

Aus der Klinik für Innere Medizin II - Gastroenterologie, Hepatologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

Ambulante Methode zur Charakterisierung des Glucosemetabolismus
unter Verwendung von getrocknetem Blut und stabiler, nicht radioak-
tiver Isotopenmarkierung:
Dried blood spots (DBS-GLUC)

Dissertation
Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2022

vorgelegt von: Rebecca Sahner
geboren am: 21.09.1993 in Saarlouis

1. Einleitung	3
1.1 Diabetes mellitus	3
1.2 Diabetes mellitus – Epidemiologie	7
1.3 Therapieaspekte	9
1.4 Verfahren zur Charakterisierung des Glucosemetabolismus	12
2. Hypothese/Zielsetzung	19
3. Material und Methodik	20
3.1 Charakterisierung der Kohorte	20
3.2 Ambulante Methodik: Ausstattung und klinische Durchführung	22
3.3 Chemische Analytik: Messen der Metaboliten im Blut durch Gaschromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung (GS-MS)	31
3.4 Erfassung und Auswertung der Patientendaten und Messergebnisse mittels REDCap®	34
3.5 Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	39
4.1 Diagnostik der Glucosetoleranz mittels Hauptkomponentenanalyse der mittels Point-of-Care-Testung gewonnen Flüsse der Glucose	39
4.2 Vergleich der gemessenen mittleren Glucosekonzentrationen	41
4.3 Unterschiede in der mittels GC-MS ermittelten mittleren Gluconeogeneserate, Laktatproduktion, Glucoseproduktion und Glucosekonzentration (siehe Material und Methodik, 3.3) der Probanden in Abhängigkeit der in REDCap® erfassten Merkmale	42
4.4 Klinische Unterschiede in den Kohorten	49
5. Diskussion	51
6. Zusammenfassung/Summary	59
7. Literaturverzeichnis	61
8. Abbildungsverzeichnis	66
9. Tabellenverzeichnis	68
10. Anhang	69
11. Danksagung	74
12. Lebenslauf	75

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Diabetes mellitus: Definition

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine Gruppe verschiedener Stoffwechselerkrankungen, deren gemeinsames Merkmal ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel ist, wobei ursächlich entweder eine Störung der Insulinsekretion oder der Insulinwirkung bzw. eine Kombination beider Mechanismen zugrunde liegt (Bundesministerium für Gesundheit, 2020; Müller-Wieland, Nauck, Petersmann et al., 2019).

Weit etabliert in der Einteilung der Erkrankungen ist die Klassifikation nach ihrer Ätiologie. Dabei können vier Gruppen gebildet werden:

- I. Typ-1-Diabetes: Für die chronische Hyperglykämie beim Typ-1-Diabetes verantwortlich ist eine Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas, die zum absoluten Insulinmangel führt. Die genauen Ursachen sind noch nicht bekannt, die Zerstörung der Beta-Zellen des Pankreas werden jedoch sowohl von genetischen, als auch von Umweltbedingungen beeinflusst. Häufiger erkranken junge Erwachsene an Diabetes mellitus Typ 1 (International Diabetes Federation, 2020). Des Weiteren wird auch der LADA (latent autoimmune diabetes in adults) dem Diabetes Typ 1 zugerechnet (Diabetesinformationsdienst München, 2018).
- II. Typ-2-Diabetes: Typ-2-Diabetes ist die häufigste Art von Diabetes und macht etwa 90% aller Diabetesfälle aus. Typ-2-Diabetes ist im Allgemeinen durch eine Insulinresistenz gekennzeichnet. Da Insulin nicht richtig wirken kann, steigt der Blutzuckerspiegel weiter an und setzt mehr Insulin frei. Die Hyperglykämie induziert eine gesteigerte Produktion von Insulin in der Bauchspeicheldrüse. Dies kann schließlich zur Erschöpfung der Insulin-Produktion führen, wodurch ein noch höherer Blutzuckerspiegel (Hyperglykämie) entsteht (International Diabetes Federation, 2020).
- III. Die dritte Gruppe wird unter dem Begriff „andere Diabetesformen“ zusammengefasst. Hierunter fallen als Ursache der Hyperglykämien beispielsweise genetische Defekte der Beta-Zellfunktion und der Insulinwirkung, Pankreaserkrankungen, Endokrinopathien, Infektionen und durch Medikamente hervorgerufene Veränderungen des Glucosehaushaltes (Feingold, 2019; Scherbaum, 2019; Zaharia, 2019)

IV. Die letzte Gruppe umfasst den Gestationsdiabetes. Er bezeichnet alle Diabetesformen, bei denen eine Glucoseverwertungsstörung erstmals während der Schwangerschaft auftrat bzw. diagnostiziert wurde (Zaharia, 2019).

1.1.2 Diagnosekriterien

Um die Diagnose Diabetes stellen zu können, bedarf es gemäß den aktuellen Leitlinien der „Deutschen Diabetes Gesellschaft“ (DDG) einem der folgenden Kriterien **symptomatischer** Patienten (Schleicher et al., 2021).

1. Gelegenheits-Plasmaglucosewert von $\geq 200\text{mg/dl}$ ($\geq 11,1\text{ mmol/l}$)
2. Nüchtern-Plasmaglucosewert von $\geq 126\text{mg/dl}$ ($\geq 7,0\text{ mmol/l}$)
3. oGTT-2-h-Wert im venösen Plasma $\geq 200\text{mg/dl}$ ($\geq 11,1\text{ mmol/l}$)
4. $\text{HbA}_{1c} \geq 6,5$ ($\geq 48\text{mmol/mol Hb}$)

Ein Prädiabetes liegt demnach bei Nüchtern-Plasmaglucosewerten zwischen 100 bis 125 mg/dl (5,5 bis 6,9mmol/l), einem oGTT-2-h-Wert zwischen 140 bis 199 mg/dl (7,8 bis 11mmol/l) oder einem HbA_{1c} zwischen 5,7 bis $< 6,5\%$ (39 bis $< 48\text{ mmol/mol}$) vor.

1.1.3 Pathophysiologie und Klinik

Das von der Bauchspeicheldrüse sezernierte Insulin bindet an Insulinrezeptoren, welche ubiquitär auf verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert werden. Insulinrezeptoren gehören zur Gruppe der Transmembranproteine vom Tyrosinkinase-Typ. Nach Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor kommt es durch Autophosphorylierung zur Konformationsänderung innerhalb des Rezeptors, wodurch verschiedene Signalwege (1PLC/IP₃-Weg, MAP-Kinase-Weg, PI₃K-Weg) aktiviert werden, die u.a. zur Glucoseaufnahme in die Zelle führen (Schatz & Pfeiffer, 2014). Die meisten Insulinrezeptoren befinden sich auf den Leberzellen und den Zellen der quergestreiften Muskulatur. Die mit der Nahrung aufgenommene Glucose dient dem Energiestoffwechsel. Dieser beinhaltet vor allem in der Muskulatur auch anaerobe Glykolyse, bei der Glucose im Muskel u.a. zu Laktat gespalten wird. Das Laktat wird selbst wieder in den Blutkreislauf sezerniert und erreicht über diesen die Leber. Dort wird aus den Laktatmolekülen erneut Glucose gebildet (= Gluconeogenese) und dem Körper wieder zur Verfügung gestellt (Cori-Zyklus). Dieser Kreislauf von Gluconeogenese in der Leber und Glykolyse im Skelettmuskel ist in Abbildung 1 dargestellt. Zudem findet Gluconeogenese nicht nur in der Leber, sondern auch in der Niere – jedoch zu einem geringeren Anteil – statt (Gerich, Meyer, Woerle, Stummvoll, 2001).

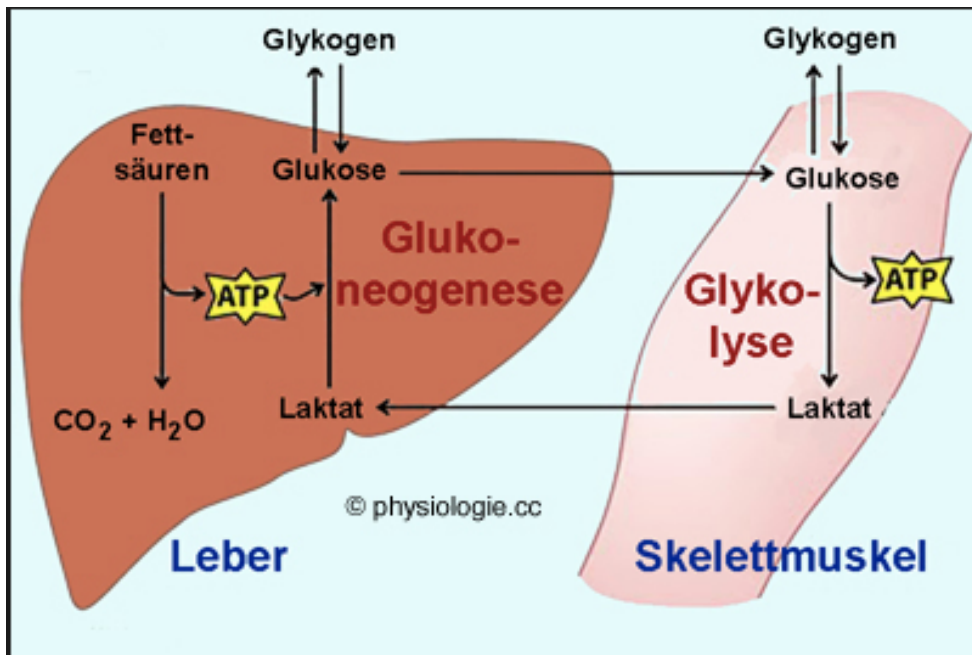


Abbildung 1: Cori-Zyklus: Kreislauf von Gluconeogenese in der Leber und Glykolyse im Skelettmuskel, Quelle: In Anlehnung an Hinghofer-Szalkay

Bei Diabetikern ist dieser Kreislauf jedoch gestört: Durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel abnehmende Sekretion von Insulin durch die Bauchspeicheldrüse oder verringertes Ansprechen der Muskelzellen auf Insulin, kann die mit der Nahrung zugeführte Glucose nicht mehr vollständig von den Zellen aufgenommen werden (= Insulinresistenz). Der chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel kann über eine chronischen Entzündungsreaktion von Intima und Media (Libby, 2002) zu arteriosklerotischen Plaques mit Verengungen (Stenosierungen) und Verschlüssen (Okklusionen) der Gefäße führen (Neufang-Sahr, Scherbaum, Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf, 2003). Diabetiker weisen ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung dieser sogenannten Angiopathien auf (Beck, 2015). Während es beim Typ-1-Diabetes vor allem zu einer Schädigung der kleinen Gefäße von Retina, Niere, oder Nerven und somit zu einer Ausbildung von Mikroangiopathien bzw. Neuroangiopathien kommt, sind bei Typ-2-Diabetikern oftmals auch die größeren Gefäße von Gehirn, Herz und Beinen geschädigt (Makroangiopathie) (Renz-Polster & Krautzig, 2013). Prinzipiell kann jedes Gefäß des Körpers betroffen sein. Tabelle 1 zeigt exemplarisch mikrovaskuläre (linke Spalte), sowie makrovaskuläre (rechte Spalte) Veränderungen, in Folge der chronischen Hyperglykämie.

Tabelle 1: Mögliche Folgen einer Diabetes-Erkrankung, Quelle: In Anlehnung an Liebi et al.

Mikrovaskulär	Makrovaskulär
Gehirn: Demenz, Wesensveränderung, Gedächtnisleistungsstörung	Schlaganfall: alle 12 Minuten ein Schlaganfall (44.000 pro Jahr)
Diabetische Netzhauterkrankung: alle 90 Minuten Erblindung (6.000/ Jahr)	Herz-Erkrankungen: alle 90 Minuten ein Herzinfarkt (27.000 pro Jahr)
Nierenerkrankung: alle 60 Minuten eine neue Dialyse-Pflicht (8000/Jahr)	Periphere Durchblutungsstörung: Starke Beschwerden beim Gehen (Schaufensterkrankheit)
Diabetische Nervenstörung: alle 19 Minuten eine Amputation (28000/Jahr)	

Zusätzlich kann es zu einer Störung weiterer Organsysteme kommen: Beispielsweise weisen bis zu 80 % aller Diabetiker Hautveränderungen auf. Zu diesen zählen nicht nur Pigmentstörungen wie die Acanthosis nigricans (= flächige Hyperpigmentierung und Hyperkeratose der Epidermis) (Abbildung 2) oder die Necrobiosis lipoidica (= granulomatöse Entzündung der Dermis mit Anreicherung von Lipiden) (Abbildung 3), sondern auch eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen (Erysipel, Erythrasma) oder mykotischen (Onychomykose, Tinea) Infektionen, sekundär entstanden durch Störungen der Durchblutung und eines Verlustes der Barrierefunktion der Haut (Diabetesinformationsdienst-München, 2017).



Abbildung 2: Acanthosis nigricans, Quelle: Internetseite Omics International



Abbildung 3: Necrobiosis lipoidica der Unterschenkel, Quelle: Peckruhn, M et al.

Oft werden die Folgen des Diabetes für die Zähne unterschätzt: So leiden Diabetiker häufiger an Parodontitis – einer dauerhaften Entzündung des Zahnhalteapparates –, Zahnfleischentzündungen oder Karies (Diabetesinformationsdienst-München, 2017).

1.2 Diabetes mellitus – Epidemiologie

1.2.1 Prävalenz und Inzidenz

Schon um 1500 vor Christus wurde Diabetes von den alten Ägyptern als seltene Erkrankung beschrieben (Polonsky, 2012). Noch Mitte des 20. Jahrhunderts lagen die Diabetesprävalenzen weltweit deutlich unter heutigen Vergleichswerten. Daten des ehemaligen DDR-Diabetes-Registers aus dem Jahre 1960 geben auf Basis ärztlicher Diagnosen Prävalenzen von deutlich unter einem Prozent an. In den folgenden 30 Jahren konnte allerdings schon ein starker Prävalenzanstieg – sowohl in der Bundesrepublik Deutschland als auch in der DDR – auf 4,1 % verzeichnet werden (Michaelis & Jutzi, 1991). Nach einer Zeit ohne wesentlichen Prävalenzanstieg (1990 bis 2005) (Meisinger, Heier, Doering, Thorand, Loewel, 2004; Thefeld, 1999; Heidemann, Kroll, Icks, Scheidt-Nave, Lampert, 2009) nahm die Anzahl an Diabetikern in Deutschland erneut stetig zu. Aktuelle Schätzungen gehen mittlerweile von Prävalenzen zwischen 7,2 % (aus Untersuchungssurveys des Robert Koch-Instituts) und 9,9 % (auf Basis von Daten gesetzlich Krankensversicherter) aus. In Abbildung 4 wird die bis 2030 steigende Zahl der an Diabetes mellitus Erkrankten (in der Altersgruppe der 55 bis 74-Jährigen) – geschätzt durch das Deutsche Diabetes-Zentrum – dargestellt.

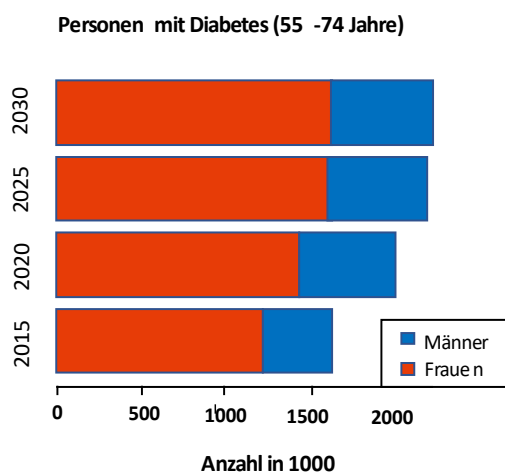


Abbildung 4: Personen mit Diabetes (55 – 74 Jahre): Nach Schätzungen des Deutschen Diabetes-Zentrums werden 2030 3,9 Millionen Personen in der Altersgruppe der 55 bis 74-Jährigen an Typ-2-Diabetes erkrankt sein (Männer: 2,3 Mio., Frauen: 1,6 Mio.). Quelle: diabetesinformationsdienst.de

Zudem ist die Prävalenz des Typ-2-Diabetes mellitus in Deutschland stark altersabhängig, wobei Männer und Personen mit niedrigem Sozialstatus häufiger erkranken als gleichaltrige

Frauen und Menschen aus höheren sozialen Schichten (RKI, 2018). Abbildung 5 zeigt die Zunahme der Prävalenz in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Sozialstatus. Demnach tragen Frauen und Männer in der Altersklasse der 70 bis 79-Jährigen, sowie Menschen mit niedrigem Sozialstatus das höchste Risiko, an Diabetes zu erkranken.

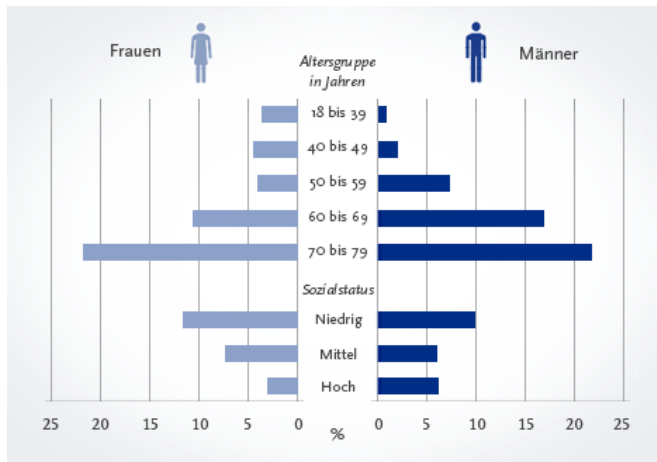


Abbildung 5: Verbreitung von diagnostiziertem Diabetes mellitus – Anteile an der gleichaltrigen Bevölkerung, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen sowie nach Sozialstatus, Quelle: © Robert Koch-Institut

Die deutliche Inzidenzzunahme des Diabetes kann auch in anderen Nationen verzeichnet werden. 2014 waren laut Weltgesundheitsorganisation circa 422 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt, im Vergleich dazu waren es 1980 108 Millionen. Damit hatte sich 2014 schon die globale Prävalenz von 4,7 % auf 8,5 % nahezu verdoppelt (World-Health-Organization, 2016). In einigen Staaten verzeichnet die International Diabetes Federation (IDF) 2021 Prävalenzen über 10 % (IDF, 2021). Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 6 dargestellt: Zu den Hoch-Risiko-Regionen beziehungsweise Hoch-Risiko-Nationen gehören insbesondere die USA, Mexiko, Südafrika und die Türkei.

