführt werden. Dobbins et al. konnten zeigen, dass eine medikamentöse Hemmung der CPT-I auch bei normaler Kost zu einer Erhöhung des IMCLs führt, ähnlich wie eine fettreiche Ernährung

(99). Eine Hemmung der CPT I durch Malonyl- CoA findet man, wie oben bereits dargelegt, auch bei mangelnder körperlicher Aktivität.

Epidemiologische Daten belegen die nachteiligen Auswirkungen einer falschen Ernährungsweise und mangelnder körperlicher Betätigung auf die Insulinsensitivität. So ist eine vermehrte Fettaufnahme ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes (20,22-24) ebenso wie eine verminderte Ballaststoffaufnahme (19,20) und eine reduzierte körperliche Aktivität (26,28). Umgekehrt sind verminderte Fettaufnahme, erhöhter Anteil faserreicher Nährstoffe und vermehrte körperliche Aktivität mit einer verbesserten Insulinsensitivität und einem verminderten Risiko für Typ 2 Diabetes assoziiert (19-21,100,101). Eine Gewichtsreduktion geht mit einer Reduktion des intramuskulären Lipidgehalts (102) und einer Verbesserung der Insulinsensitivität einher (28,31). Einem Ausdauertraining und einer ballaststoffreichen, fettreduzierten Ernährung kommt daher eine zentrale Bedeutung im Hinblick auf die Prävention und Therapie des Typ 2 Diabetes zu.

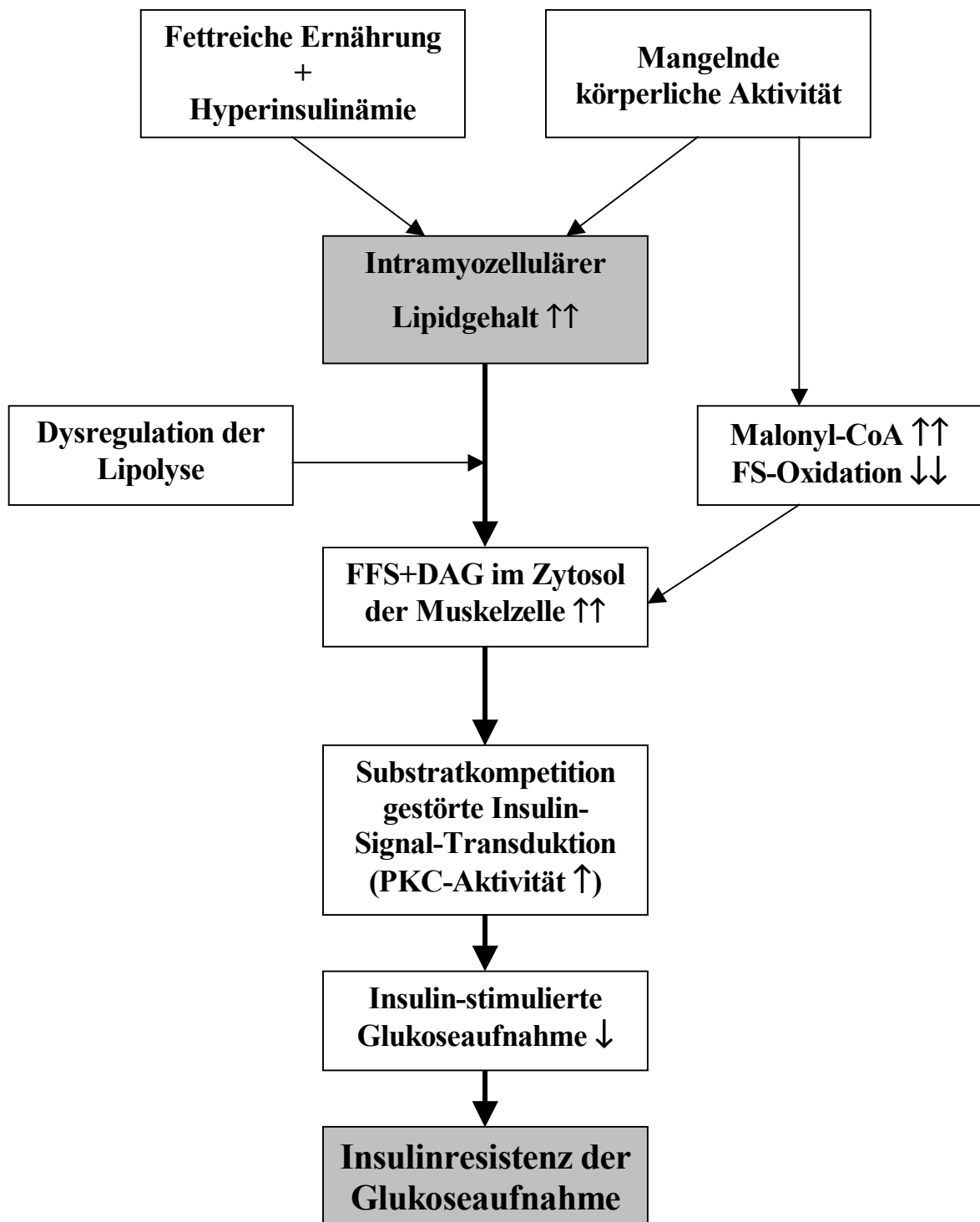


Abbildung 7: Verschiedene Faktoren können zu einem Anstieg des intramyozellulären Lipidgehaltes führen. Eine Dysregulation der Lipolyse dieser Lipide hat einen Anstieg der FFS im Zytosol der Muskelzellen zur Folge mit konsekutiven negativen Auswirkungen auf die Insulinsensitivität (vgl. auch Text).

4.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass der IMCL- Pool einen schnellen Umsatz aufweist. Mit einer Koinfusion von Intralipid + Heparin und Insulin kann rasch eine Aktivierung der Synthese intramyozellulärer Lipide erzielt werden. Hyperinsulinämie allein hat keinen Effekt auf den intramyozellulären Lipidgehalt. Weiterhin lässt sich belegen, dass eine Lipidinfusion bei zuvor insulinsensiblen Probanden eine Reduktion der insulinstimulierten Glukoseaufnahme zur Folge hat.