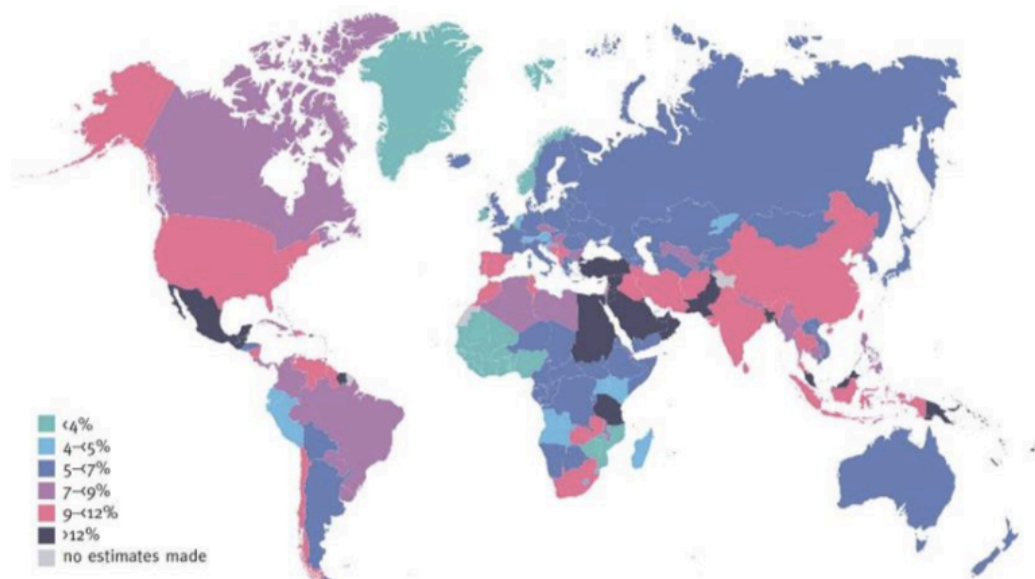


Abbildung 6: Estimated age-adjusted comparative prevalence of diabetes in adults aged 20–79 years in 2021, Quelle: IDF Diabetes Atlas 2021 – 10th edition

Schon 2016 stellte die WHO in ihrem „Global report on diabetes“ die ebenso deutliche Prävalenzzunahme der beiden Hauptrisikofaktoren für Diabetes – Übergewicht und Fettleibigkeit – fest (World-Health-Organization, 2016), weshalb auch deren Bekämpfung einen immer wichtigeren Stellenwert in den internationalen Therapieleitlinien erhielt.

1.2.2 Prognose und Mortalität

Die Datenlage in Deutschland bezüglich der Mortalität von Diabetes-Patienten ist spärlich. Es existierten bisher nur einige wenige Studien des RKI, die Schätzungen aus Surveys und regionalen Kohortenstudien als Datengrundlage annahmen. Demnach beträgt die Exzess-Mortalität (= Übersterblichkeit, d.h. erhöhte Sterberate der an Typ-2-Diabetes mellitus Erkrankten verglichen mit nicht an Diabetes Erkrankten) max. 2,6 % (Heidemann & Scheidt-Nave, 2017). Eine wissenschaftliche Arbeit (Dezember 2017) aus Dänemark, welches ein vergleichbares Gesundheitssystem mit Deutschland hat, lässt Rückschlüsse auf die durch Diabetes bedingte tatsächliche Mortalität zu: Sie zeigt, dass 21 % aller Todesfälle in Deutschland auf Diabetes zurückzuführen sein könnten, 16 % davon auf Diabetes mellitus Typ 2. Dies entspricht 175.000 bzw. 137.000 Menschen (Frati, Iniestra, Ariza, 1996). Damit liegen die Zahlen vermutlich weit- aus höher als bisher angenommen. Insgesamt zeigen alle Studien jedoch tendenziell eine Abnahme der Mortalität. Als Gründe werden hierbei nicht nur die bessere Versorgung der Patienten, sondern auch eine bessere Prävention und Therapie diabetesbedingter Komplikationen angeführt (Heidemann & Scheidt-Nave, 2017; Jacobs, 2017).

1.2.3 Sozioökonomische Folgen

Seit Jahren sind die enormen finanziellen Belastungen für Deutschland bekannt. Die durch Diabetes verursachten Gesamtausgaben – basierend auf Angaben der Deutschen Diabetes Gesellschaft und der Deutschen Diabetes-Hilfe – lagen 2017 schon bei 35 Milliarden Euro (Gallwitz & Krüger, 2017). Dabei publizierten Forscher in der englischsprachigen Fachzeitschrift „Diabetes Care“ Zahlen, denen zufolge 42 % der Kosten auf die Krankenhausbehandlung, 27 % auf die Medikamente und 20 % auf die ambulante Versorgung entfallen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der größte Anteil der Kosten nicht durch Diabetes selbst, sondern durch seine Folgeerkrankungen verursacht wird. Des Weiteren gaben die Forscher an, dass die Gesamtjahresausgaben pro Patienten von 4.688 € im Jahr 2013 auf 4.949 € im Jahr 2015 angestiegen sind. Dies entspricht einer Zunahme von 5,6 % (Kähm et al., 2018).

1.3 Therapieaspekte

Monitoring

Als Parameter zum Therapiemonitoring dient die Bestimmung des HbA_{1c}, welches durch Glucoseanlagerung an das Hämoglobin der Erythrozyten während ihrer gesamten Lebensdauer entsteht (= glykosyliertes Hämoglobin). Es handelt sich um eine stabile Unterfraktion (= HbA_{1c}) dieser glykosylierten Hämoglobine, die gemessen werden kann. Die Konzentration des HbA_{1c} im Blut (im Verhältnis zu der gesamten Hämoglobinkonzentration) spiegelt die Blutzuckerwerte der vergangenen sechs bis acht Wochen wider. Dieser Zeitraum entspricht in etwa der mittleren Überlebenszeit der Erythrozyten. Allerdings sind die Messungen stark methoden- und laborabhängig und nicht immer gut reproduzierbar (Schleicher et al., 2021). Der HbA_{1c}-Wert unterliegt auch zahlreichen Einflussgrößen, wie beispielsweise Ethnizität und Alter der Patienten, die allerdings in den aktuellen Therapieleitlinien keine Berücksichtigung finden (Schleicher et al., 2021). Unter der Therapie sollte die HbA_{1c}-Konzentration in jeder Stufe zwischen 6,5 % und 7,5 % liegen (= Ziel-Wert) (Karow, 2020).

Therapie

Die orale Therapie des Typ-2-Diabetes erfolgt nach einem Stufenplan. Dieser Algorithmus zur glukosesenkenden Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2 wird in Abbildung 7 dargestellt: Am Anfang steht vor allem die Lebensstiländerung mit Erhöhung der körperlichen Aktivität und Ernährungsumstellung im Mittelpunkt der Behandlung. Auch eine Therapie der Komorbiditäten (Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Adipositas, Rauchen) sollte erfolgen. Bei unzureichender Therapieeffektivität oder bei mangelnder Compliance wird nach Einschätzung des Risikos für diabetesassoziierte kardiovaskuläre und/oder renale Ereignisse eine Monotherapie mit einem oralen Antidiabetikum oder aber eine orale Pharma-Zweifachkombination empfohlen. Der Therapie-Erfolg wird nach drei bis sechs Monaten evaluiert und das Therapiekonzept entsprechend erweitert ggf. auch nun mit Insulin-Therapie.

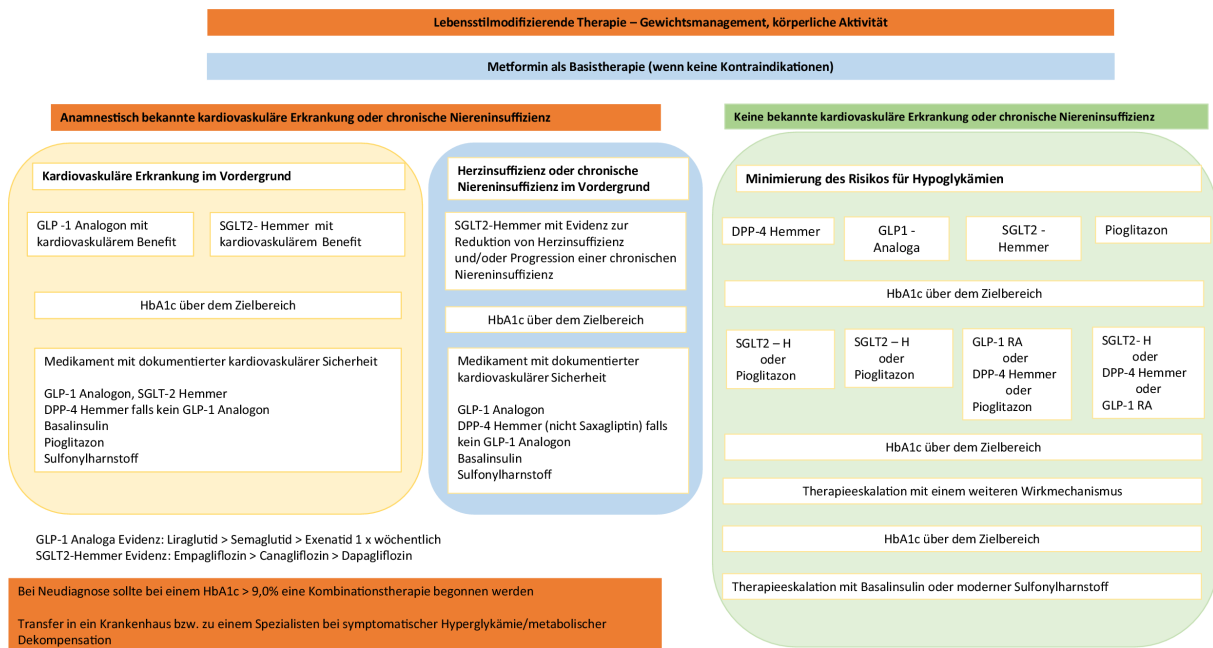


Abbildung 7: Blutzuckersenkende Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2, Quelle: Wiener Wochenschrift (2019)

Es stehen verschiedene Klassen oraler Antidiabetika zur Verfügung, die jeweils an unterschiedlichen Stellen des Körpers wirken (Abbildung 8). Es lassen sich insulinotrope von nicht insulinotropen oralen Antidiabetika unterscheiden: Die insulinotropen Wirkstoffe führen entweder unabhängig von der Glucosekonzentration (Sulfonylharnstoffe, Glinide) oder abhängig von der Glucosekonzentration (DDP-4-Hemmer, GLP-1-Analoga) zu einer vermehrten Insulinsekretion durch die Betazellen des Pankreas. Die nicht insulinotropen Substanzklassen wirken entweder durch Inhibition der Synthese von Glucose, Lipiden und Triglyceriden in der Leber (Biguanide), durch eine Verbesserung der Insulinwirkung in Fett-, Leber- und Muskelgewebe (Glitazone), durch eine gesteigerte renale Glucoseausscheidung (SGLT-2-Hemmer) oder durch eine verminderte enterale Glucoseresorption (alpha-Glucosidase-Hemmer).

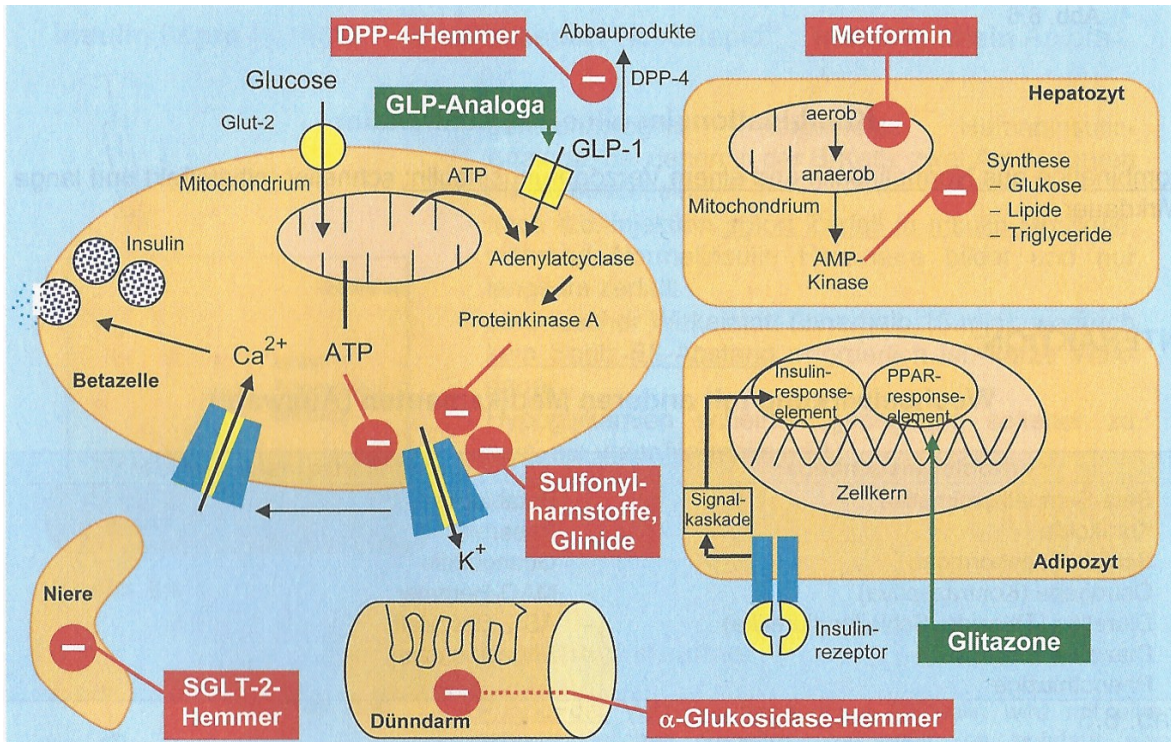


Abbildung 8: Wirkmechanismus der oralen Antidiabetika, Quelle: Karow T

Die medikamentöse Therapie des Typ1 Diabetes erfolgt durch eine lebenslange Insulin-Therapie. Der individuelle Insulinbedarf bei Menschen mit Typ-1-Diabetes wird durch die physiologische Insulin-Sekretion bestimmt. Diese erfolgt sowohl ohne Nahrungszufuhr (= basaler Insulinbedarf), als auch nach Nahrungszufuhr (= prandialer Insulinbedarf). Für die Therapie des Typ-1-Diabetes sind in Deutschland zwei unterschiedliche Insulinarten zugelassen: Zur Gruppe der Humaninsuline zählen die sogenannten Normalinsuline und Humaninsuline mit Verzögerungsprinzip. Sie werden durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen hergestellt und entsprechen menschlichem Insulin. Die Gruppe der Insulinanaloga umfasst dem menschlichen Insulin sehr ähnliche Substanzen, jedoch wurden einzelne Aminosäuresequenzen modifiziert, um Wirkungseintritt- und Verlauf im menschlichen Körper zu verändern. Durch die Kombination der einzelnen Präparate mit unterschiedlicher Kinetik stehen diverse Therapie-konzepte zur Verfügung (Konventionelle Therapie mit verbindlicher Vorgabe von Insulindosis und Größe und Abfolge der Mahlzeiten, Intensivierte Therapie mit mindestens drei Insulininjektionen am Tag unter genauerer Berücksichtigung des basalen und prandialen Insulinbedarfs) (Müller-Wieland, 2018).

1.4 Verfahren zur Charakterisierung des Glucosemetabolismus

1.4.1 Statische Methoden

Eine einfache, oft in der klinischen Praxis angewandte Methodik ist die Bestimmung der Nüchtern-Plasmaglukose bzw. Gelegenheits-Plasmaglukose aus venösem bzw. kapillärem Blut.

Während zur Diagnosesicherung des Diabetes nur die Bestimmung der Glucose aus venösem Plasma (und nicht aus Kapillarblut) sinnvoll ist, wird die Messung der Plasmaglutose aus kapillärem Blut vor allem zur Selbstkontrolle für Diabetespatienten verwendet, da sie innerhalb kurzer Zeit (5 bis 30 Sekunden) die Blutzuckerkonzentration des Patienten messen kann (Gressner & Torsten, 2019; Lichtinghagen, 2013/2014; Neumaier, 2015). Die Blutzuckerbestimmung erfolgt dabei entweder im Labor durch Nasschemie oder mittels POCT-Testung (= Point-of-Care-Testing). Nasschemische Methoden sind genauer und daher bei der Diagnosesicherung des Diabetes mellitus zu verwenden, POCT-Testung dagegen wird überwiegend im Rahmen des Therapiemonitorings eingesetzt (Schleicher et al., 2021). Beide Messmethoden beruhen auf drei unterschiedlichen enzymatischen Reaktionen:

- I. Bei der Hexokinase-Methode werden zu dem Blut ATP und das Enzym Hexokinase im Überschuss dazugegeben. Es entsteht ADP + Glucose-6-phosphat, welches in einer zweiten Reaktion bei Zugabe von NADP und Glucose-6-phosphatdehydrogenase (ebenfalls im Überschuss) umgesetzt wird. Dabei wird Gluconolacton-6-phosphat und $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ gebildet. Letzteres kann photometrisch gemessen werden und gilt als Maß für die Glucosekonzentration in der Probe. Während die Phosphorylierung der Glucose unspezifisch ist, da die Hexokinase auch andere Zuckermoleküle phosphorylieren kann, ist die Bildung des Gluconolacton-6-phosphates spezifisch; deshalb wird die Methode auch als Referenzmethode zur Glucosebestimmung verwendet. (Gressner & Torsten, 2019).
- II. Bei der Glucose-Dehydrogenase-Methode wird die Glucose bei Zugabe von Glucose-Dehydrogenase und NAD^+ (jeweils im Überschuss) zu Gluconolacton oxidiert. Dabei entsteht $\text{NADH} + \text{H}^+$, welches ebenfalls photometrisch gemessen werden kann (Lichtinghagen, 2013/2014).
- III. In der Glucose-Oxidase-Peroxidase-Reaktion oxidiert die Glucoseoxidase zunächst die Glucose zu Gluconolacton. Zusätzlich entsteht Wasserstoffperoxid, welches in einer zweiten Reaktion durch die Oxidation eines reduzierten Farbstoffes entsteht. Alternativ kann der Elektronenfluss gemessen werden, der durch die angelegte Spannung am Blutzuckermessgerät entsteht, wenn das gebildete H_2O_2 wieder rückreduziert wird. Dieser gemessene Elektronenfluss ist proportional zur Glucosekonzentration und kann von einem Messgerät dargestellt werden (Lichtinghagen, 2013/2014). Abbildung 9 stellt die Reaktionsgleichung auf molekularer Ebene dar.

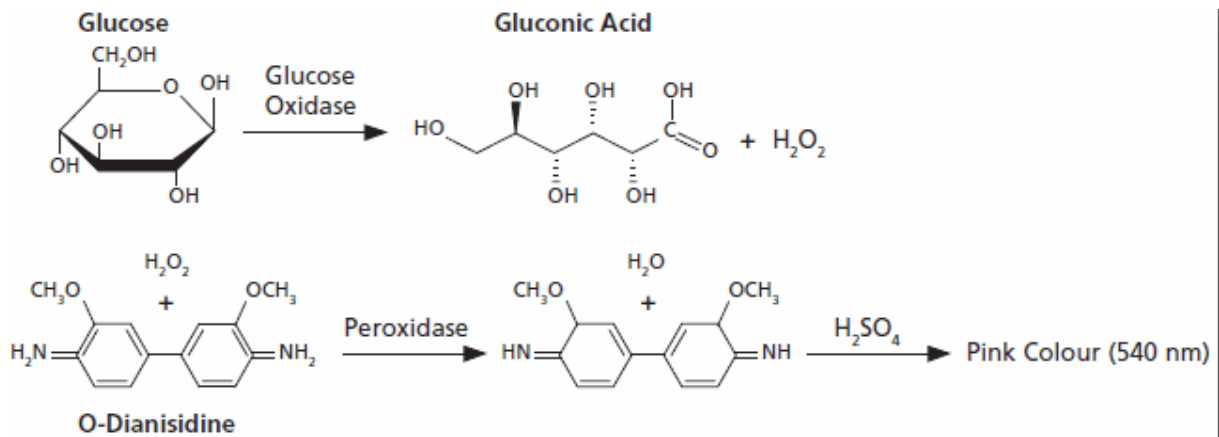


Abbildung 9: Glucose-Peroxidase-Reaktion, Quelle: Siegrist J.

Während die Bestimmung der Plasma-Glucosekonzentration zur Diagnosesicherung im Labor überwiegend durch die Hexokinase-Methode erfolgt, wird die Glucose-Peroxidase-Reaktion vor allem zum Therapiemonitoring verwendet. Die Konzentrationsbestimmung mittels Blutzuckermessgerät erfolgt dabei nicht photometrisch, sondern durch Messung des entstehenden Elektronenflusses am Gerät (Gressner & Torsten, 2019; Lichtinghagen, 2013/2014; Nauck et al., 2017). Abbildung 10 zeigt das in der Studie verwendete Blutzuckeressgerät. Es verwendet die Glucose-Peroxidase-Reaktion.



Abbildung 10: FORA Diamond Mini: Das in der Studie verwendete Blutzuckermessgerät (FORA Diamond Mini) verwendet die Glucose-Peroxidase-Reaktion zur Messung der Blutglucosekonzentration, Quelle: Gdanietz I et al.

Neben dem Hämoglobin unterliegen auch andere Proteine der nicht-enzymatischen Glykierung, so zum Beispiel auch Albumin, die Immunglobuline und Fructosamin. Letzteres kann insbesondere aufgrund seiner kürzeren Halbwertszeit als Hämoglobin Auskunft über die Blutzuckerwerte der letzten zwei bis drei Wochen geben (Methodenplattform Justus-Liebig-Universität-Gießen, 2019).

Bei Blutzuckerwerten ab 240 mg/dl bzw. bei entsprechenden Symptomen einer Ketoazidose kann insbesondere bei Typ-1-Diabetikern die Bestimmung der Ketonkörper im Urin erfolgen.

Auch bei Typ-2-Diabetikern nach Nahrungsumstellung mit Kohlenhydratrestriktion gibt die Ketonkörperbestimmung im Harn Auskunft über einen bereits ketoazidotisch entgleisten Stoffwechsel (Chain, 1999).

Des Weiteren kann die Bestimmung der Harnglucose als Maß für die Glucosebelastung des Körpers dienen: Liegen die Blutzuckerwerte des Patienten unterhalb der sogenannten Nierenschwelle, kann die aufgenommene Glucose vom Körper vollständig rückresorbiert werden. Bei den allermeisten Menschen liegt diese zwischen 160 und 180 mg/dl. Erscheint Glucose bereits bei Werten unter 160 mg/dl im Harn, kann von einem Diabetes renalis gesprochen werden. Da diese Methode jedoch nur die Glucosebelastung des Körpers seit der letzten Harnentleerung widerspiegelt, wurde sie in der Diagnostik und Therapie des Diabetes weitgehend vernachlässigt (Hien & Böhm, 2013).

1.4.2 Dynamische Methoden

Der orale Glucosetoleranztest (= oGTT) misst, wie der Körper aufgenommene Glucose verarbeiten kann. Er wird primär zur Früherkennung des Diabetes mellitus eingesetzt. Zudem kann durch ihn eine Aussage über den postprandialen Glucosstoffwechsel getroffen und die Manifestation eines Diabetes mellitus frühzeitiger erkannt werden als durch die alleinige Messung der Nüchtern-Plasmaglucoese oder des Hba1c (Bartoli, Frau, Carnevale, 2011). Da es beim oGTT zu einer Belastung des Körpers mit einer großen Menge Glucose kommt, ist er bei Patienten mit manifestem Diabetes kontraindiziert. Durchgeführt wird er vor allem bei unklaren Fällen und bei Schwangeren. Man unterscheidet zwei Formen:

- I. Beim 75 g oGTT wird dem Patienten die Nüchtern-Plasmaglucoese aus venösem Blut gemessen. Diese sollte bei gesunden Personen weniger als 100 mg/dl betragen. Dann trinkt der Patient eine 75 g-haltige Glucoselösung. Nun steigen die Blutzuckerwerte sowohl bei Diabetikern als auch bei Nicht-Diabetikern an, bis die Bauchspeicheldrüse normalerweise Insulin freisetzt und die Glucose schließlich in die Zellen aufgenommen werden kann. Nach zwei Stunden wird der Blutzucker erneut gemessen. Dieser Wert sollte weniger als 140 mmol/dl betragen. Bei Patienten mit gestörter Glucosetoleranz und bei Diabetikern liegt dieser Wert folglich höher (Gutthoff, 2007). Abbildung 11 zeigt die Blutglucose-Konzentration eines Diabetikers im Vergleich zur Blutglucose-Konzentration eines Gesunden während des oGTT: Diabetiker weisen auch nach 2 Stunden Blutglucose-Konzentrationen über 140 mg/dl auf.

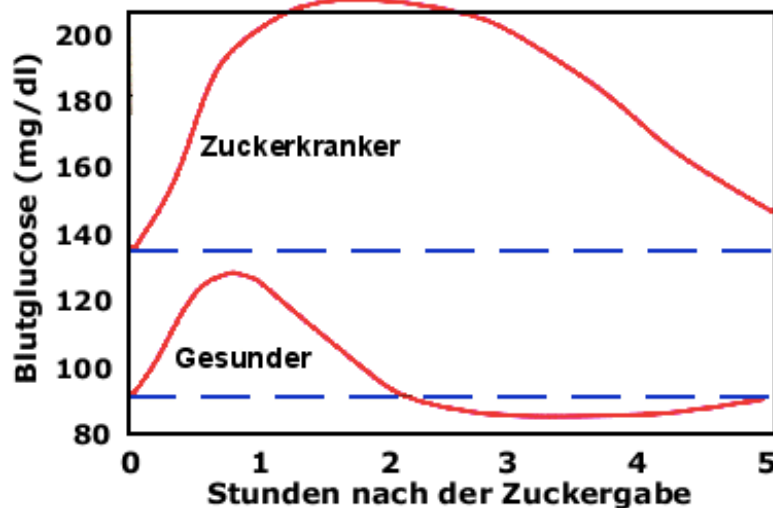


Abbildung 11: Blutzuckerspiegel bei Blutzucker-Belastungs-Probe. Im Vergleich zum Gesunden findet man beim Diabetiker: einen höheren Ausgangswert, einen höheren Anstieg, einen langsameren Abfall, Quelle: Hübl W

Der Test kann auch mit venösem und kapillärem Vollblut bzw. kapillärer Plasmagluco-
 cose durchgeführt werden, wobei jedoch andere Messwertgrenzen zu berücksichtigen
 sind (Schäffler, 2018). Des Weiteren kann er auch unter zusätzlicher Messung von
 Insulin und C-Peptid erfolgen. Das C-Peptid ist Teil des Proinsulins und entsteht bei
 der Freisetzung von Insulin. Es besitzt im Gegensatz zu Insulin ($t_{1/2} \approx 20$ Minuten) eine
 längere Halbwertszeit ($= t_{1/2}$) und kann insbesondere zur Beurteilung der Beta-Zellfunk-
 tionsreserve herangezogen werden.

- II. Die zweite Form ist der 50 g oGTT. Er wird als Suchtest zum Diabetesscreening in der
 Schwangerschaft eingesetzt. Hierbei wird der nicht nüchternen Patientin unabhängig
 von der Tageszeit 50 g Glucose verabreicht. Liegt die Plasmagluco-
 se nach einer
 Stunde bei mehr als 200 mg/dl, liegt ein Diabetes vor. Liegt sie zwischen 135 und 200
 mg/dl, muss ein 75 g oGTT zur Diagnosestellung durchgeführt werden (Lüthgens,
 2019).

Insulin wird oszillierend (pulsatil) freigesetzt. Angeregt wird die Insulinfreisetzung durch den
 Anstieg des Blutzuckerspiegels, durch den Anstieg der Konzentration einiger Aminosäuren
 (insbesondere Arginin und Leuzin) und Fettsäuren und durch freigesetztes Insulin selbst
 (autokrines positives Feedback). Während Insulin innerhalb kurzer Zeit (Sekunden bis
 Minuten) Wirkung auf den transmembranalen Glukose- und Ionentransport, sowie
 Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Enzymen zeigt, braucht es Minuten bis
 Stunden für die volle Auswirkung auf die Gentranskription und die Proteinbiosynthese, für die

auf Proliferation/Differenzierung (Zellen und Glucosetransporter) mehrere Tage (Hinghofer, 2020). Daher sollte sich der Patient an den vorherigen drei Tagen kohlenhydratreich (≥ 150 g KH/d) ernährt haben und eine Nahrungs- und Alkoholkarenz von 10 bis 12 Stunden (Alkohol hemmt Glucoseaufnahme in die Zellen, sowie Gluconeogenese) eingehalten haben. Falsch positive Werte können bei der Einnahme von Medikamenten, beispielsweise bei Einnahme von Glukokortikoiden oder Nikotinsäurederivaten, entstehen. Auch entzündliche Erkrankungen oder Magen- und Darmoperationen können die Kinetik der Nahrungsaufnahme und Insulinsekretion verändern (Schäffler, 2018).

Eine weitere, angewandte dynamische, jedoch nicht routinemäßig durchgeführte, Methodik zur Charakterisierung des Glucosemetabolismus besteht in der Verwendung verschiedener Clamp-Techniken. Dabei stehen bisher zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung:

- I. Bei der euglykämischen Insulinclamp-Technik wird durch Infusion einer definierten Menge Insulin (ca. $100 \mu\text{E/ml}$) der Insulinspiegel angehoben. Nun wird durch Infusion von Glucose versucht, die Plasmaglucoese auf einem normoglykämischen Niveau zu halten. Die infundierte Glucosemenge plus der Menge der endogenen Glucoseproduktion ist ein Maß für die Glucoseverwertung des Patienten und entspricht der Glucoseutilisation. Nach einem gewissen Zeitraum hemmt die exogene Insulinzufuhr die endogene Glucosefreisetzung jedoch derart, dass nun lediglich die exogene Glucosezufuhr als verwertbare Glucose zur Verfügung steht. Infolgedessen gilt diese exogene, den Blutzuckerspiegel auf einem normoglykämischen Niveau haltende, Glucosezufuhr als limitierender Faktor; d.h., dass hohe Glucose-Infusionsraten für eine gute Sensibilität der Muskelzellen sprechen. Die Glucose-Infusionsrate zu Beginn des Versuchs kann dabei jedoch nicht indirekt als Maß für die Gluconeogenese gesehen werden, da die endogene Glucoseproduktion sich zu Beginn aus einer Vielzahl an Stoffwechselfvorgängen zusammensetzt (insbesondere Gluconeogenese, Glykogenolyse).
- II. Bei der hyperglykämischen Insulinclamp-Technik wird so viel Glucose infundiert, bis die Plasmaglucoese-Konzentration ca. 125 mg/dl über dem Nüchternblutzucker liegt. Auch hier wird Glucose nun variabel infundiert. Dabei soll jedoch stets der Zustand der Hyperglykämie beibehalten werden. Die Glucose-Infusionsrate wird hier ebenfalls als Indikator der Insulinsensitivität gesehen. Dabei spricht eine hohe Glucose-Infusionsrate für eine gute Sensibilität der Muskelzellen gegenüber Glucose. Zusätzlich kann jedoch noch die Plasmainsulinkonzentration gemessen werden, woraus sich später die Insulinsekretion des Körpers (eine konstante hepatische Insulinextraktion vorausgesetzt) errechnen lässt.

Der große Nachteil beider Methoden besteht in deren Aufwand, da die Patienten nicht nur zwei periphere Venenzugänge erhalten müssen, sondern auch über einen längeren Zeitraum sowohl während als auch nach der Untersuchung von medizinisch-ärztlichem Personal überwacht werden sollten, da Insulin zwar eine Plasmahalbwertszeit von circa zehn Minuten hat, jedoch die Wirkdauer des bereits an den Insulinrezeptor gebundenen Insulins mit vierzig Minuten deutlich erhöht ist und somit auch noch nach Beendigung der Untersuchung eine deutliche Hypoglykämiegefahr besteht (Karger, 1984; Schäffler, 2018; Chain, 1999). Die Clamp-Techniken sind daher in der Routine nicht durchführbar. Sowohl in der Diagnostik als auch in der Therapie des Diabetes gibt es demzufolge bisher nur wenige Indikatoren, die zum einen das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes widerspiegeln oder zum anderen zum dynamischen Monitoring der Diabetestherapie herangezogen werden können.

2. Hypothese/Zielsetzung

Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob durch die orale Gabe von nicht radioaktiv markierter Glucose (Isotopolog [$U^{13}C^6$]) und der konsekutiven seriellen Messung von Metaboliten im Blut durch Massenspektroskopie die Ermittlung des Flusses der Glucose bzw. der Metaboliten erfassbar ist, und durch Modellierung mittels mathematischer Differenzialgleichung die Gluconeogenese der Probanden damit nichtinvasiv ermittelbar ist.

Die Methode zielt ferner darauf ab, den Glucosestoffwechsel von Patienten dynamisch, unter Berücksichtigung klinischer und molekularer Parameter, in einem möglichst einfach durchzuführenden ambulanten Setting zu erfassen.

Des Weiteren sollten die erhobenen Daten in einem standardisierten und zertifizierten Datenerfassungsprogramm gespeichert werden, um die Untersuchung der Unterschiede im Glucosestoffwechsel zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern, aber auch zwischen einzelnen Untergruppen an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten herausarbeiten zu können.

3. Material und Methodik

Das Studienprotokoll kann in drei Abschnitte gegliedert werden: 1. Probengewinnung und Erfassung klinischer Parameter der Probanden, 2. Probenextraktion, Messung mittels GC-MS und Errechnung der Flüsse, 3. Interpretation der Ergebnisse und Auswirkung klinisch erfasster Parameter auf die Messergebnisse.

Das Studiendesign entsprach einer nicht randomisierten kontrollierten, prospektiven Fallkontrollstudie. Die Durchführung wurde sowohl durch die Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes (Kennnummer 68/14) als auch durch die Ethikkommission der Universität Luxemburg genehmigt (ERP-4-11). Sowohl vor Beginn der Studie als auch vor Beginn der klinischen Datenerhebung wurde jeder Patient über die Speicherung und Verwendung seiner erhobenen Werte und Versuchsergebnisse, aber auch über Risiken und Nebenwirkungen der Studie (beispielsweise über ein (geringes) Infektionsrisiko oder eine mögliche Hypoglykämie) aufgeklärt. Die jeweilige Einwilligung wurde durch eine Einverständniserklärung, welche in Französisch und Deutsch zur Verfügung stand, festgehalten.

Um die Patienten zu pseudo-anonymisieren, wurde jedem Patienten vor Versuchsbeginn eine automatisch generierte Identifikationsnummer zugeteilt. Eine entsprechende Liste mit Namen der Patienten und jeweils zugeteilter Nummer wurde beim Studienleiter hinterlegt.