Insgesamt unterstreichen die Daten erneut den engen Zusammenhang zwischen dem Glukose- und dem Fettstoffwechsel. Insbesondere kommt einer erhöhten (nahrungsbedingten) Lipidbelastung und einer mangelnden körperlichen Aktivität große pathogenetische Bedeutung zu. Langfristig können diese beiden Faktoren zu einer Insulinresistenz und zu einer intramyozellulären Lipidakkumulation führen, wie dies in den vorliegenden Untersuchungen in ähnlicher Weise modellhaft gezeigt werden konnte. Dies zu vermeiden muss Mittelpunkt und Ziel einer frühzeitigen und präventiven therapeutischen Intervention sein.

5 Zusammenfassung

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist durch eine gestörte Insulinsekretion und durch eine Insulinresistenz der peripheren Zielzelle charakterisiert. Die Insulinresistenz betrifft sowohl die Leber- und Fettzellen als auch die Muskelzellen. Der Fettstoffwechsel ist in den vergangenen Jahren immer mehr in den Mittelpunkt des pathogenetischen Verständnisses des Typ 2 Diabetes mellitus gerückt. Insulinresistenz der Glukoseaufnahme ist zum einen häufig assoziiert mit Übergewicht und erhöhten Nüchtern- Serumspiegeln der Freien Fettsäuren, zum anderen ist es möglich, experimentell durch eine ausreichend lange durchgeführte Infusion einer Lipidemulsion (> 3-4 h) bei zuvor insulinsensiblen Probanden eine Insulinresistenz zu induzieren. Weiterhin wurde vor kurzem ein neues im Zytosol der Muskelzelle gelegenes Fettkompartiment (IMCL) entdeckt, dessen Lipidgehalt auch bei schlanken Personen negativ mit der Insulinsensitivität korreliert.

Ziel: Um zu sehen, ob und wie dieser IMCL- Pool akut aufgebaut wird, sollten die Effekte einer sechsständigen Koinfusion von Intralipid + Heparin und Insulin auf den intramyozellulären Lipidgehalt bei gesunden Probanden überprüft werden. Parallel dazu wurden Veränderungen der Insulinsensitivität mittels hyperinsulinämisch- euglykämische- Glukose- Clamp- Technik gemessen. In Kontrollstudien sollte untersucht werden, inwieweit Hyperinsulinämie allein, bzw. eine Lipidinfusion allein den intramyozellulären Lipidgehalt beeinflussen.

Methodik: Der IMCL- Gehalt wurde mit Hilfe der Magnet- Resonanz- Spektroskopie im M. soleus und im M. tibialis ant. quantifiziert. Die hyperinsulinämisch- euglykämische- Glukose- Clamp- Technik diente der Bestimmung der Insulin-sensitivität. Dabei wurde die Glukose- Infusions- Rate als Maß für die Insulinsensitivität der Glukoseaufnahme benutzt.

Ergebnisse: Eine sechsständige Koinfusion von Intralipid + Heparin und Insulin führte zu einem signifikanten Anstieg des intramyozellulären Lipidgehalts. Parallel dazu nahm die Insulinsensitivität signifikant ab. Dagegen beeinflusste eine Hyperinsulinämie ohne gleichzeitig erhöhte zirkulierende Freie Fettsäuren den IMCL- Gehalt nicht. Eine alleinige Lipidinfusion induzierte einen diskreten Anstieg des intramyozellulären Lipidgehalts.

Diskussion: Die vorliegenden Daten zeigen auf, dass es experimentell durch eine Koinfusion von Intralipid + Heparin und Insulin möglich ist, innerhalb kurzer Zeit die Menge an intrazellulärer Lipide zu erhöhen. Dies ist assoziiert mit einer Abnahme der Insulinsensitivität (GIR). Es ist daher gut vorstellbar, dass die Erhöhung der IMCL- Menge und eine Dysregulation dieser im Zytosol der Muskelzelle gelegenen Lipide unmittelbar zur Pathogenese der Insulinresistenz der Glukoseaufnahme beitragen könnten.

6 Literaturverzeichnis

1. Harris MI. : Impaired glucose tolerance in the US population. *Diabetes Care* 12:464-474, 1989
2. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd Holt DD. : Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 21:518-524, 1998
3. National Diabetes Data Group. *Diabetes in America*. Bethesda, MD.: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 1995. (NIH publication no. 95-1468.)
4. Hu FB, Stampfer MJ, Solomon CG, Liu S, Willett WC, Speizer FE, Nathan DM, Manson JE. : The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women. *Arch Intern Med* 161: 1717-1723, 2001
5. Lotufo PA, Gaziano JM, Chae CU, Ajani UA, Moreno-John G, Buring JE, Manson JE. : Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians. *Arch Intern Med* 161(2):242-247, 2001
6. DeFronzo RA: Lilly Lecture. The triumvirate: β -cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37:667-687, 1988
7. DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. : Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15:318-368, 1992
8. Reaven GM: Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* 75:473-486, 1995
9. Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR. : Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340:925-929, 1992
10. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. :Slow removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern Med* 113:909-915, 1990
11. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. : Glucose Clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* 237(3):E214-E223, 1979
12. Eriksson J, Fanssila Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L.: Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 321:337-343, 1989
13. Perseghin G, Ghosh S, Gerow K, Shulman GI. : Metabolic defects in lean nondiabetic offspring of NIDDM parents. *Diabetes* 46:1001-1009, 1997