3.1 Charakterisierung der Kohorte

Als Versuchspersonen wurden Typ-1-Diabetiker und vor allem Typ-2-Diabetiker, sowie nicht an Diabetes erkrankte Kontrollpersonen herangezogen. Die Rekrutierung erfolgte auf freiwilliger Basis, ohne finanzielle Vergütung, über niedergelassene Diabetologen im Saarland (Dr. Schürfeld, Saarlouis; Dr. V. Wenzl-Bauer, Dr. J. Wenzl, Siersburg), über einen Zahnarzt (Dr. med. dent. Bruno Sahner, Bous), eine Selbsthilfegruppe für Diabetiker (Selbsthilfegruppe für Diabetiker Homburg Saar) sowie überwiegend durch Kliniken im Saarland und Luxemburg (Universitätsklinikum des Saarlandes, Diabetologie; Fliedner Krankenhaus, Neunkirchen; Centre Hospitalier Emile Mayrisch, Luxembourg). Die Studie umfasste 59 Probanden, davon einen männlichen, 68-jährigen Typ-1-Diabetiker, 42 Typ-2-Diabetiker und 16 nicht an Diabetes erkrankte Kontrollpersonen. In die Studie aufgenommen werden konnten von den 59 Probanden lediglich 57. Grund hierfür waren unter anderem eine Nicht-Nüchternheit und ein vorzeitiger Abbruch der Studie aus privaten Gründen.

Von jedem Patienten wurde die gesamte Medikation, sowie wichtige anthropometrische Daten erhoben: der Diabetes-Typ, die Erkrankungsdauer, bekannte Komorbiditäten, das Alter zum Untersuchungszeitpunkt, das Geburtsdatum, das Geschlecht, die Größe, das Gewicht, der daraus resultierende BMI, der Hüft- und Taillenumfang und das sich daraus bestimmende Tail-len-Hüft-Verhältnis (= Waist-to-Hip Ratio; WHR) (World-Health-Organization, 2008). In Tabelle zwei ist die Aufteilung der Kohorte nach Diabetes-Typ, Alter und Geschlecht dargestellt. Der Altersdurchschnitt der gesamten Kohorte lag bei 59 Jahren.

Tabelle 2: Aufteilung der Kohorte nach Diabetes-Typ, Alter und Geschlecht

Gruppe	Geschlecht	Anzahl	Jüngster Patient	Ältester Patient	Altersdurchschnitt	Standartabweichung
Typ-1-Diabetiker	männlich	1	68	68	68	-
Typ-2-Diabetiker	männlich	25	38	79	62,64	9,77
	weiblich	17	31	82	54,88	12,29
Gesunde	männlich	4	51	79	67,75	13,74
	weiblich	12	23	76	53,92	14,23
Gesamt		59	23	82	59,07	12,33

Auch eine kurze Befragung zur subjektiven Einschätzung der Lebensführung erfolgte anamnestisch: Die Patienten wurden nach ihrem Alkohol- und Zigarettenkonsum, ihrer sportlichen Aktivität sowie ihrem beruflichen und sozialen Stress befragt.

Um die Gluconeogeneserate von Diabetikern und Nicht-Diabetikern – im Hinblick auf individuell verschiedene Parameter – vergleichen zu können, wurde von jedem Patienten, insoweit es uns klinisch möglich war, ein umfangreiches Labor (31 Parameter) aus der Akte erhoben. Dieses durfte nicht älter als sechs Wochen sein. Die erhobenen Laborwerte vor Studienteilnahme sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Erhobene Laborwerte vor Studienteilnahme

Kleines Blutbild	Hämatokrit (= Hkt)
	Erythrozyten
	Leukozyten
	Thrombozyten
	Hämoglobin (= Hb)
	mittleres korpuskuläre Hämoglobin
	mittleres Erythrozytenvolumen
	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration

	Erythrozytenverteilungsbreite (= RDW)
Differentialblutbild	Monozyten
	Lymphozyten
	Erythrozyten
	Basophile
	Eosinophile
	Neutrophile
Hormone	Thyreoidea-stimulierendes Hormon (= TSH)
	Vitamin D
Blutfette	Triglyceride
	Low Density Lipoprotein (= LDL)
	High Density Lipoprotein (= HDL)
	Cholesterin
Leberwerte	Alanin-Aminotransferase (= GPT)
	Aspartat-Aminotransferase (= GOT)
	γ -Glutamyltransferase (= GGT)
Nierenwerte	Kreatinin
	Glomeruläre Filtrationsrate (= GFR)
Parameter des Glucosestoffwechsels	Nüchtern-Plasmaglucose
	C-Peptid
	HbA _{1c}
Verdauungsenzyme	Amylase
	Lipase

3.2 Ambulante Methodik: Ausstattung und klinische Durchführung

Für die Untersuchung wurden die Untersuchungssets („Kits“) schon präklinisch vorbereitet: Jedes Untersuchungssset bestand aus nachfolgend aufgeführten Materialien:

- neun spezielle Aluminiumbeutel zum Lagern der Trockenblutkarten nach dem Versuch

- neun Trockenblutkarten (903 Protein Lochkarte (Whatman 903TM, 10531018 Rev.AB, LIMS5344))
- neun mit Silica-Gel befüllte Beutel.
- der mit dem Glucose-Isotopolog $U^{13}C^6$ befüllte, ca. 200 ml fassende luftdicht verschlossene Glasbehälter (bezogen von: Cambridge Isotope Laboratories, USA)
- 100 ml stilles Wasser, abgefüllt in transparente Kunststoffflaschen
- neun Lanzetten mit der Stichtiefe 2 mm (bezogen von: BD Microtainer®)
- 18 sterile Tupfer
- Ethanol
- ein Tablet mit der passenden DBS-Software
- ein Glucosemessgerät mit Bluetooth-Anschluss (Fora Diamond Mini)
- zu dem Glucosemessgerät passende Messstreifen (Fora Diamond)

Vor Studienbeginn wurde die Rückseite von acht Filterkarten mit speziellen Etiketten (Abbildung 14) versehen, diese waren bedruckt mit der Patienten-ID, einer Ziffer von jeweils eins bis acht und einem spezifischen Barcode. Die neunte Filterkarte wurde handschriftlich mit der Patienten-ID und zusätzlich der Kennung „T0“ versehen. Auch die Aluminiumpäckchen wurden vor Versuchsbeginn von Hand mit der Patienten-ID sowie dem aktuellen Datum beschriftet. Mittels Tablets (Abbildung 12) wurden die Patienten durch die Untersuchung geführt. Das Blutzuckermessgerät übertrug automatisch den Zeitpunkt der Messung und die dabei erfasste Blutglucosekonzentration auf das Tablet, wodurch beides lückenlos dokumentiert wurde. Verwendet wurde das Glucosemessgerät Fora Diamond Mini, welches zuvor nach den Richtlinien der Internationalen Organisation für Normung (Abweichung von 95 % der mittels Glucometer gemessenen Konzentration um weniger als 15 mg/dl von dem tatsächlichen Wert) jeweils bei Glucosekonzentrationen < 100 mg/dl, bei Glucosekonzentrationen > 100 mg/dl und im Bereich zwischen 35 mg/dl und 489 mg/dl für jeweils drei Messwerte getestet wurde.

Tablet und Glucometer wurden in der Nacht zuvor aufgeladen. Neben den obligaten Materialien wurden noch einige weitere Filterkarten, Lanzetten, Tupfer und Messstreifen für das Glucometer sowie Ladestationen für die Geräte als Ersatz mitgeführt.



Abbildung 12: Tablet und passendes Glucometer



Abbildung 13: Filterkarten mit Aluminiumbeutel, Silica-Gel, Glucose, Lanzetten, Wasserflaschen und Tupfer



LCSB DBS 2016092003/1

Abbildung 14: Etikett für die Trockenblutkarte: Es handelt sich um ein Etikett für die erste Blutentnahme nach Versuchsbeginn (T1) des Patienten mit der Patienten-ID 2016092003

Am Tag der Untersuchung wurde den nüchternen Probanden (d.h. mindestens acht Stunden Nahrungskarenz) aus der Fingerbeere Blut entnommen: Nach Desinfektion mit einem in Ethanol getränkten Tupfer wurde den Patienten mit einer Einmallanzette in die Fingerbeere gestochen. Der erste Blutropfen wurde jeweils verworfen. Anschließend wurde mit dem Glucometer der Glucosespiegel gemessen, unter dem Messwert „T0“ notiert und die am Tag zuvor handschriftlich ausgefüllte Filterkarte mit der Kennung „T0“ mit Blut beträufelt. Besonders wichtig war es dabei, die einzelnen Kreise (jeweils fünf) vollständig zu füllen und dabei von links nach rechts vorzugehen. Dann wurde die App gestartet. Nach Eingabe des Geschlechts, Alters und Gewichts wurde die Glucoselösung vorbereitet, indem die Glucose (Isotopolog $U^{13}C^6$) in 100 ml stillem Wasser gelöst wurde. Diese Isotope kommen in der Natur vor und ca. 1% des Kohlenstoffes in unserer Nahrung und unserem Körper beinhalten bereits dieses stabile Isotop. Nun begann die eigentliche Untersuchung: Nach dem Trinken der Lösung und der Bestätigung der auf dem Tablet eingegebenen Daten startete das Protokoll. Fünf Minuten vor der erneuten Blutentnahme wurde man durch ein akustisches Signal dazu aufgefordert, den Barcode der nächsten Filterkarte („T1“) zu scannen und schließlich 30 Sekunden vor Ablauf der Zeit dazu, sich auf die bevorstehende Blutentnahme vorzubereiten. Nun erfolgte die Blutentnahme aus der Fingerbeere nach Lanzettenstich wie bei der ersten Karte („T0“). Zusätzlich war ab dieser

Karte jedoch darauf zu achten, parallel die fünf Punkte einer virtuell auf dem Tablet angelegten Filterkarte zu drücken, um auf diese Weise eine genaue zeitliche Zuordnung der Blutproben vornehmen zu können. Eine Blutentnahme nach Versuchsstart erfolgte zu acht unterschiedlichen Zeitpunkten T1 bis T8 (= nach 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 Minuten), welche jeweils durch das Tablet vorgegeben wurden. Den Patienten war es gestattet, während der Untersuchung stilles Wasser zu trinken und sich zu unterhalten oder zu lesen. Jede Form körperlicher Ertüchtigung beziehungsweise sämtliche Formen der Kalorienaufnahme (außer der markierten Glucose) fanden während der Untersuchung nicht statt. Die Trockenblutkarten wurden mindestens drei Stunden lang an der Luft getrocknet und kamen anschließend in speziellen Aluminiumtaschen mit Silica-Beuteln bei 4 °C für die Lagerung bis zur Extraktion.

Die Extraktion und Messung der Proben orientierten sich an einer publizierten Methode (Rincon, Krook, Galuska, Wallberg-Henriksson, & Zierath), nach welcher die Proben zunächst extrahiert, anschließend mit einem Gaschromatographen aufgetrennt und schließlich mit einem Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert wurden. Benötigte Materialien und Reagenzien zur Weiterverarbeitung der Proben sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Benötigte Materialien und Reagenzien zur Weiterverarbeitung der Proben

Materialien	Reagenzien
1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf)	Methanol (ROTISOLV® ≥ 99,95%, LC-MS grade, Carl Roth, AE71.1)
saubere Papierblätter (zur Reinigung des Micro-Punchs)	70 % Ethanol zum Spülen
Eppendorf ThermoMixer Comfort (bei 4 °C)	D-(+) Glucose (≥ 99,95%, Sigma Aldrich, G8270-100 g, LIMS2894)
Vortexer	L-Alanine (Fluka, 05130-25G, LIMS550)
gekühlte Eppendorf-Zentrifuge 6424 R (bei 4 °C)	Sodium L-Lactate (Sigma Aldrich, L7022-5G, LIMS1666)
Gaschromatographie-Fläschchen mit Mikroein-sätzen (gasdicht, 5...250 µ) und Magnetkappen (PTFESil)	[UL- ¹³ C ₅] Ribitol (Omicron Biochemicals: ALD-062, LIMS2894) Glutarsäure (C/D/N Isotopes Inc.: D-5277, LIMS8104)
SpeedVac (4 °C)	Steriles MilliQ-Wasser (18.2 MΩ·cm, < 5ppb TOC)
Harris Micro-Punch 3.00mm	

903 Protein Lochkarte (Whatman 903TM, 10531018 Rev.AB, LIMS5344)	
Gaschromatograph (Agilent 7890A GC System)	
Trennsäule (Agilent J&W DB-35MS, 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm (L × I.D. × filmthick-ness)) +Kapillare (5 m Duraguard)	
Autosampler (Gerstel Multi Purpose Sampler)	
Massenspektrometer (5975C inert XL Mass Selective Detector)	

Um die Proben zu extrahieren, wurden zunächst zwei Stammlösungen – bestehend aus Ribitol, Glutarsäure und MilliQ-Wasser (= „Reinstwasser“) – angesetzt. Ribitol und Glutarsäure dienten hierbei als interne Standards.

Die erste Stammlösung IS1 bestand aus [UL-¹³C₅] Ribitol, gelöst in MilliQ-Wasser mit der daraus resultierenden Konzentration von $c = 4,50 \text{ mg/ml}$. Die zweite Stammlösung setzte sich aus Glutarsäure und MilliQ-Wasser, ebenfalls in der Endkonzentration $c = 4,50 \text{ mg/ml}$, zusammen. Im nächsten Schritt erfolgte eine Verdünnung dieser beiden Stammlösungen:

Erste Verdünnung IS1 - 1:10 (v/v): $100 \text{ µl Stammlösung IS1} + 900 \text{ µl MilliQ-Wasser} \rightarrow c = 450 \text{ µg/ml}$

Erste Verdünnung IS2 - 1:10 (v/v): $100 \text{ µl Stammlösung IS2} + 900 \text{ µl MilliQ-Wasser} \rightarrow c = 450 \text{ µg/ml}$

Aus diesen beiden verdünnten Lösungen der Konzentrationen $c = 450 \text{ µg/ml}$ wurde nun eine weitere Lösung hergestellt:

Verdünnung Nr. 2 IS1 & IS2 - 1:50 (v/v): $20 \text{ µl der ersten Verdünnung IS1} + 20 \text{ µl der ersten Verdünnung IS2} + 960 \text{ µl MilliQ-Wasser} \rightarrow c = 9 \text{ µg/ml}$

Die Extraktionslösung (bei -20 °C) wurde im Anschluss aus dieser Lösung und Methanol hergestellt. Mit Methanol sollten eine Fluoreszenzlöschung und eine Ausfällung aller in der Probe enthaltenen Proteine erreicht werden:

$1 \text{ ml der zweiten Verdünnung IS1 \& IS2 (} c = 9 \text{ µg/ml)} + 8 \text{ ml Methanol-Wassergemisch (Methanol: } 8:1(\text{MEOH:H}_2\text{O,v/v))}$

Die eigentliche Messung der Proben erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden von allen Trockenblutkarten mithilfe des Harris MICRO-PUNCH 3.00 mm von jedem Kreis jeweils zwei Stanzen genommen, sodass man von jeder Karte insgesamt zehn Stanzen erhielt. Diese zwei Proben eines jeden Kreises wurden anschließend in die 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) gegeben. Wichtig hierbei war vor allem, genau zu notieren, von welchem Kreis auf welcher Karte welche Probe stammte und zudem zwischen jedem Kreis die Spitze des Kolbens mit 70%igem EtOH zu reinigen, um so eine Verunreinigung zu vermeiden. Zusätzlich wurde nach jeder fünften Karte die Schneidematte mit 70%igen EtOH abgewischt.

Im zweiten Schritt erfolgte die eigentliche Metaboliten-Extraktion. Zu jedem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 80 µg der Extraktionsflüssigkeit gegeben. Im Anschluss wurden für zehn Minuten bei 4°C die Proben mit möglichst maximaler Geschwindigkeit gevortext (Eppendorf ThermoMixer) und bei 16.000xg für etwa zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Nun wurden 60 µl des Überstandes in die Gaschromatograph-Fläschchen befüllt, ohne dabei die ausgestanzten Filterkarten zu berühren. Die Proben wurden bei -4 °C für drei Stunden verdampft (Labonco CentriVap) und anschließend 25 Minuten auf 23 °C erwärmt, um Kondensation zu verhindern. Um eine Einordnung der analysierten Stoffe vornehmen zu können, wurden nun Kalibrierungskurven erstellt. Neben den bereits aufgeführten internen Standards Ribitol und Glutarsäure wurden Glucose, Alanin und Milchsäure als externe Standards verwendet. Hierzu wurden zunächst drei Stammlösungen angesetzt, von denen jeweils die spezifische Konzentration bekannt war.

- Stammlösung Glucose:

1 ml D-(+)-Glucose (c = 120 mmol/l) → 21,62 mg Glucose gelöst in 1 ml MilliQ-Wasser

- Stammlösung Alanin (c = 60 mmol/l) → 5.35 mg gelöst in 1 ml MilliQ-Wasser

→ Verdünnung 1:10: 100 µl L-Alanin-Stammlösung (c = 60 mmol/l) + 900 µl MilliQ-Wasser

- Stammlösung Milchsäure → 1 ml Natrium L-Laktat (c = 60 mmol/l)

→ 6,72 mg gelöst in 1ml MilliQ-Wasser

Aus diesen Lösungen sowie weiterem MilliQ-Wasser wurde die Lösung „Mix 1“ hergestellt, wodurch die Stammlösungen jeweils im Verhältnis 1:3 verdünnt wurden. In sieben weiteren Schritten erfolgten weitere Verdünnungen auf jeweils auf 75 % (Mix 1, Mix 2, Mix 3, Mix 4, Mix 5, Mix 6, Mix 7, Mix 8). Die Konzentrationen der einzelnen Verdünnungen sind Tabelle fünf zu entnehmen.

Tabelle 5: Vorbereitung der Kalibrierungskurven:

	Glucose (mmol/l)	Alanin (mmol/l)	Milchsäure (mmol/l)		MilliQ- Wasser
--	-----------------------------	----------------------------	--------------------------------	--	---------------------------

Mix 1	40	2	20	500 µl Stammlösung Glucose (c = 120 mmol/l) 500 µl Stammlösung Alanin (c = 6 mmol/L) 500 µl Stammlösung Milchsäure (c = 60 mmol/L)	
Mix 2	30	1.5	15	750 µl Mix 1	250 µl
Mix 3	22.5	1.13	11.25	750 µl Mix 2	250 µl
Mix 4	16.88	0.84	8.44	750 µl Mix 3	250 µl
Mix 5	12.66	0.63	6.33	750 µl Mix 4	250 µl
Mix 6	9.49	0.47	4.75	750 µl Mix 5	250 µl
Mix 7	7.12	0.36	3.56	750 µl Mix 6	250 µl
Mix 8	0	0	0	0 µl	1000 µl

Im nächsten Schritt wurde von jeder Lösung (Mix 1 bis 8) 25 µl auf jeden einzelnen Punkt einer einzelnen Trockenblutkarte (ebenfalls 903 Protein Saver Card) pipettiert, um acht Filterkarten für zehn vollständige Kalibrierungskurven zu erhalten. Die Trockenblutkarten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und wie die Blutproben extrahiert (siehe oben).

Die Proben wurden sowohl quantitativ als auch qualitativ mittels Gaschromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung erfasst (GS/MS). Hierunter versteht man die Kopplung eines Gaschromatographen, durch den das Stoffgemisch in seine Einzelsubstanzen aufgetrennt wird, mit einem Massenspektrometer, mit dem die einzelnen Substanzen identifiziert und quantifiziert werden können (k-labor, 2020; Justus-Liebig-Universität, 2021).

Da im Gaschromatographen nur verdampfbare Substanzen gemessen werden können, war eine Derivatisierung der Verbindungen erforderlich, wodurch zum einen ihre Polarität herabgesetzt und ihre Flüchtigkeit infolgedessen erhöht, zum anderen aber auch die thermische Zersetzung durch Erhöhung der thermischen Stabilität herabgesetzt wurde. Zur Derivatisierung wurden die Proben (durch einen Autosampler) in 15 ml Pyridin gelöst, welches Methoxyaminhydrochlorid (c = 20 mg/ml) enthielt und bei 45 °C unter Schütteln inkubiert. Nach 90 Minuten wurden 20 µl N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) zugefügt. Die Reaktionstemperatur lag bei 45 °C und es wurde ebenfalls unter Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Die eigentliche Derivatisierung fand in zwei Schritten statt: Zunächst reagierte Methoxyaminhydrochlorid mit den Carbonylgruppen eines Stoffgemischs und es entstanden Oxim-Derivate (funktionelle Gruppe = C=N-OH). Dies führte zur Stabilisierung der Stoffe, wodurch die Bildung multipler Keto-Enol-Tautomere sowie die Bildung zahlreicher Acetal- oder Ketalstrukturen verhindert wurde (beispielsweise bei Pyruvat). Die Methoxyaminierung half

also, die Anzahl der reduzierenden Zuckerderivate zu reduzieren, indem nur jeweils zwei verschiedene Derivate (E- und Z-Form) einer Verbindung entstanden.

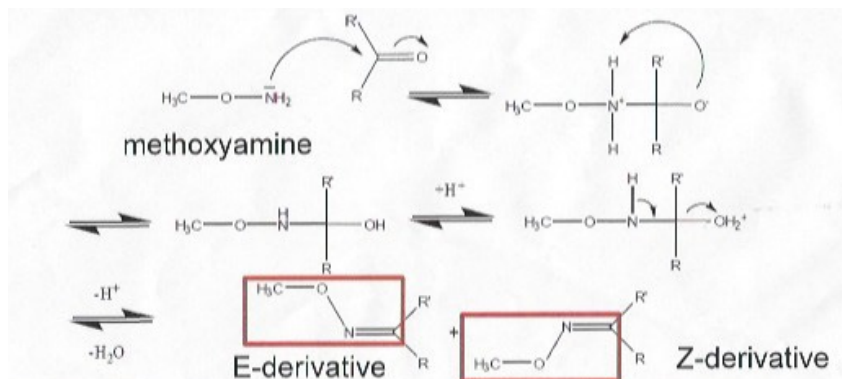


Abbildung 15: Stabilisierung der Derivate nach Methoxyaminierung in E- und Z-Form, Quelle: MISB Analytics Tutorial

Durch die Zugabe von MSTFA konnte eine Verschiebung aktiver Wasserstoffatome in den Verbindungen in -H, -COOH, -PO₄H₂, -NH und -H Gruppen erreicht werden, wodurch Silyl-Derivate (N-Methyl-N(-Trimethylsilyl)-trifluoroacetamide = TMS) entstanden, die ebenfalls eine verringerte Polarität und eine erhöhte Flüchtigkeit aufwiesen (Urbach, 2012).

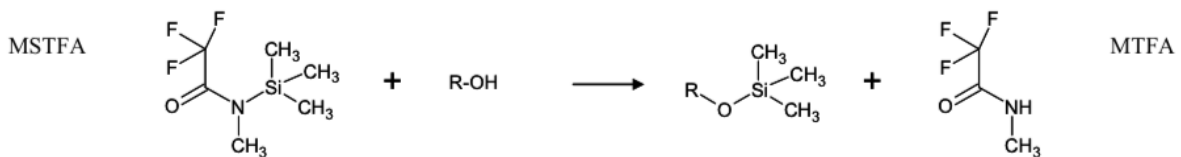


Abbildung 16: Beispielhafte Reaktion von MSTFA mit einem Alkohol unter Bildung von TMS, Quelle: Urbach D

Nach diesen einzelnen Extraktionsschritten konnten die Proben – ebenfalls unter standardisierten Bedingungen – im Gaschromatographen aufgetrennt und anschließend im Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert werden.

Wir verwendeten den Agilent 7890A Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies. Dieser besteht wie alle üblichen Gaschromatographen aus drei wesentlichen Bauteilen: Injektor, Trennsäule im GC-Ofen und Detektor.

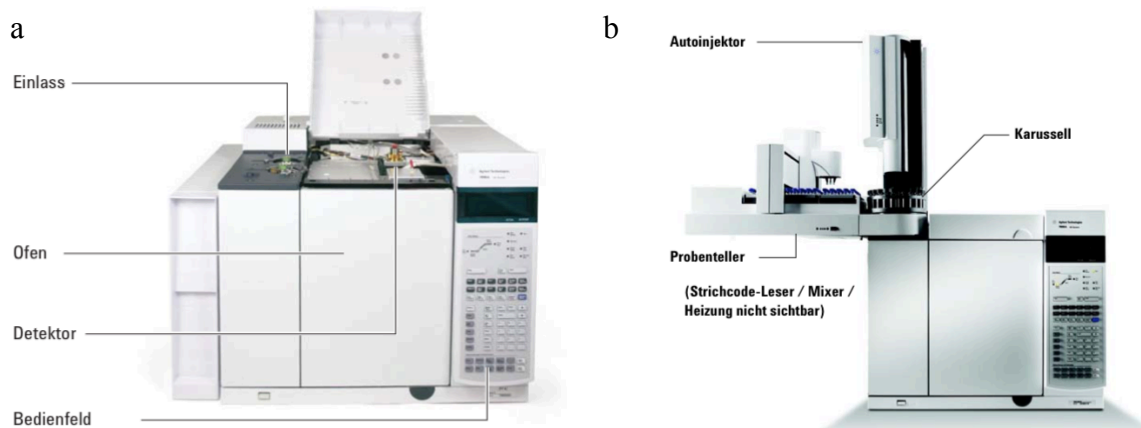


Abbildung 17 a und b: Aufbau eines Gaschromatographen mit Einlass, Ofen und Detektor (a) und Autoinjektor (b), Quelle: Agilent Technologies

Am Einlass des Injektors wurden die Proben mithilfe eines automatischen Flüssigprobengebers (Automatic Liquid Sampler, ALS) in den Gaschromatographen eingespritzt und beheizt. Auf diese Weise sollte eine vollständige und möglichst schnelle Verdampfung der Probe gewährleistet werden (siehe oben). Durch ein Trägergas (Helium) wurden die nun gasförmigen Verbindungen in die Trennsäule (= Kapillare) transportiert und in ihre Einzelsubstanzen aufgetrennt. Nach Durchlaufen der Kapillare wurden die Substanzen anschließend mittels Massenspektrometer identifiziert und vor allem quantifiziert. Wir verwendeten das Agilent 5975C MSD Massenspektrometer, ebenfalls von der Firma Agilent Technologies, welches aus Ionenquelle, Analysator und Detektor bestand. Als Ionenquelle diente eine Glühkathode. Durch die relativ hohe Energie des von der Kathode ausgehenden Elektronenstrahls (70 eV) wurden die Moleküle zudem ionisiert und – bevorzugt an den niederenergetischen Verbindungen – aufgespalten. Die ionisierten und aufgespaltenen Moleküle sowie deren Fragmente wurden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und in dem Analysator, der die einzelnen Ionen gemäß ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis m/z sowie ihrem Fragmentationsmuster sortierte, analysiert. Mittels der Ermittlung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses m/z sowie der stoffspezifischen Fragmentierung der Moleküle war eine Identifizierung der Substanzen im Detektor möglich.

Da in der Studie Substanzen (Ribitol, Alanin, Milchsäure, Glucose-Isotopolog $U^{12}C^6$, Glucose-Isotopolog $U^{13}C^6$) gesucht wurden, deren Fragmentationsmuster sowie deren m/z -Verhältnis bekannt waren und deren Werte aus Datenbanken gewonnen werden konnten, verzichteten wir auf eine vollständige Aufzeichnung des Massenscans und führten die Messungen im SIM-Mode (single ion monitoring) durch. Hierbei wurden nur die für die gesuchten Substanzen spezifischen Ionen gemessen, wodurch eine deutlich höhere Sensitivität der Messung und damit die Möglichkeit der Quantifizierung erreicht wurden (Rudloff, 2019).

Das Massenerhaltungsgesetz besagt, dass in chemischen Reaktionen die Masse der Edukte (= Ausgangsstoffe), der Masse der Produkte (= Reaktionsprodukte) entspricht (Whitaker, 1975). Die C^{13} -Isotope der initial aufgenommenen markierten Glucose-Isotopologe bleiben demnach bei Glykolyse erhalten und sind zu einem gewissen Prozentsatz im Blut nachweisbar. Mittels Differenzierung und Wahrscheinlichkeitsrechnung wird der Fluss der aufgenommenen Glucose erfassbar. Die Glucose durchläuft den Cori-Zyklus (Abschnitt 1.1.3). Das gebildete Laktat aus der aufgenommenen Glucose enthält nun zu 50% ein C^{13} -Isotop. Der im GC-MS gemessene Anteil der unmarkierten Laktatmoleküle (L3), sowie der markierten Laktatmoleküle (C3) und markierten Glucosemoleküle (C6) kann nun in einem Zeit-Konzentrationsdiagramm dargestellt werden (Abbildung 19 b). Mittels Differenzierung kann dadurch der Fluss der aufgenommenen markierten Glucose mathematisch erfasst werden (Abbildung 19 a): Ab einem bestimmten Zeitpunkt werden im GC-MS nicht nur Laktatmoleküle aus C^{12} Isotopen erfasst, sondern auch Laktatmoleküle mit einem C^{13} -Isotop (Prozess der Glykolyse). Mit zunehmender Dauer der Nahrungskarenz wird der Körper jedoch bestrebt sein, das Energiedefizit durch möglichst schnell verfügbare Energiereserven zu gewinnen. Die in der Glykolyse entstandenen, im Blut zirkulierenden Laktatmoleküle werden nun erneut zur Glucosebildung genutzt (Gluconeogenese). Diese neue gebildete Glucose enthält ebenfalls zu einem gewissen Prozentsatz C^{13} -Isotope, die im GC-MS gemessen werden können. Auf diese Weise wird der Fluss der Glucose erfassbar.

3.3 Chemische Analytik: Messen der Metaboliten im Blut durch Gaschromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung (GS-MS)

Die vorliegende Arbeit untersucht verschiedene niedermolekulare Stoffwechselfvorgänge (= Stoffwechselfvorgänge, deren Substrate und Produkte eine molekulare Masse von $800 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ nicht überschreiten), insbesondere des Glucosehaushaltes und die Erfassung der daraus resultierenden Metaboliten (Metabolomics = Gesamtheit der Stoffwechselfvorgänge einer Zelle).

Nach einer publizierten Methode (Krämer, Jäger, Trezzi, Jacobs, Hiller, 2018; Trezzi et al., 2017) können alle Parameter des Glucosestoffwechsels aufgrund ihres Massenunterschiedes mittels Massenspektrometrie mit Gaschromatographie-Kopplung erfasst werden und dadurch Rückschlüsse auf den Glucoseverbrauch, aber insbesondere auch auf die endogene Glucosebildung eines jeden Patienten, gezogen werden.

Um den Glucosestoffwechsel in vivo untersuchen zu können, werden zwei Gramm einer nicht radioaktiv markierten Glucose (Isotopolog $[U^{13}C^6]$) verabreicht. Diese enthält zu 99 % ^{13}C Isotope (= Nuklide = Atomsorten eines Elements mit gleicher Kernladungszahl, aber mit unterschiedlicher Massenzahl, entstanden durch eine unterschiedliche Anzahl an neutralen Ladungen (= Neutronen)) (Vogel, Internetseite Chemie.de, 2019). Mit ihrem Molekulargewicht von 186,11 g/mol unterscheidet sie sich um 5.954 g/mol (Krämer, Jäger, Trezzi, Jacobs, Hiller, 2018). Dieses Glucose-Isotopolog durchläuft im menschlichen Körper ebenfalls den Cori-Zyklus (Abbildung 18). Seine Metaboliten enthalten nun ebenfalls die „markierten“ Kohlenstoffatome. Des Weiteren entstehen nun in der Gluconeogenese neue Zuckermoleküle: Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, aus welchen Kohlenstoffatomen die neue Glucose gebildet wird: Zum einen kann ein neuer C^6 -Zucker aus zwei nicht markierten Laktatmolekülen gebildet werden. Diese Konstellation wird ein Großteil der neu gebildeten Glucose ausmachen, da es im menschlichen Körper einen Großteil an Reserven gibt, aus denen nicht markiertes Substrat (beispielsweise Glykogen) für die Gluconeogenese bereitgestellt werden kann. Zum anderen werden Glucosemoleküle gebildet, die sowohl einen markierten C^3 - als auch einen nicht markierten C^3 -Anteil aufweisen und zu einem sehr kleinen Anteil auch Glucosemoleküle, die vollständig aus markierten Kohlenstoffatomen bestehen, auch wenn deren Anteil sehr gering ist.

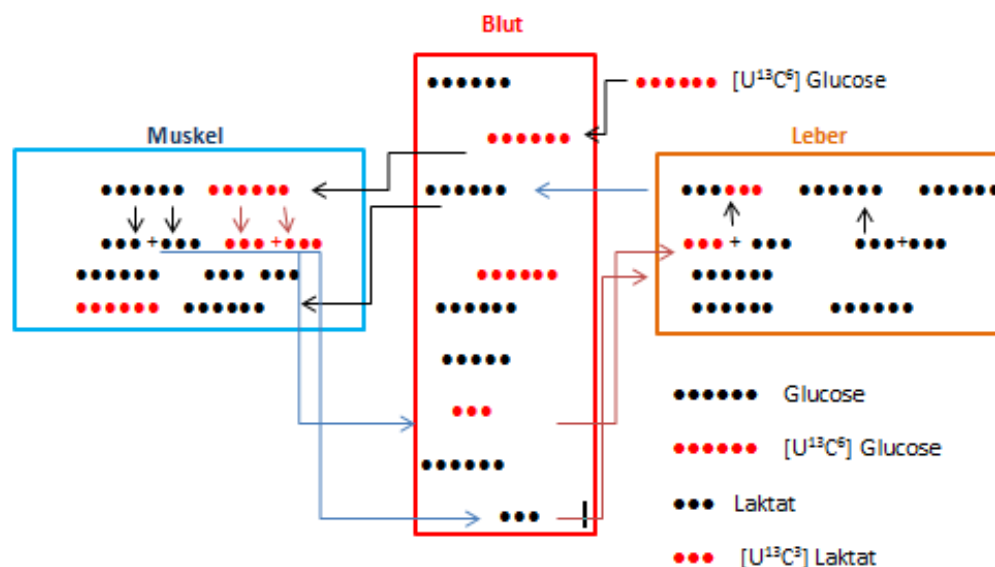


Abbildung 18: Cori-Zyklus-Flüsse. Nach der oralen Aufnahme der markierten Glucose besteht der „Glucosepool“ im Blut aus nicht markierten und markierten (nicht radioaktiven, in der Natur vorkommenden) Glucose-Isotopologen. Durch Glykolyse in Organen (z. B. Muskeln) wird die Glucose in zwei markierte Laktatmoleküle umgewandelt. Diese gelangen wieder zurück in den Blutkreislauf dienen der Leber wieder als Substrat für neue Glucosemoleküle

Die Grundlage der zu ermittelnden dynamischen Parameter des Glucosemetabolismus bildet dabei der in Abbildung 18 dargestellte Fluss der aufgenommenen Glucose durch Glykolyse,

Gluconeogenese und Glykogenolyse (Cori-Zyklus), sowie die entsprechende Isotopenmarkierung der aufgenommenen Glucose (siehe Abschnitt 3). Dieser wird in unserer Studie durch eine Modellierung unter Zuhilfenahme von Differentialgleichungssystemen annähernd erfasst (Abbildung 19 a). Durch Nahrungskarenz und Absenken der Nüchtern-Plasmaglucose wird durch Glykogenolyse und Gluconeogenese (= Glucoseproduktion) erneut Glucose gebildet. Diese neue Glucose besteht nicht nur aus markierten ^{13}C Isotopologen, sondern enthält auch unmarkierte ^{12}C -Isotopologe (= Hauptanteil).