14. Volk A, Renn W, Overkamp D, Mehnert B, Märker E, Jacob S, Balletshofer B, Häring HU, Rett K. : Insulin action and secretion in healthy, glucose tolerant first degree relatives of patients with type 2 diabetes mellitus. Influence of body weight. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107:140-147, 1999
15. Dahl D, Bachmann O, Nielsen M, Becker R, Renn W, Frauer M, Matthaei S, Rett K, Häring HU, Jacob S. : Prevalence of disorder of glucose tolerance in Patients with Hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 147 Suppl.2: 6, 1999
16. DeFronzo RA and Ferrannini E. : Insulin resistance. A multifceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194, 1991
17. Ferrannini E, Natali A, Capaldo B, Lehtoovirta M, Jacob S, Yki-Jarvinen H. : Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Hypertension* 30:1144-1149, 1997
18. Haffner SM, Stern MP, Mitchell BD, Hazuda HP, Patterson JK. : Incidence of type II diabetes in Mexican Americans predicted by fasting insulin and glucose levels, obesity, and body-fat distribution. *Diabetes* 39:283-288, 1990
19. Feskens EJ, Virtanen SM, Rasanen L, Tuomilehto J, Stengard J, Pekkanen J, Nissinen A, Kromhout D. : Dietary factors detemining diabetes and impaired glucose tolerance, A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care* 18:1104-1112, 1995
20. Lovejoy J and DiGirolamo M. : Habitual dietary intake and insulin sensitivity in lean and obese adults. *AM. J. Clin. Nutr.* 55:1174-1179, 1992
21. Marshall JA, Bessesen DH, Hammman. : High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia* 40:430-438, 1997
22. Mayer Davis EJ, Monaco JH, Hoen HM, Carmichael S, Vitolins MZ, Rewers MJ, Haffner SM, Ayad MF, Bergman RN, Karter AJ. : Dietary fat and insulin sensitivity in a triethnic population: the role of obesity. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Am. J. Clin. Nutr.* 65:79-87, 1997
23. Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. : Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40:280-289, 1991
24. Storlien LH, Baur LA, Kriketos AD, Pan DA, Cooney GJ, Jenkins AB, Calvert GD, Campbell LV. : Dietary fats and insulin action. *Diabetologia* 39: 621-631, 1996
25. Goodpaster BH Kelley DE, Wing RR, Meier A, Thaete FL. : Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 48: 839-847, 1999

26. Hellmrich SP, Ragland DR, Paffenbarger RS, Jr. : Prevention of non-insulin-dependent diabetes mellitus with physical activity. *Med. Sci. Sports Exerc.* 26:824-830, 1994
27. Borhgouts LB, Keizer HA. : Exercise and insulin sensitivity: a review. *Int. J. Sports Med* 21:1-12, 2000
28. Kelley De, Goodpaster BH, Wing RR, Simoneau JA. : Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am. J. Physiol.* 277:E1130-E1141, 1999
29. Manson JE, Nathan DM, Krolewski AS, Stampger MJ, Willett WC, Hennekens CH. : A prospective study of exercise and incidence of diabetes among US male physicians. *JAMA* 268:63-67, 1992
30. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, Roden M, Cline GW, Gerow K, Rothman DL, Shulman GI. : Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen syntheses after exercise training in insulin-resistant subjects. *N. Engl. J. Med.* 335:1357-1362, 1996
31. Purnell JQ, Brunzell JD. : The central role of dietary fat, not carbohydrate, in the insulin resistance syndrome. *Curr. Opin. Lipidol.* 8:17-22, 1997
32. Ryan AS. : Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med* 30(5):327-346, 2000
33. McGarry JD. : What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* 258:766-770, 1992
34. Reaven GM, Hollenbeck C, Jeng CY, Wu MS, Chen YD. : Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37:1020-1024, 1988
35. Baldeweg SE, Golay A, Natali A, Balkau B, Del Prato S, Coppack. : Insulin resistance, lipid and fatty acid concentrations in 867 healthy Europeans. The European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) *Eur. J. Clin. Invest.* 30:45-52, 2000
36. Charles MA, Eschwege E, Thibault N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin GE, Girard J, Balkau B. : The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects : results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 40:1101-1106, 1997
37. Byrne CD, Wareham NJ, Day NE, McLeish R, Williams DR, Hales CN. : Decreased non-esterified fatty acid suppression and features of the insulin resistance syndrome occur in a sub-group of individuals with normal glucose tolerance. *Diabetologia* 38:1358-1366, 1995
38. Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Reaven GM. : Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 64:17-21, 1987

39. Groop LC, Widen E, Ferrannini E. : Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: errors of metabolism or of methods? *Diabetologia* 36:1326-1331, 1993
40. Kelley DE, Mokan M, Simoneau JA, Mandarino LJ. : Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J.Clin. Invest.* 92:91-98, 1993
41. Boden G, Jadhav F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E, Smith C. : Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J. Clin. Invest.* 88:960-966, 1991
42. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. : Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J. Clin. Invest.* 93:2438-2446, 1994
43. Boden G, Chen X. : Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 96:1261-1268, 1995
44. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. : Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 97:2859-2865, 1996
45. Roden M, Krssak M, Singl H, Gruber S, Hofer A, Fornsinn C, Moser E, Waldhausl W. : Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes* 48:358-364, 1999
46. Bevilacqua S, Buzzigoli R, Bonadonna R, Brandi LS, Oleggini M, Boni C, Geloni M, Ferrannini E. : Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. *Diabetes* 39:383-389, 1990
47. Yki-Jarvinen H, Puhakainen I, Saloranta C, Groop L, Taskinen M-R. : Demonstration of a novel feedback mechanism between FFA oxidation from intracellular and intravascular sources. *Am J Physiol* 260:E680-E689, 1991
48. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. : The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i:785-789, 1963
49. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Sezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, Shulman GI. : Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* 103:253-259, 1999
50. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. : Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48:1270-1274, 1999

51. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. : Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 341:240-246, 1999
52. Häring HU, Mehnert H. : Pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: candidates for a signal transmitter defect causing insulin resistance of the skeletal muscle. *Diabetologia* 36:176-182, 1993
53. Häring HU: Pathogenesis of type II diabetes: are there common causes for insulin resistance and secretion failure? *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107:S17-S23, 1999
54. Kahn CR: Diabetes . Causes of insulin resistance. *Nature* 373:384-385, 1995
55. Kellerer M, Lammers R, Häring HU. : Insulin signal transduction: Possible mechanisms of insulin resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 107:97-106, 1999
56. Petersen KF, Hendler R, Price T, Perseghin G, Rothman DL, Held N, Amatruda JM, Shulman GI. : ¹³C/³¹P NMR studies on the mechanism of insulin resistance in obesity. *Diabetes* 47:381-386, 1998
57. Kelley DE. : Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance. *Diabetes* 49:677-683, 2000
58. Han DH, Hansen PA, Host HH, Holloszy JO.: Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes* 46:1761-1767, 1997
59. Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. : Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 46:1768-1774, 1997
60. Falholt K, Hjelms E, Jensen I, Voelund A, Heding LG, Mortensen H, Falholt W. : Intracellular metabolism in biopsies from the aorta in patients undergoing coronary bypass surgery. *Diabet. Metab.* 13:312-317, 1987
61. Boesch C, Slotboom J, Hoppeler H, Kreis R. : In vivo determination of intra-myocellular lipids in human muscle by means of localized ¹H-MR-spectroscopy. *Magn. Reson. Med.* 37:484-493, 1997
62. Brechtel K, Machann J, Jacob S, Stempfer A, Schick F, Häring HU, Claussen CD. : In vivo ¹H-MR-Spektroskopie des intra- und extra-myozellulären Lipidgehalts in Abhängigkeit von der Insulinwirkung bei direkten Nachkommen von Typ-II-Diabetikern. *Rof. Fortschr. Geb Röntgenstr. Neuen Bildgeb. Verfahr.* 171:113-120, 1999
63. Schick F, Eismann B, Jung WI, Bongers H, Bunse M, Lutz O. : Comparison of localized proton NMR signals of skeletal muscle and fat tissue in vivo: two lipid compartments in muscle tissue. *Magn. Reson. Med.* 29:158-167, 1993

64. Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD, Häring HU. : Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 48:1113-1119, 1999
65. Krssak M, Petersen KF, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, Shulman GI, Roden M. : Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ^1H -MR-spectroscopy study. *Diabetologia* 42:113-116, 1999
66. Perseghin G, Scifo P, DeCobelli F, Pagliato E, Battezzati A, Arcelloni C, Vanzulli A, Testolin G, Pozza G, Del Meschio A, Luzi L. : Intramyocellular Triglyceride Content is a determinant of in vivo insulin resistance in humans: a ^1H - ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy assessment in offspring of type 2 diabetic parents. *Diabetes* 48:1600-06, 1999
67. Falholt K, Cutfield R, Alejandro R, Heding L, Mintz D. : The effects of hyperinsulinemia on arterial wall and peripheral muscle metabolism in dogs. *Metabolism* 34:1146-1149, 1985
68. World Health Organization Expert Committee on Diabetes mellitus. Second report. WHO Tech Rep Ser 646:1-80, 1980
69. Alberti KGMM, Zimmer PZ, for the WHO Consultation Group. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med* 15:539-553, 1998
70. Turk D, Alzaid A, Dinneen S, Nair KS, Rizza R. : The effects of non-insulin-dependent diabetes mellitus on the kinetics of onset of insulin action in hepatic and extrahepatic tissues. *J. Clin. Invest.* 95:755-762
71. Brechtel K, Jacob S, Machann J, Hauer B, Nielsen M, Meissner HP, Matthaei S, Häring HU, Claussen CD, Schick F. : Acquired generalized lipotrophy (AGL): Highly selective MR lipid imaging and localized (^1H)-MRS. *J. Magn. Reson. Imaging* 12(2):306-310, 2000
72. Szczepaniak LS, Babcock EE, Schick F, Dobbins RL, Garg A, Burns DK, McGarry JD, Stein DT. : Measurement of intracellular triglyceride stores by ^1H spectroscopy: validation in vivo. *Am. J. Physiol.* 276:E977-E989, 1999
73. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. : The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes* 30:1000-1007, 1981
74. Saloranta C, Koivisto V, Widen E, Falholt K, DeFronzo RA, Härkönen M, Groop L. : Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. *Am. J. Physiol.* 264:E599-E605, 1993

75. Bevilacqua S, Bonadonna R, Buzzigoli G, Boni C, Ciociaro D, Maccari F, Giorico MA, Ferrannini E. : Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metab. Clin. Exp.* 36:502-506, 1987
76. Fanelli C, Calderone S, Epifano L, DeVincenzo A, Modarelli F, Pampanelli S, Perriello G, DeFeo P, Brunetti P, Gerich JE, Bolli GB. : Demonstration of a critical role for free fatty acids in mediating counterregulatory stimulation of gluconeogenesis and suppression of glucose utilization in humans. *J. Clin. Invest.* 92:1617-1622, 1993
77. Ferrannini E, Barrett E, Bevilacqua S, DeFronzo RA. : Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J. Clin. Invest.* 72:1737-1747, 1983
78. Koopmans SJ, Kushwaha RS, DeFronzo RA. : Chronic physiologic hyperinsulinemia impairs suppression of plasma free fatty acids and increases de novo lipogenesis but does not cause dyslipidemia in conscious normal rats. *Metabolism* 48:330-337, 1999
79. Mittelman SD, Van Citters GW, Kim SP, Davis DA, Dea MK, Hamilton-Wessler M, Bergman RN. : Longitudinal compensation for fat-induced insulin resistance includes reduced insulin clearance and enhanced beta-cell response. *Diabetes* 49: 2116-2125, 2000
80. Peiris AN, Mueller RA, Smith GA, Struve MF, Kissebah AH. : Splanchnic insulin metabolism in obesity: influence of body fat distribution. *J. Clin. Invest.* 78: 1648-57, 1986
81. Boden G, Chen X, Rosner J, Barton M. : Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 44:1239-1242, 1995
82. Roden M, Stingl H, Chandramouli V, Schumann WC, Hofer A, Landau BR, Nowotny P, Waldhäusl W, Shulman GI. : Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49:701-707, 2000
83. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD. : Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J. Clin. Invest.* 97 :2728-2735, 1996
84. Boesch C, Kreis R. : Observation of intramyocellular lipids by ¹H-magnetic resonance spectroscopy. *Ann. NY. Acad. Sci.* 904:25-31, 2000
85. Krssak M, Petersen KF, Bergeron R, Price T, Laurent D, Rothman DL, Roden M, Shulman GI. : Intramuscular glycogen and intramyocellular lipid utilization during prolonged exercise and recovery in man: a ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:748-754, 2000
86. Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH, Hagberg JM, Dalsky GP, Holloszy JO. : Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J. Appl. Physiol.* 60:562-567, 1986
87. Jeukendrup AE, Saris WH, Wagenmakers AJ. : Fat metabolism during exercise: a review. Part I: fatty acid mobilization and muscle metabolism. *Int. J. Sports Med.* 19:231-244, 1998