In der Annahme, dass die aufgenommene Glucose vollständig verstoffwechselt wird (keine Glucosurie), lässt sich der individuelle Fluss der Glucose durch mathematische Differenzierung ermitteln (Abbildung 19 a).

Als Parameter des Glucosestoffwechsels wurden zu Beginn der Studie vier Größen definiert, welche zunächst bei jeder Untersuchung mittels GC-MS gemessen und mittels mathematischer Differenzierung berechnet wurden. Bei den ersten beiden Parametern handelt es sich um die mittlere Glucoseproduktion und die mittlere Glucosekonzentration: Die mittlere Glucosekonzentration gibt die durchschnittliche Glucosekonzentration auf jeweils einer zu einem bestimmten Zeitpunkt T0 bis T8 gemessenen Filterkarte (Abbildung 19 b) an. Unter der mittleren Glucoseproduktion dagegen versteht man die während der Untersuchung pro Minute und Kilogramm entstandene Glucose aus diversen Stoffwechselvorgängen (Glykogenolyse, Gluconeogenese). Sie erfasst die sowohl aus der Glykogenolyse entstandenen (unmarkierten) Glucosemoleküle, als auch die aus der Gluconeogenese hervorgegangene teils mit ^{13}C -Isotopologen markierten Glucosemoleküle. Der dritte zu messende/erreichende Parameter ist die mittlere Laktatproduktion. Sie beschreibt das während der Untersuchung pro Minute und Kilogramm entstandene Laktat aus Glykogenolyse und Glykolyse. Für die Bildung eines einzelnen Glucosemoleküls in einer bestimmten Zusammensetzung (G6 = Glucose aus sechs ^{13}C -Isotopologen, G3 = Glucose aus drei ^{13}C -Isotopologen, G0 = Glucose aus sechs ^{12}C -Isotopologen beziehungsweise aus null ^{13}C -Isotopologen) besteht eine bestimmte Wahrscheinlichkeit P%. Mit dieser Wahrscheinlichkeit, sowie mit den oben dargestellten Messgrößen (Glucoseproduktion, Glucosekonzentration, Laktatproduktion) kann nach Trezzi et al. die Gluconeogeneserate ermittelt werden Methode (Krämer, Jäger, Trezzi, Jacobs, Hiller, 2018; Trezzi et al., 2017) (Abbildung 19 a, b).

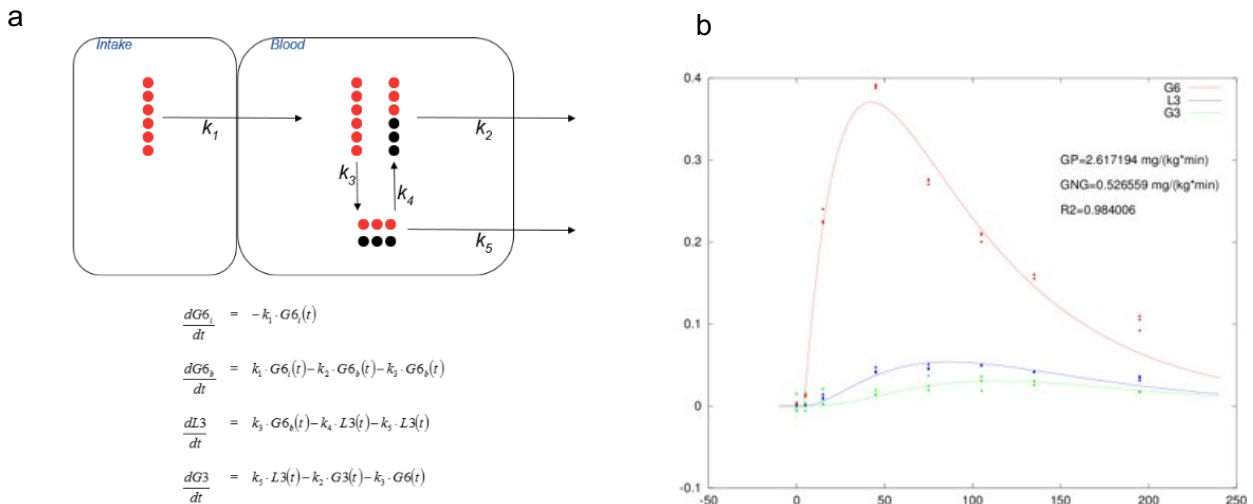


Abbildung 19: Differenzialgleichungssystem zur Differenzierung des Cori-Zyklus (a) und Verlauf der Laktatkonzentration (L3, blaue Linie), sowie der markierten Laktatmoleküle (C3, grüne Linie) und markierten Glucosemoleküle (C6, rote Linie) über die Zeit (b). Aus diesen Daten kann die Gluconeogenese berechnet werden, Quelle: Trezzi J

In Abbildung 19 ist der Fluss der markierten Glucose im Blut nach Aufnahme schematisch (a) und dynamisch (b) dargestellt. Mittels Gaschromatographie mit Massenspektroskopie-Kopplung (GS-MS) lässt sich der Anteil der unmarkierten Laktatmoleküle (L3), sowie der markierten Laktatmoleküle (C3) und markierten Glucosemoleküle (C6) zu dem jeweiligen Messzeitpunkt berechnen und über die Zeit darstellen (Abbildung 19 b). Dieser so entstandene "Glucose-Fluss" kann nach Trezzi et al. mittels Differentialgleichungssystem erfasst werden.

3.4 Erfassung und Auswertung der Patientendaten und Messergebnisse mittels REDCap®

Um die individuellen Patientendaten sowie die einzelnen Messungen jederzeit abrufbar und vergleichbar zu machen, wurden sie digitalisiert. Wir verwendeten hierzu die sichere Webanwendung REDCap® (= Research Electronic Data Capture), welche speziell auf den Aufbau und die Verwaltung von Online-Umfragen und Datenbanken spezialisiert ist, um die Online- oder Offline-Datenerfassung für Forschungsstudien und Operationen zu unterstützen. Das REDCap®-Konsortium besteht aus Tausenden von aktiven institutionellen Partnern in über hundert Ländern (REDCap®, 2019; Harris et al., 2009). REDCap® wurde von der Clinical Data Interchange Standards Consortium zugelassen (RISC, 2020).

REDCap® wurde 2004 durch die Vanderbilt-Universität in Nashville im US-Bundestaat Tennessee entwickelt. Die Idee war es, ein anwenderfreundliches Datenerfassungsprogramm zu entwickeln, welches den Forschern ermöglicht, ohne spezielles Hintergrundwissen oder technische Erfahrung eine Plattform bedienen zu können, auf welcher sie ihre Daten benutzerauthentifiziert und rollenbasiert sichern und speichern können und mit welcher der Austausch

und Export in andere Datenverarbeitungssysteme durchführbar sind. Anfangs stand die Software nur den Wissenschaftlern der Vanderbilt-Universität zur Verfügung, bis schließlich 2006 das REDCap®-Konsortium entstand, dem sich immer mehr internationale Organisationen anschlossen. Die Vanderbilt-Universität hat jedoch bis heute die Lizenzrechte inne (REDCap®, 2019; Harris et al., 2009).

In REDCap®, welches in englischer Sprache zu verwenden ist, haben die Forscher die Möglichkeit, über einen Nutzerzugang mehrere Projekte zu bearbeiten: Nach Anmeldung auf der Website kann man direkt das Projekt wählen, an dem man gerade arbeiten möchte. Zudem kann man über fünf weitere Spalten direkt die Anzahl der Studienteilnehmer (= Record), die Anzahl aller erfassten Merkmale pro Aufzeichnung (= Field), die Anzahl der Klassen, in welche die Merkmale eingruppiert wurden (= Instrument), sowie die Darstellungsart (= Type) und den Bearbeitungsstatus (= Status) erkennen. Unsere Studie erhielt den Projektnamen „DBSGLUC Production“. Es nahmen 59 Personen teil, von denen – soweit es uns möglich war – 220 Merkmale, eingeteilt in sechs Klassen (anthropometrische Daten, Lifestyle/Lebensführung, Medikation, Blutzuckerwerte während der Untersuchung, Laborparameter, Glucosemessungen im Labor), untersucht wurden.

Nach der Auswahl des Projektes öffnet sich ein „Arbeitsplatz“. Von hier aus erhält man nicht nur einen Überblick über andere zugangsberechtigte Nutzer, sondern es kann auch eine Auswahl der verschiedenen Funktionen der Software erfolgen: die Datensammlung (= Data Collection), deren Verwendung bzw. Anwendung (= Application) sowie die einzelnen Auswertungen aus den entsprechenden Funktionen (= Reports):

1. Data Collection

Die Gruppe der Datensammlungsfunktionen besteht aus drei verschiedenen Tools. Neben der Möglichkeit einer Zeitplanerstellung (→ Feld „Scheduling“) und der Möglichkeit, neue Patienten hinzuzufügen bzw. eingetragene Merkmale schon vorhandener Patienten zu bearbeiten (→ Feld „Add/Edit Records“), gibt es hier noch die Möglichkeit, eine Übersicht über alle eingetragenen Patienten, anhand derer man direkt die Vollständigkeit erhobener klinischer Parameter einzelner Klassen eines jeden Patienten erkennen kann, zu erhalten (→ „Record Status Dashboard“).

Die einzelnen „Instruments“ – vor Beginn des Projekts von uns definiert – enthielten sowohl die klinisch gesammelten Daten als auch die Blutzuckermessungen während der Untersuchung und die Auswertungen aus den Labormessungen.

Auf diese Weise erhielten wir eine übersichtliche Datensammlung unserer Patientendaten, die jederzeit um Patienten, aber auch um zusätzliche Werkzeuge (= Instruments), erweitert werden konnte.

2. Application

Die Anwendungsmöglichkeiten der Software werden in fünf separaten Tools dargestellt: Während uns das Werkzeug „Field Comment Log“ eine Ansicht und Bearbeitung aller kommentierten Merkmale ermöglicht, erlaubt es uns die Funktion „Data quality“, ebenfalls eine Überprüfung unserer Daten auf Vollständigkeit vorzunehmen. Auf diese Weise lassen sich jedoch im Gegensatz zum „Record Status Dashboard“ auch fehlende Merkmale einzelner Klassen direkt aufzeigen. Es lässt sich hier also genau definieren, nach welchem fehlenden Merkmal gesucht werden soll, beispielsweise, wenn Patienten gefiltert werden sollen, bei denen der erste Blutzuckerwert der Untersuchung (und nicht ein anderer) fehlt. Des Weiteren gibt es bei RedCap® auch die Möglichkeit, Daten zu importieren („Data Import Tool“) und zu vergleichen („Data Comparison Tool“). Wichtig bei Letzterem ist jedoch zu erwähnen, dass wir nur jeweils maximal zwei Patienten mit der Software direkt vergleichen können. Da sich die Arbeit jedoch vor allem auf die Unterscheidung in der Gluconeogeneserate bezüglich verschiedener Merkmale (beispielsweise Medikation, BMI, Alter, Geschlecht) konzentrierte, waren für uns eine Bildung einzelner Gruppen und deren direkter Vergleich notwendig. Zentraler Baustein unseres Projektes war deshalb vor allem das Werkzeug zur Erstellung von Berichten, Statistiken sowie deren Export („Data Exports, Reports, and Stats“). Insgesamt lässt sich die Kohorte nach 220 Merkmalen einzeln und in Kombination in Gruppen einteilen, die dann exportiert und extern verglichen werden können. Wir verwendeten in der Auswertung stets SPSS und Excel.

3. Reports

Die dritte Gruppe in der Liste der REDCap®-Funktionen umfasst sämtliche zuvor von den Forschern erstellten Berichte, die auf diese Art und Weise schnell und einfach abgerufen werden können. Nach der Auswahl des Berichts kann dieser tabellarisch oder unter der Anwendung „Application“ in Diagrammform dargestellt, gedruckt, bearbeitet und in oben bereits erwähnte Statistikprogramme exportiert werden.

3.5 Statistische Auswertung

Nach Export des erstellten „Reports“ aus REDCap® in dem Statistikprogramm SPSS (IBM, Version 25) wurden die Datensätze der so erstellten Gruppen im Hinblick auf Unterschiede der auf mathematischen Differenzierung nach Hiller et al. beruhenden und mittels Massenspektrometrie errechneten Werte zur Bestimmung der mittleren Laktatproduktion, der mittleren

Glucosekonzentration und Glucoseproduktion sowie der Gluconeogeneserate verglichen (Abschnitt 4.3), Die Analyse wurde immer sowohl in der gesamten Kohorte als auch in den einzelnen Gruppen der Typ-2-Diabetiker und Kontrollpersonen geschlechtsspezifisch durchgeführt, um ggf. klinisch erhobene Einflussfaktoren auf den Glucosemetabolismus zu finden, welche mittels GC-MS erfasst werden können.

Eventuell auftretende Unterschiede in den einzelnen Gruppen wurden auf Signifikanz überprüft. Für normalverteilte Merkmale mit Varianzhomogenität verwendeten wir den T-Test für unverbundene Stichproben und nahmen ein Signifikanzniveau von $p = 5\%$ an. Zur Überprüfung auf Varianzhomogenität verwendeten wir den Levene-Test, auch mit einem Signifikanzniveau von 5% , und zur Überprüfung auf Normalverteilung den Shapiro-Wilk-Test mit einem Signifikanzniveau ebenfalls von 5% . Nicht normalverteilte Merkmale untersuchten wir mit dem Mann-Whitney-Test. Bei nicht gruppierbaren, metrischen Variablen wie beispielsweise BMI, Erkrankungsdauer oder Alter führten wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

Neben der Untersuchung nach Unterschieden in den mittels Massenspektrometrie gemessenen und mittels mathematischer Differenzierung errechneten Werte wurde auch nach signifikanten Unterschieden zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen bezüglich der klinisch gesammelten – in REDCap® erfassten – Merkmale gesucht (Abschnitt 4.4).

Um einen Vergleich der beiden Messmethoden (Glucosemessgerät vs. Messung mittels GC-MS) vornehmen zu können, wurde der Mittelwert der mittels GC-MS gemessenen mittleren Glucosekonzentrationen über die gesamte Untersuchungsdauer, sowie der Mittelwert der mittels Glucometer gemessenen mittleren Glucosekonzentrationen über die gesamte Untersuchungsdauer gebildet. Des Weiteren erfolgte eine direkte Gegenüberstellung der Blutglucosekonzentration zu den einzelnen Zeitpunkten (jeweils gemessen mittels Glucometer bzw. mittels GC-MS). Hierzu konnten wir weitere elf Patienten rekrutieren, welche bereit waren, lediglich zum Zwecke dieses Datenvergleichs an der Studie teilzunehmen (Abschnitt 4.2).

Von einer Vielzahl der gemessenen (mittlere Glucoseproduktion, mittlere Laktatproduktion und mittlere Glucosekonzentration) und errechneten (mittlere Gluconeogeneserate) kann angenommen werden, dass sie untereinander korrelieren und daher einen ähnlichen Einfluss auf den Glucosemetabolismus haben. Hierdurch entsteht nach Leyer et al. sehr viel redundante Information (Leyer I, Wesche K, 2007), zu deren Verarbeitung eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt wurde. Die Hauptkomponentenanalyse (eng. principal component(s) analysis) ist eine Methode zur linearen Transformation der Variablen, sodass möglichst wenig neue

Variablen die relevante Information beschreiben und die neuen Variablen orthogonal und damit unkorreliert sind. Es dient der explorativen Datenanalyse zur Entdeckung von Zusammenhängen in 2D-oder 3D-Plots. Dadurch werden irrelevante Information wie Rauschen oder die Gefahr von Artefakten (beispielsweise Ausreißer) minimiert (Badertscher M, 2020). Auch die Clusteranalyse (als Sonderform der Hauptkomponentenanalyse) dient als exploratives Verfahren dazu, Datensätze hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit in Gruppen einzuteilen. Sie basiert auf der Berechnung eines Ähnlichkeitsmaßes: Durch die für jedes zu vergleichende Merkmal und alle Daten errechnete Ähnlichkeit, kann eine Aussage darüber getroffen werden, welche Daten sich innerhalb der Datenmenge am meisten ähneln und welche sich am meisten unterscheiden (Wuttke L, 2020). Auf diese Weise können Gruppen (= Cluster) gebildet werden. Die Mitglieder eines einzelnen Clusters ähneln sich hinsichtlich bestimmter Eigenschaften ihres Glucose-Flussprofils untereinander, unterscheiden sich aber in ihrer Merkmalsausprägung von einem weiteren Cluster. Unter der Annahme, dass der Glucosemetabolismus durch die gemessene mittlere Gluconeogeneserate beziehungsweise mittlere Glucoseproduktion erfasst wird, führten wir abschließend ein Clustering durch.

4. Ergebnisse

4.1 Diagnostik der Glucosetoleranz mittels Hauptkomponentenanalyse der mittels Point-of-Care-Testung gewonnenen Flüsse der Glucose

Im Resultat konnte ein Verfahren entwickelt werden, das zunächst mittels Point-of-Care-Diagnostik und anschließender mathematischer Differenzierung den Fluss der aufgenommenen Glucose bzw. ihrer Metaboliten erfassen kann.

Um in der Vielzahl der massenspektrometrisch erfassten Datenmesspunkte ein Muster ähnlicher Verläufe beziehungsweise Ballung von Messpunkten unter bestimmten Bedingungen explorativ zu entdecken, wurde eine Clusteranalyse durchgeführt. Hierbei dienten die angenommene errechnete mittlere Gluconeogeneserate und die gemessene mittlere Glucoseproduktion als Clustervariablen. Unter der Annahme, dass der Glucosemetabolismus durch die mittlere Gluconeogeneserate und die Glucoseproduktion relativ präzise erfasst wurden, konnten im Resultat zwei Cluster identifiziert werden (Abbildung 20): In Cluster eins (rot dargestellt) zeigten die Patienten höhere Glucosekonzentrationen und Glucoseproduktion als in Cluster zwei (grün dargestellt). Korrespondierend dazu bestand Cluster eins fast vollständig aus Diabetikern, Cluster zwei aus Nicht-Diabetikern. Lediglich ein männlicher Nicht-Diabetiker (KIT-ID: 2017022213) zeigte ebenfalls eine erhöhte Glucoseproduktion und wurde Cluster eins zugeordnet. Dieser entwickelte doch zwei Jahre nach Versuchsdurchführung einen gestörten Glucosemetabolismus (= Prädiabetes).