88. Jeukendrup AE, Saris WH, Wagenmakers AJ. : Fat metabolism during exercise: a review. Part II: regulation of metabolism and the effects of training. *Int. J. Sports Med.* 19:293-302, 1998
89. Martin WH. : Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 24:203-231, 1996
90. Jacob S, Hauer B, Becker R, Arztner S, Grauer P, Löblein K, Nielsen M, Renn W, Rett K, Wahl HG, Stumvoll M, Häring HU. : Lipolysis in skeletal muscle is rapidly regulated by low physiological doses of insulin. *Diabetologia* 42:1171-1174, 1999
91. Jacob S, Hauer B, Becker R, Nielsen M, Balletshofer B, Renn W, Lang R, Stumvoll M, Häring HU. : Insulin resistance (IR) of glucose uptake is associated with IR of antilipolysis in skeletal muscle. *Diabetologia* 43 Suppl. 1: A 24, 2000
92. Stumvoll M, Jacob S, Wahl HG, Hauer B, Loblein K, Grauer P, Becker R, Nielsen M, Renn W, Häring HU. : Suppression of systemic, intramuscular, and subcutaneous adipose tissue lipolysis by insulin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:3740-3745, 2000
93. Bavenholm PN, Pigon J, Saha AK, Ruderman NB, Efendie S. : Fatty acid oxidation and the regulation of malonyl- CoA in human muscle. *Diabetes* 49:1078-1083, 2000
94. Kiens B, Roemen THM, van der Vusse GJ. : Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans. *Am. J. Physiol.* 39:E352-E357, 1999
95. Ruderman nB, Saha AK, Vavvas D, Witters LA. : Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276:E1-E18, 1999
96. McGarry JD. : The mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase system: its broadening role in fuel homeostasis and new insights into its molecular features. *Biochem. Soc. Trans.* 23:321-324, 1995
97. Bessesen DH, Rupp CL, Eckel RH. : Trafficking of dietary fat in lean rats. *Obes. Res.* 3:191-203, 1995
98. Bachmann OP, Dahl D, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Häring HU, Jacob S. : Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* 50(11):2579-2584, 2001
99. Dobbins RL, Szczepaniak LS, Bentley B, Esser V, Myhill J, McGarry JD.: Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. *Diabetes* 50:123-130, 2001
100. Harris RB, Kor H. : Insulin insensitivity is rapidly reversed in rats by reducing dietary fat from 40 to 30 % of energy. *J. Nutr.* 122:1811-1822, 1992

101. Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG, Willet W: Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med.* 345:790-797, 2001
102. Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, Kelley DE. : Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 49:467-472, 2000

7 Anhang- Abbildungen

7.1 Studie 1 (HI+F) vs. Studie 2 (HI)

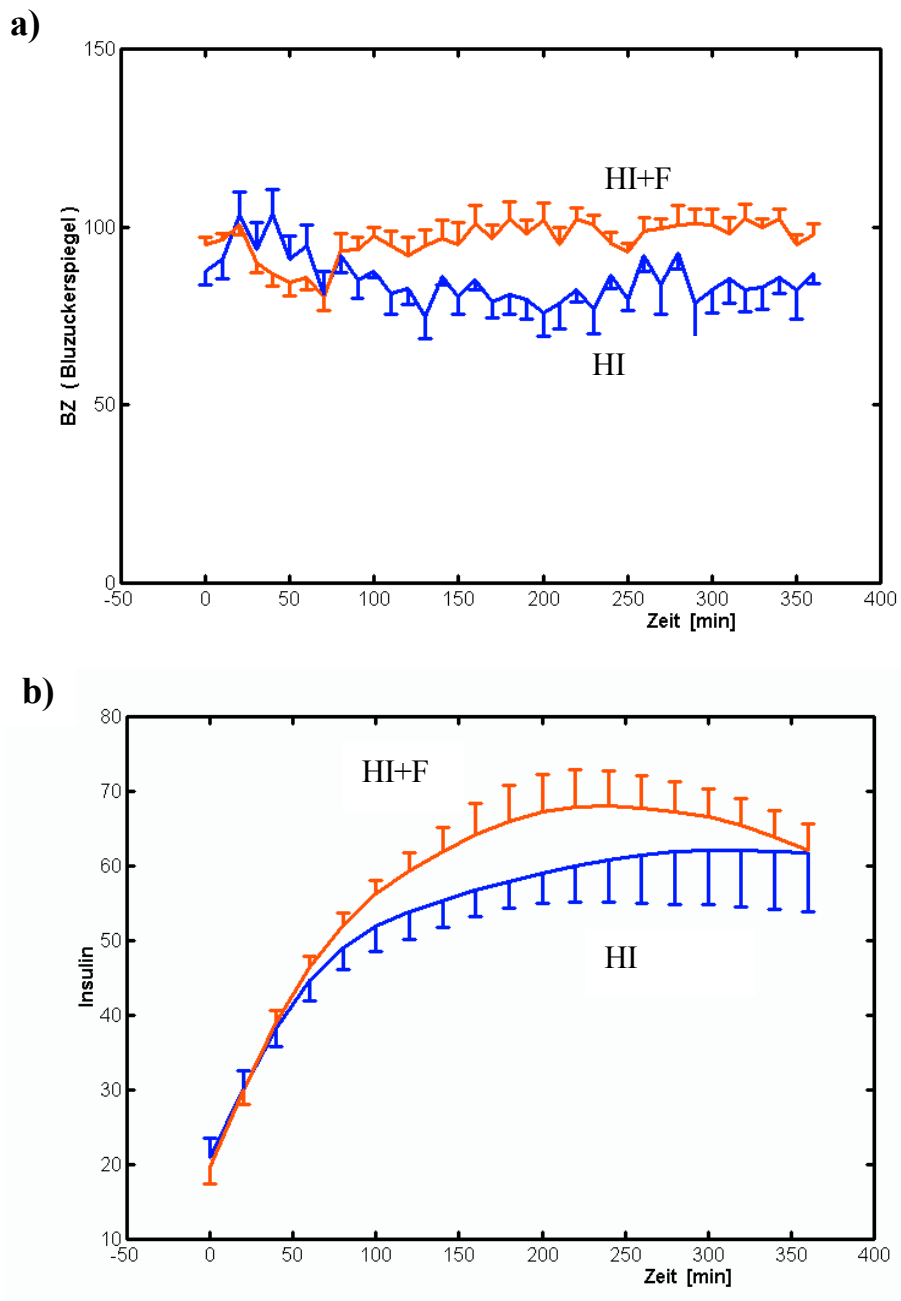
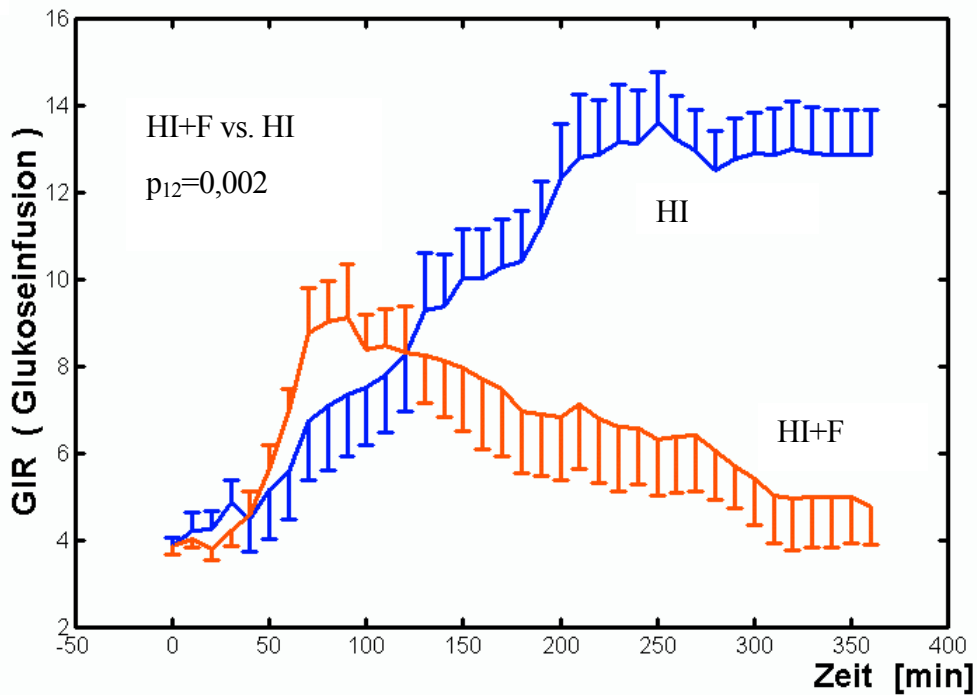


Abbildung 8: Serum- Konzentrationen von Glukose (a, in mg/dl) und Insulin (b, in $\mu\text{U/l}$) im Verlauf der Untersuchung. Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler. (Studie 1=HI+F, $n=6$; Studie 2=HI, $n=6$)

a)



b)

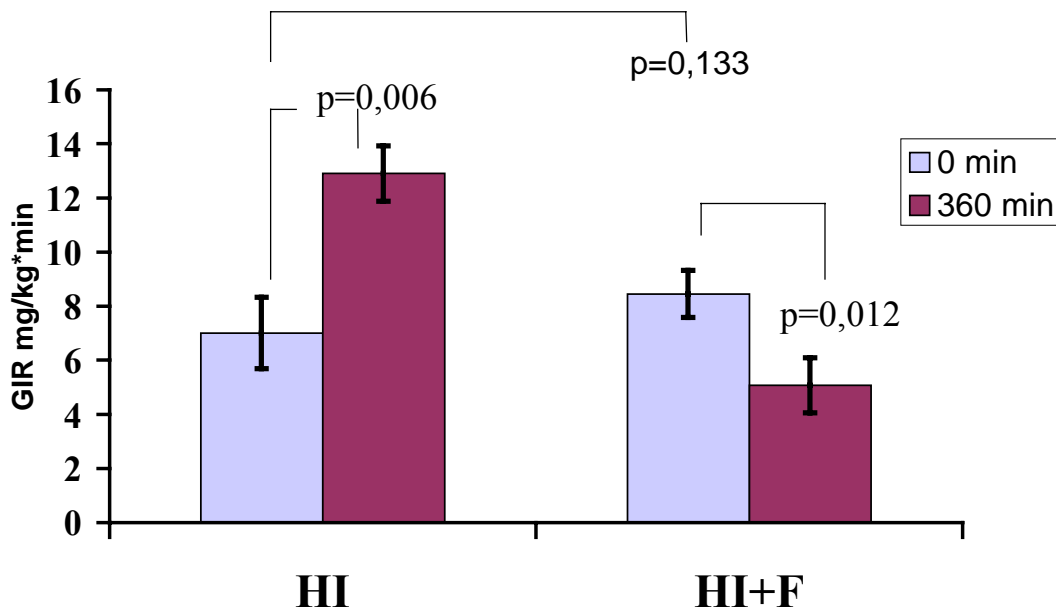
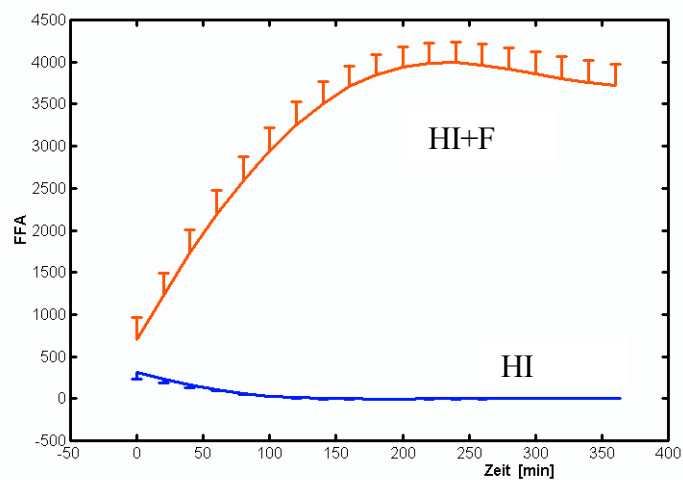
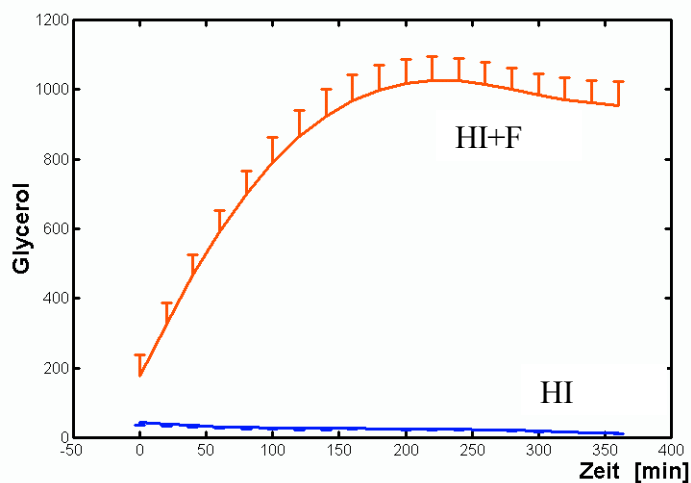