Dementsprechend ist es gelungen, durch die Ermittlung der nach Aufnahme der markierten Glucose modellierten Metabolitenflüsse Patienten mit beziehungsweise ohne Diabetes mellitus anhand der ermittelten Flüsse der Glucose zu differenzieren. Die mittlere Glucoseproduktion erfasst dabei die während der Untersuchung pro Minute und Kilogramm entstandene Glucose u.a. aus Glykogenolyse und auch Gluconeogenese. Sie erfasst die sowohl aus der Glykogenolyse entstandenen (unmarkierten) Glucosemoleküle als auch die aus der Gluconeogenese hervorgegangene teils mit ^{13}C Isotopologen markierten Glucosemoleküle (siehe Abschnitt 3.3). Die mittlere Gluconeogeneserate dagegen erfasst nur die aus der Gluconeogenese entstandenen (unmarkierten) Glucosemoleküle und die aus der Gluconeogenese hervorgegangene teils mit ^{13}C Isotopologen markierten Glucosemoleküle und nicht die aus anderen Stoffwechselforgängen hervorgegangenen Glucosemoleküle.

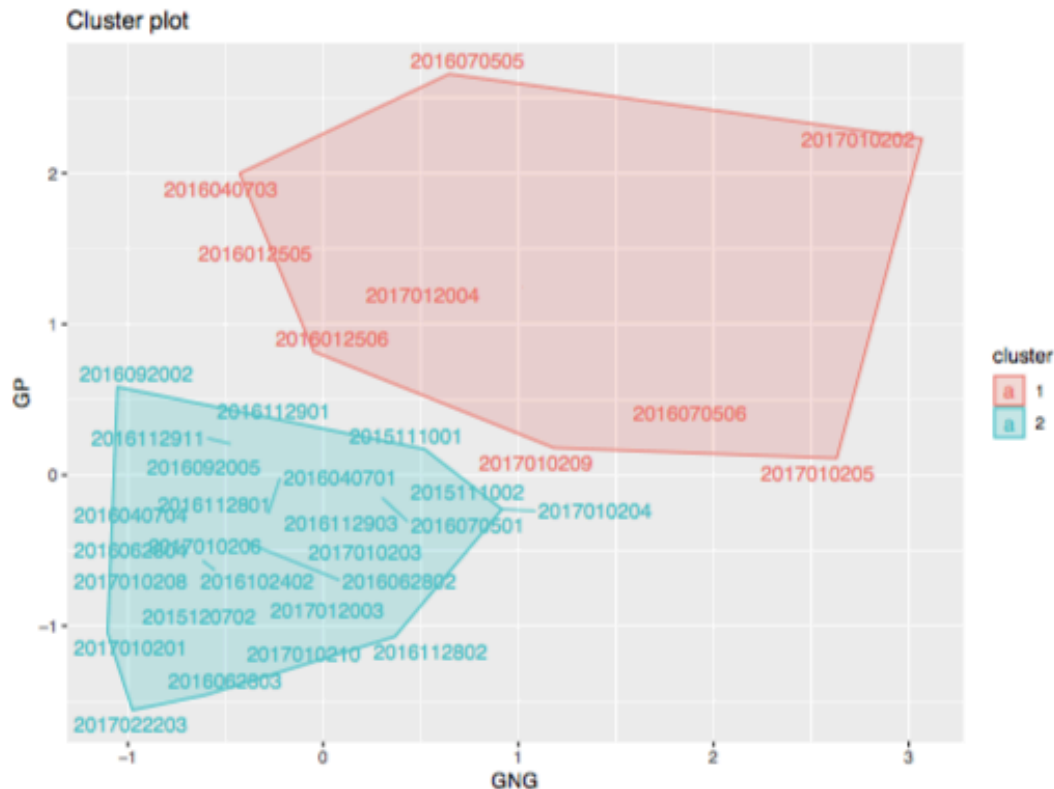


Abbildung 20: Clustering der Patienten je nach Gluconeogeneserate bzw. Glucoseproduktion. Alle Patienten aus Cluster eins (grün) waren Kontrollpersonen. In Cluster zwei (rot) sind nur Typ-2-Diabetiker dargestellt. Als Clustervariablen wurden die mittlere Glucoseproduktion (GP) und die mittlere Gluconeogeneserate (GNG) verwendet. Unter der mittleren Glucoseproduktion versteht man die während der Untersuchung pro Minute und Kilogramm entstandene Glucose aus diversen Stoffwechselfvorgängen (Glycogenolyse, Gluconeogenese). Sie erfasst, die sowohl aus der Glykogenolyse entstandenen (unmarkierten) Glucosemoleküle, als auch die aus der Gluconeogenese hervorgegangene teils mit ^{13}C Isotopologen markierten Glucosemoleküle (siehe Material und Methodik, 3.3)

Auch wenn wir aufgrund fehlender Validierungsoptionen nicht sicher beweisen können, dass wir tatsächlich die Gluconeogenese erfasst haben, zeigt die Korrelation beider Messmethoden (siehe Abschnitt 4.2) an, dass die Glucosemessungen mittels GC-MS den Messungen mittels Glucometer in etwa entsprechen. Somit kann angenommen werden, dass die Ausgangsvariablen der vorgestellten Flussanalysen den mit Glucometer gemessenen Glucosewerten nahekommen. **Unter dieser Annahme** wurden die Probanden zusätzlich (neben der Clusteranalyse) nach Unterschieden in der mittels GC-MS ermittelten mittleren Gluconeogeneserate, Laktatproduktion, Glucoseproduktion und Glucosekonzentration der Probanden in Abhängigkeit der in REDCap® erfassten Merkmale verglichen.

Demnach ist es aufgrund der Messungen zwar nicht möglich, die Gluconeogenese exakt zu determinieren, aber die Dynamik des Flussprofils, nicht die absolute Konzentration der Glucosemoleküle zu den einzelnen Zeitpunkten, erlaubt es, in der vorliegenden Arbeit eine Differenzierung zwischen Diabetikern und Probanden vorzunehmen und eine gestörte Glucosetoleranz bei einem Patienten anhand der gewonnenen Daten frühzeitig (noch vor klinischer Manifestation) zu erkennen.

Als Nächstes suchten wir nach Unterschieden in den unter 3.1 und 4.3 dargestellten klinischen Parametern (Anthropometrische Daten, Medikation, subjektive Daten der Lebensführung, wichtige Laborparameter) zwischen den beiden Clustern, aufgeteilt jeweils nach Geschlecht. Es konnte jedoch kein zusätzlich signifikanter Unterschied in beiden Kohorten festgestellt werden.

4.2 Vergleich der gemessenen mittleren Glucosekonzentrationen

Es erfolgte zudem eine Gegenüberstellung der mittels Glucometer gemessenen Glucosekonzentrationen zu den einzelnen Messwertpunkten T0 bis T8 (siehe Material und Methodik, 3.3) und der mittels Filterkarten erfassten und mittels GC-MS gemessenen Glucosekonzentrationen. Dabei wurde für **jeden Zeitpunkt der Messung (T0 bis T8)**, ein mit dem Glucometer bestimmter Glucosewert mit zwei bis drei Glucosewerten, welche aus den jeweils entsprechenden fünf "spots" einer Filterkarte gewonnen wurden, korreliert. Eine Gegenüberstellung aller Messwertdaten zu den einzelnen Zeitpunkten zeigte insgesamt eine stark positive Korrelation der Messwerte zu den einzelnen Zeitpunkten (Korrelation nach Pearson = 0,52, $R^2 = 0,271$).

Neben dieser Gegenüberstellung der einzelnen Messwertdaten zu den einzelnen Zeitpunkten, wurde auch jeweils der Mittelwert der Glucosekonzentrationen (jeweils mit GC-MS und Glucometer bestimmt) **über die gesamte Messdauer (T0 bis T8)** errechnet und verglichen: Hierzu wurde aus den zuvor bestimmten Mittelwerten zu jedem Zeitpunkt der Messung T0 bis T8 der Mittelwert über die gesamte Messdauer bestimmt (entsprechend für die Messungen mittels GC-MS: $GC(MT0+MT1+MT2+\dots+MT8):9$; entsprechend für die Messungen mittels Glucometer: $GC(T0+T1+T2+\dots+T8):9$). Insgesamt stimmten die Messergebnisse beider Methoden sehr gut überein (Mittelwertabweichungen der Glucosekonzentrationen je nach Methodik um 0,49%, R^2 Linear = 0,293). Zudem lässt sich hier ebenso eine signifikante Korrelation (Korrelation nach Pearson = 0,54) zwischen den Mittelwerten der Glucosekonzentrationen beider Messmethoden erkennen. Die zu den Messungen mittels GC-MS zusätzlich parallel durchgeführten Messungen mittels Glucometer dienen daher als indirekter Hinweis auf die Richtigkeit unserer Annahme. Die in Abbildung 21 dargestellte Korrelation zeigt an, dass die Glucosemessungen mittels GC-MS den Messungen mittels Glucometer in etwa entsprechen. Somit kann angenommen werden, dass die Ausgangsvariablen der vorgestellten Flussanalysen den realen Glucosewerten nahekommen.

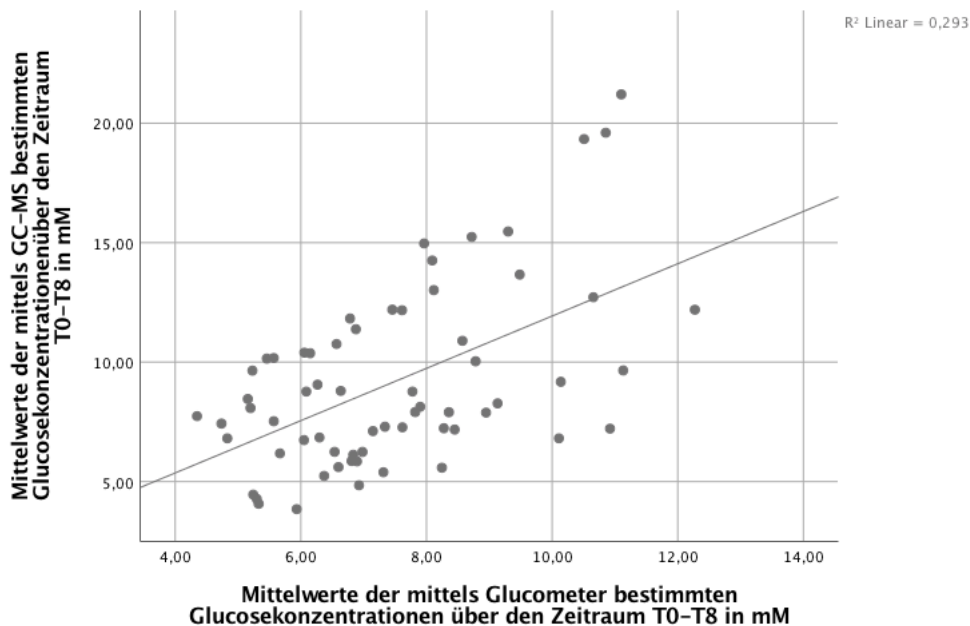


Abbildung 21: Positive Korrelation zwischen den Mittelwerten der Glucosekonzentrationen beider Messmethoden über die gesamte Messdauer in der gesamten Kohorte

4.3 Unterschiede in der mittels GC-MS ermittelten mittleren Gluconeogeneserate, Laktatproduktion, Glucoseproduktion und Glucosekonzentration (siehe Material und Methodik, 3.3) der Probanden in Abhängigkeit der in REDCap® erfassten Merkmale

Neben der Erfassung und Differenzierung des Flusses der Glucose wurde im Anschluss der Einfluss der in REDCap® erfassten Merkmale auf die in der mittels GC-MS ermittelten mittleren Gluconeogeneserate, Laktatproduktion, Glucoseproduktion und Glucosekonzentration (siehe Material und Methodik, 3.3) untersucht. Die genaueren Zusammenhänge werden im Folgenden dargestellt.

Demnach wiesen die Kontrollpersonen eine mittlere Glucoseproduktion von 2,796 mg/(kg*min) (SD = 0,872) und eine mittlere Gluconeogeneserate von 0,732 mg/(kg*min) (SD = 0,92) auf. Die Gruppe der Typ-2-Diabetiker hatte eine mittlere Glucoseproduktion von 2,829 mg/(kg*min) (SD = 1,301) und eine mittlere Gluconeogeneserate von 0,662 (SD = 0,382). Die mittlere Glucoseproduktion des Typ-1-Diabetikers betrug 1,937 mg/(kg*min) und die Gluconeogeneserate betrug 0,536 mg/(kg*min). Abbildung 22 a zeigt Verteilung der Gluconeogeneserate der einzelnen Kohorten (Typ-1-Diabetiker, Typ-2-Diabetiker, Kontrollpersonen), Abbildung 22 b zeigt die Verteilung der Glucoseproduktion der einzelnen Kohorten an. Daraus ergibt sich: Die mittels GC-MS und mathematischer Differenzierung ermittelte mittlere Gluconeogeneserate, mittlere Laktatproduktion, mittlere Glucoseproduktion, sowie mittlere Glucosekonzentration eines jeden Patienten (jeweils über die gesamte Dauer der Untersuchung

von 180 Minuten ermittelt, gemessen und berechnet anhand der Messungen zu den Zeitpunkten T0 bis T8) unterschieden sich nicht signifikant zwischen Diabetikern und Kontrollpersonen.

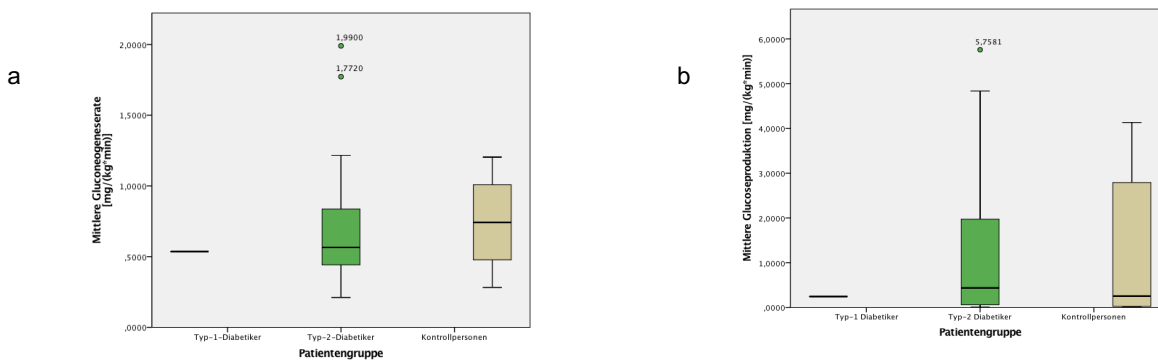


Abbildung 22 a und b: Mittlere Gluconeogeneserate (a) und mittlere Glucoseproduktion (b); aufgeteilt nach untersuchter Patientengruppe (= Typ-1-Diabetiker, Typ-2-Diabetiker, Kontrollpersonen)

Frauen wiesen allerdings insgesamt mit durchschnittlich 0,774 mg/(kg*min) tendenziell eine höhere mittlere Gluconeogeneserate als Männer, welche durchschnittlich eine mittlere Gluconeogeneserate von 0,5891 mg/(kg*min) erreichten, auf. Untersucht man die Kohorte jeweils aufgeteilt nach Geschlecht und Vorhandensein eines Diabetes mellitus (Typ-2-Diabetes mellitus, Kontrollgruppe), so zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gluconeogeneserate. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 23 dargestellt. Abbildung 23 a zeigt die mittlere Gluconeogeneserate beim weiblichen Geschlecht, Abbildung 23 b beim männlichen Geschlecht.

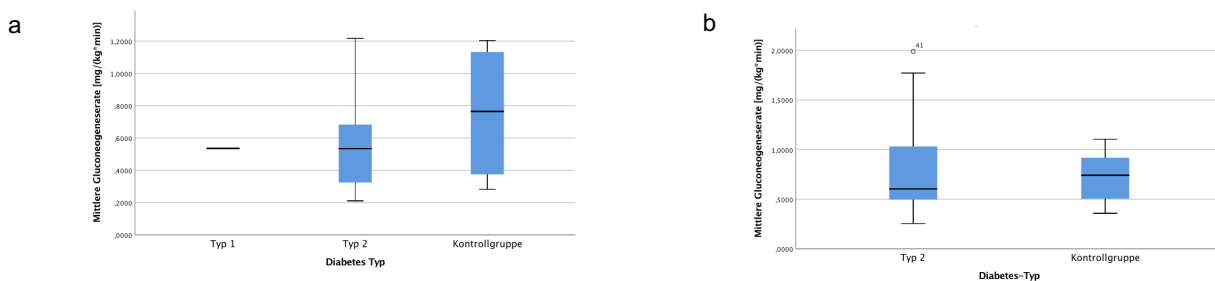


Abbildung 23 a und b: Kein signifikanter Unterschied in der mittleren Gluconeogeneserate, sowohl beim weiblichen (a), als auch beim männlichen (b) Geschlecht.

In der Gruppe der Typ-2-Diabetikerinnen zeigte sich tendenziell eine positive Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und mittlerer Gluconeogeneserate. Für das männliche Geschlecht konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden (Abbildung 24).