Abbildung 9: (a) zeigt die Glukose- Infusions- Rate (GIR) im zeitlichen Verlauf der Untersuchung für Studie 1 (HI+F; n=6) und Studie 2 (HI; n=6). In (b) ist die mittlere GIR während der zweiten und sechsten Stunde der Untersuchung dargestellt. Angaben sind Mittelwerte \pm Standardfehler in mg/kg*min.

a)



b)



c)

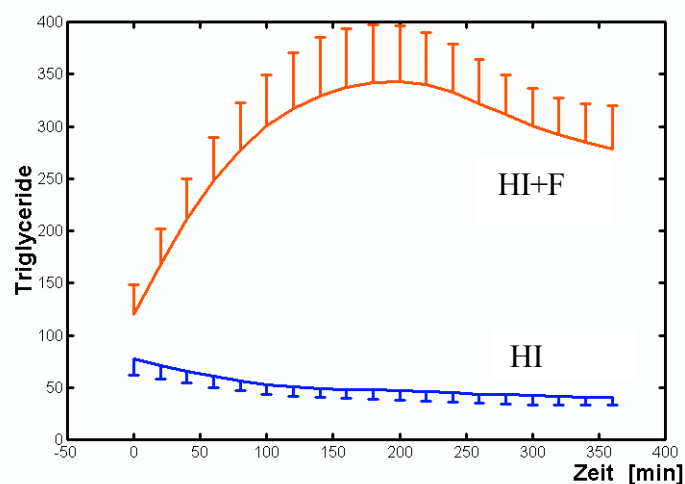
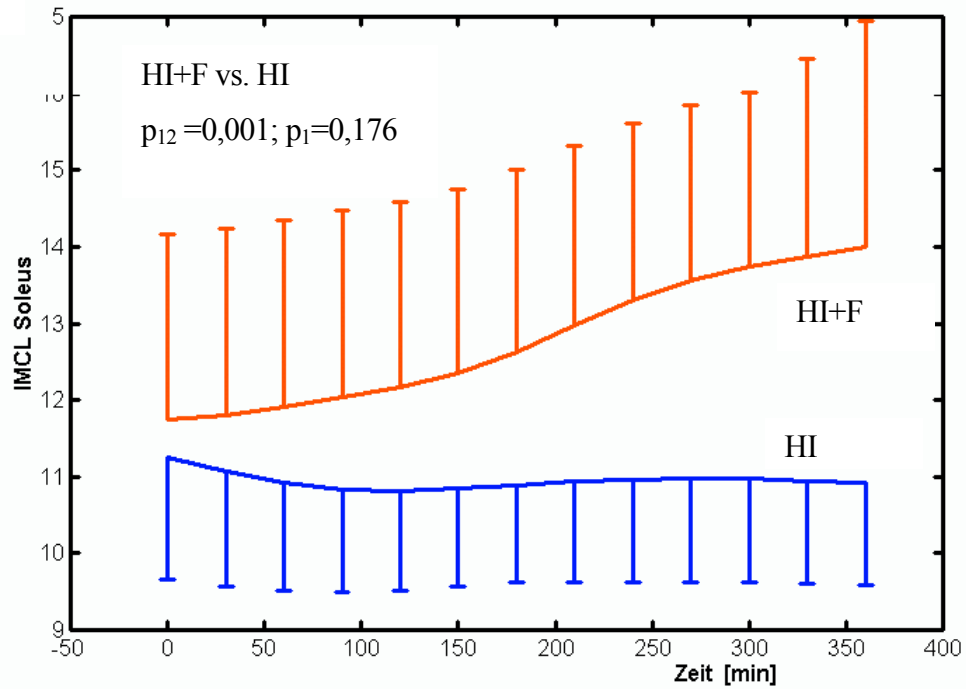


Abbildung 10: Dargestellt sind die Serum- Konzentrationen der Freien Fettsäuren (a, in $\mu\text{mol/l}$), von Glycerol (b, in $\mu\text{mol/l}$) und der Triglyceride (c, in mg/dl). Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler für Studie 1 (HI+F, n=6) und Studie 2 (HI, n=6).

a)



b)

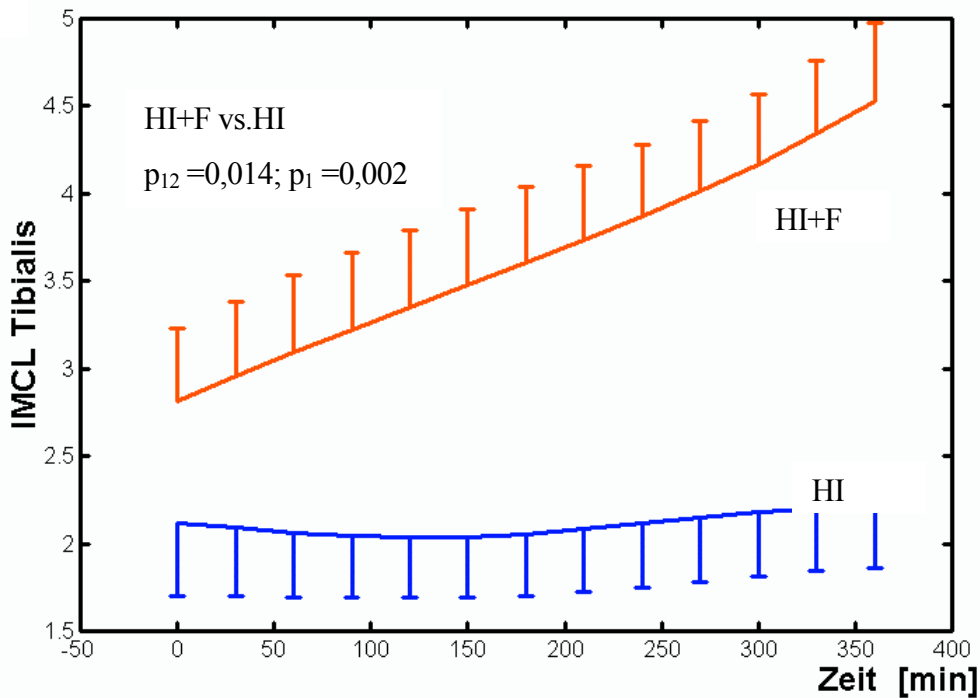


Abbildung 11: Vergleich des intramyozellulären Lipidgehalts des *M. soleus* (a) und des *M. tibialis anterior* (b) zwischen Studie 1 (HI+F; $n=6$) und Studie 2 (HI; $n=6$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler im zeitlichen Verlauf. Angaben in Arbitrary Units (AU).

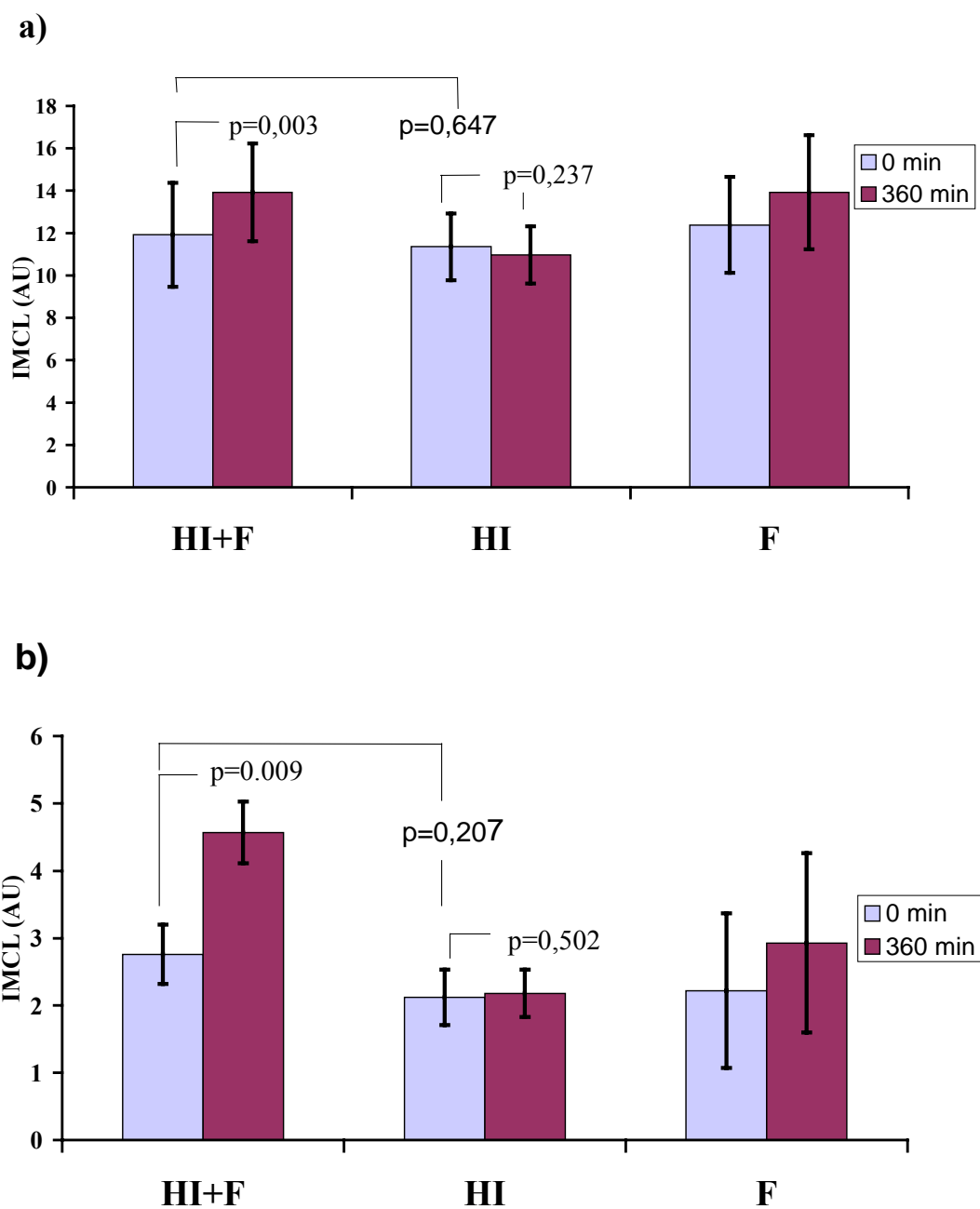


Abbildung 12: Intramyocellulärer Lipidgehalt vor und nach den Untersuchungen der Studien 1 (HI+F; n=6), 2 (HI; n=6) und 3 (F; n=3). Angaben in Arbitrary Units. *M.soleus* (a), *M.tibialis anterior* (b). Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

8 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Häring für die Möglichkeit in der Abteilung IV, Endokrinologie, der Medizinischen Klinik, diese Arbeit durchzuführen und für die freundliche Überlassung der dafür benötigten Räume und Geräte.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Jacob für die Überlassung und Betreuung dieser Arbeit, v.a. auch für seine enorme Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die sich längst nicht nur auf die Betreuung dieser Arbeit erstreckte. Besonders bedanken möchte ich mich in diesem Zusammenhang für die Vermittlung eines 5-monatigen Forschungsaufenthaltes in den USA. Des weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Dahl und bei Herrn Dr. med. Bachmann für ihre Betreuung und Hilfe während den Untersuchungen bedanken. Danken möchte ich auch Herrn Machann und Herrn Dr. med. Brechtel für die Durchführung der Spektroskopien.

Besonderen Dank gilt auch Herrn Dr. Renn für seine große Hilfe bei allen statistischen Fragen und Problemen.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihren Beistand während meines Studiums bedanken.

9 Lebenslauf

01.08.1974	geboren in Hechingen wohnhaft in 72411 Bodelshausen, Buchenstraße 13
1981 - 1985	Grundschule in Bodelshausen
1985 - 1994	Quenstedt- Gymnasium in Mössingen
19.06.94	Abitur- Abschluß (Erlangung der Hochschulreife)
10/94 – 05/96	Beginn des Studiums der Rechtswissenschaften an der Universität Tübingen - abgebrochen im 2.Semester
07/95- 07/96	Ableistung des Zivildienstes im Altenpflegeheim „Haus an der Steinlach“ in Mössingen. Tätigkeitsfeld: Altenpflege
1996-2003	Studium der Medizin an der Eberhard- Karls- Universität Tübingen
08/1998	Physikum (Ärztliche Vorprüfung)
08/1999	1.Staatsexamen
08/2002	2.Staatsexamen
05/2003	3.Staatsexamen
03/01 - 07/01	Mitarbeit im Labor von Dr. Henriksen (PhD) am Physiologischen Institut der University of Arizona in Tucson/USA