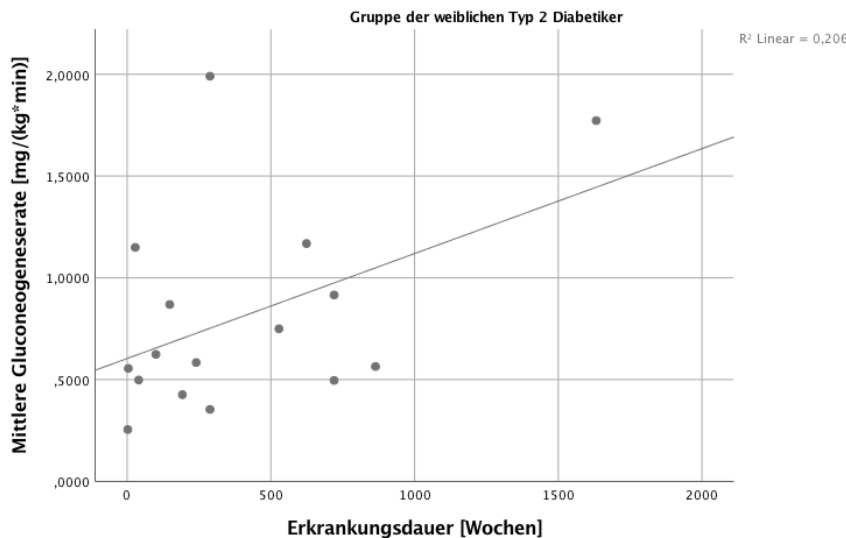


Abbildung 24: Positive Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und mittlerer Gluconeogenese unter den Typ-2-Diabetikerinnen

Untersucht man den Einfluss des BMI und des WHR auf die mittlere Gluconeogenese, Laktatproduktion, Glucoseproduktion und Glucosekonzentration, so lässt sich keine signifikante Korrelation erkennen.

Die Raucher zeigten mit durchschnittlich 2,50 mg/(kg*min) (SD = 0,90) eine signifikant ($p = 0,039$) erhöhte Laktatproduktion gegenüber Nicht-Rauchern mit 1,43 mg/(kg*min) (SD = 1,073). Untersucht man die Kohorte separat (Kontrollgruppe/Diabetes), so zeigt sich mit durchschnittlich 2,98 mg/(kg*min) (SD = 1,19) zusätzlich eine signifikant erhöhte Laktatproduktion in der Gruppe der Typ-2-Diabetikerinnen mit Nikotinkonsum gegenüber Typ-2-Diabetikerinnen ohne Nikotinkonsum auf einem Signifikanzniveau von $p = 0,011$. Für das männliche Geschlecht konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden. An dieser Stelle ist jedoch auch zu erwähnen, dass lediglich ein männlicher Typ-2-Diabetiker Nikotinkonsum angab und 23 Typ-2-Diabetiker Nicht-Raucher waren. Auch in der Kontrollgruppe war nur ein Mann Raucher, drei Männer Nicht-Raucher. Eine statistisch valide Aussage anhand der Daten ist also nur für das weibliche Geschlecht möglich.

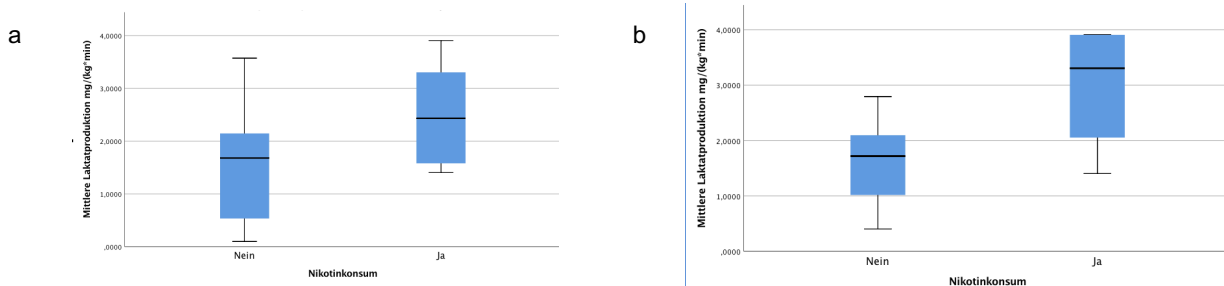


Abbildung 25 a und b: Probanden, die einen regelmäßigen Nikotinkonsum angaben, zeigten eine signifikant erhöhte Laktatproduktion (a). Dieser Zusammenhang gilt insbesondere für die Gruppe der weiblichen Typ-2-Diabetiker (b)

Es konnte sowohl in der Gruppe der Diabetiker als auch in der Gruppe der Kontrollpersonen kein signifikanter Einfluss der in Tabelle vier bis sieben (Anhang) gelisteten Parameter auf die mittels Glucometer bzw. die mittels GC-MS gemessene mittlere Glucosekonzentration, mittlere Laktatproduktion, mittlere Gluconeogeneserate und die mittlere Glucoseproduktion festgestellt werden.

Unsere Probanden nahmen – je nach Komorbidität – eine unterschiedliche Anzahl an Arzneimitteln ein. Um einen Einfluss einer bestimmten Wirkstoffklasse auf die jeweils von uns im GC-MS gemessene mittlere Gluconeogeneserate, mittlere Glucoseproduktion, mittlere Laktatproduktion und mittlere Glucosekonzentration zu überprüfen, wurden die Wirkstoffe in einzelne Gruppen (= Wirkstoffklassen) mittels SPSS eingeteilt. Dabei wurde ein Schwerpunkt vor allem auf die zur Diabetestherapie eingesetzten Arzneimittel, aber auch auf die gängigen und von unseren Patienten täglich eingenommenen antihypertensiven Substanzen gelegt.

Einfluss oraler Antidiabetika

Von den Studienteilnehmern nahmen 24 von 57 Patienten (→ N = 24/57) regelmäßig Biguanide (Metformin) ein. Bei den weiblichen Typ-2-Diabetikern nahmen 10 von 16 Patientinnen und bei den männlichen Typ-2-Diabetikern nahmen 14 von 24 Patienten ein Biguanid-Präparat (Metformin) ein. Es konnte kein signifikanter Einfluss dieser Wirkstoffklasse – auch im direkten Vergleich mit Diabetikern ohne Biguanid-Therapie – auf die mittlere Gluconeogeneserate, mittlere Glucoseproduktion, mittlere Laktatproduktion und mittlere Glucosekonzentration festgestellt werden.

Auch Sulfonylharnstoffe (Glibenclamid, Glimipirid, Gliclazid) wurden von den Diabetikern teilweise eingenommen (N = 4/57). Auch hier konnte kein Einfluss dieser Wirkstoffklasse – auch im direkten Vergleich mit Diabetikern ohne Sulfonylharnstoff-Therapie – auf die oben genannten Parameter festgestellt werden.

Nur eine Diabetikerin nahm ein Sulfonylharnstoff-Analogon (Repaglinid) ein. Es konnte kein Einfluss dieser Wirkstoffklasse – auch im direkten Vergleich mit Diabetikern ohne einer GLP-1-Agonisten-basierten Therapie – auf die oben genannten Parameter festgestellt werden.

Die oralen Antidiabetika wurden oftmals durch ein Inkretinmimetikum ergänzt. Wir unterscheiden hierbei zwischen einer GLP-1-Agonisten-basierten und einer DPP-4-inhibierten-basierten Therapie. Drei Diabetiker (N = 3/57) nahmen regelmäßig einen GLP-1-Agonisten (Liraglutid) ein. Es konnte kein Einfluss dieser Wirkstoffklasse – auch im direkten Vergleich mit Diabetikern

ohne einer GLP-1-Agonisten-basierten Therapie – auf die oben genannten Parameter festgestellt werden. 13 Typ-2-Diabetiker (N = 13/57) nahmen regelmäßig einen DPP-4-Inhibitor (Vildagliptin, Siptagliptin) ein. Dabei wiesen wider Erwarten die männlichen Typ-2-Diabetiker mit DPP-4-Inhibitor-Therapie mit 2,3 mg/(kg*min) (SD = 1,7) eine signifikant ($p = 0,027$) höhere mittlere Glucosekonzentrationen (= Durchschnittliche Glucosekonzentrationen auf jeweils einer zu einem bestimmten Zeitpunkt T0 bis T8 gemessenen Filterkarte) auf, als die männlichen Typ-2-Diabetiker ohne DPP-4-Inhibitor-Therapie. Für das weibliche Geschlecht konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht festgestellt werden. Die weiblichen Typ-2 Diabetikerinnen mit DDP-4-Inhibitor-Therapie wiesen ebenso unerwartet mit 4,1 mg/(kg*min) (SD = 1,9 eine signifikant ($p = 0,04$) erhöhte mittlere Glucoseproduktion gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe (= Typ-2-Diabetikerinnen ohne DDP-4-Inhibitor-Therapie) auf. Für das männliche Geschlecht konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden.

Einfluss einer Insulin-Therapie

Sieben Diabetiker (N = 7/57) gaben an, regelmäßig ein Insulinpräparat zu verwenden. Wir unterschieden nicht zwischen der Art des Insulins (d. h. lang oder kurz wirksame Formen). Es konnte kein Einfluss dieser Wirkstoffklasse – auch im direkten Vergleich mit Patienten ohne Insulin-Therapie – auf die oben genannten Parameter festgestellt werden.

Einfluss einer antihypertensiven Therapie

Als antihypertensive Medikation wurden von den Patienten Betablocker (Nebivolol, Bisoprolol, Metoprolol, Carvedilol, Celiprolol), Diuretika (Hydrochlorothiazid, Torasemid, Triamteren, Furosemid), Calciumantagonisten, Angiotensinrezeptorblocker (= Sartane), der zentrale alpha-Agonist Moxonidin und der Renininhibitor Alisikren eingenommen. Bei den männlichen Typ-2-Diabetikern nahmen 11 von 24 einen Betablocker ein, bei den Typ-2-Diabetikerinnen nahmen 3 von 16 Patientinnen einen Betablocker ein. In der Kontrollgruppe nahmen 2 von 4 männlichen Patienten und 1 von 12 weiblichen Patienten einen Betablocker ein. Bei den männlichen Typ-2-Diabetikern nahmen 3 von 24 Patienten ein Diuretikum ein, bei den weiblichen Typ-2-Diabetikern nahmen 6 von 16 Patientinnen ein Diuretikum ein. In der Kontrollgruppe nahmen 0 von 4 männlichen Patienten und 1 von 12 weiblichen Patienten ein Diuretikum ein.

Es konnte kein signifikanter Einfluss der Diuretika auf die mittlere Gluconeogeneserate, die mittlere Glucoseproduktion, die mittlere Laktatproduktion sowie die mittlere Glucosekonzentration – auch im Vergleich mit Patienten ohne Diuretika-Therapie – festgestellt werden.

Dihydropyridine (Amlodipin, Lercanidipin, Felodipin, Nitrendipin) wurden von 15 Patienten (N = 15/57) eingenommen. Ein Patient (N = 1/57) nahm einen Calciumantagonisten vom Benzodiazepintyp (Diltiazem) ein.

Diejenigen Patienten, die Calciumantagonisten einnahmen, hatten mit durchschnittlich 1,72 mg/(kg*min) (SD = 1,81) eine signifikant ($p = 0,049$) höhere mittlere Glucosekonzentration gegenüber Patienten ohne Calciumantagonisten-Einnahme (durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration = 1,05 mg/(kg*min), SD = 1,42).

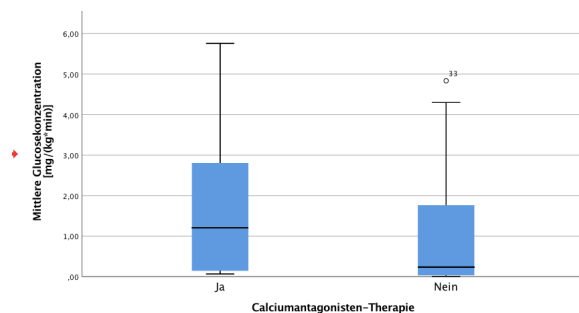


Abbildung 26: Probanden, die eine tägliche Calciumantagonisten-Einnahme angaben, zeigten eine signifikant erhöhte durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration

Untersucht man nur die an Typ-2-Diabetes erkrankten Patienten (N = 40/57), so nahmen 13 von ihnen (N = 13/40) einen Calciumantagonisten ein. Mit durchschnittlich 2,08 mg/(kg*min) (SD = 1,84) zeigten sie eine signifikant ($p = 0,011$) erhöhte mittlere Glucosekonzentration gegenüber Typ-2-Diabetikern ohne Calciumantagonisten-Einnahme (durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration = 0,81 mg/(kg*min), SD = 1,27 mg/(kg*min)). Ein Einfluss auf die mittlere Laktatproduktion konnte nicht festgestellt werden.

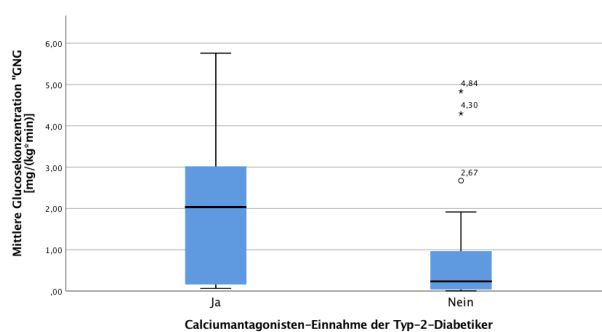


Abbildung 27 a und b: Typ-2-Diabetiker, die eine tägliche Calciumantagonisten-Einnahme angaben, zeigten eine signifikant erhöhte durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration

Untersuchte man die Kohorte jedoch nach Geschlecht, so konnte keine signifikante Korrelation zwischen Calciumantagonisten-Einnahme und Glucosekonzentration festgestellt werden.

Insgesamt 16 Patienten (N = 16/57) nahmen täglich einen AT₁-Rezeptorantagonisten (Olmesartan, Telmisartan, Irbesartan, Valsartan, Candesartan) ein. Bei den Typ-2-Diabetikern nahmen 9 von 24, bei den Typ-2-Diabetikerinnen nahmen 4 von 16 Patientinnen ein Sartan ein. In der Kontrollgruppe nahmen 1 von 4 männlichen Patienten und 2 von 12 weiblichen Patienten ein Sartan ein. Die Gruppe der männlichen Typ-2-Diabetiker mit Sartan-Therapie wiesen mit 1,93 mg/(kg*min) (SD = 1,68) eine signifikant erhöhte mittlere Laktatproduktion gegenüber der männlichen Kontrollgruppe (1,05 mg/(kg*min), SD = 0,72) auf einem Signifikanzniveau von p = 0,03 auf. Für das weibliche Geschlecht konnte dieser Zusammenhang nicht festgestellt werden.

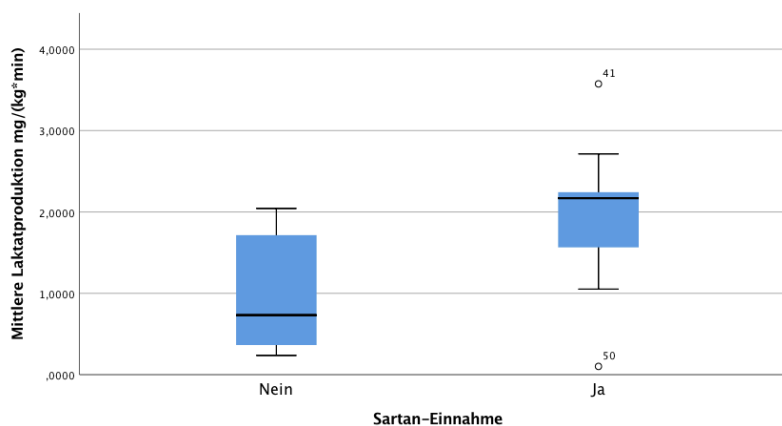


Abbildung 28: Signifikant erhöhte mittlere Laktatproduktion unter Sartan-Einnahme in der Gruppe der männlichen Typ-2-Diabetiker

Ein zentraler Alpha-Agonist (Moxonidin) wurde nur von einem Studienteilnehmer eingenommen. Unter Berücksichtigung der Patientenzahl konnte jedoch kein Einfluss einer der Wirkstoffe auf die im GC-MS von uns gemessenen oben genannten Werte erkannt werden.

Neben den oben genannten Substanzen nahmen die Studienteilnehmer auch andere Wirkstoffe ein, wie: L-Thyroxin (N = 10/57), Parasympatholytika (Trospiumchlorid (N = 1/57), Ipatropiumchlorid (N = 1/57), Tiotropiumbromid (N = 1/57)), Corticosteroide (Fluticason (N = 2/57), Budesonid (N = 3/57)), β_2 -Sympathomimetika (Salbutamol (N = 1/57), Fomoterol (N = 1/57), Fenoterol (N = 1/57), Salmeterol (N = 1/57)) oder diverse Psychopharmaka (SSRI: Sertralin (N = 1/57), Citalopram (N = 1/57); NaSSA: Mirtazapin (N = 2/57); Benzodiazepine: Alprazolam (N = 1/57), Lorazepam (N = 1/57); Trizyklische Antidepressiva: Doxepin (N = 1/57), Amitriptylin (N = 3/57), Trimipramin (N = 1/57); Hypnotika: Zopiclon (N = 1/57), Zolpidem (N = 2/57); Atypische Neuroleptika: Quetiapin (N = 1/57); Antikonvulsiva: Valproat (N = 1/57), Gabapentin (N = 1/57), Lamotrigin (N = 2/57), Levetiracetam (N = 1/57), Pregabalin (N = 2/57).

Es konnte kein Einfluss einer dieser Wirkstoffklassen auf die im GC-MS von uns gemessenen oben genannten Werte auch im direkten Vergleich von Diabetikern vs. Kontrollgruppe festgestellt werden.

Ebenfalls suchten wir nach Unterschieden in den unter 3.1 dargestellten klinischen Parametern zwischen den beiden Clustern, aufgeteilt jeweils nach Geschlecht. Hier konnte jedoch kein zusätzlich signifikanter Unterschied in beiden Kohorten festgestellt werden

4.4 Klinische Unterschiede in den Kohorten

Nach Differenzierung und Clustering der Flüsse der Glucose und Untersuchung bestimmter Risikofaktoren auf den Glucosemetabolismus erfolgte abschließend eine Untersuchung der einzelnen Kohorten nach klinischen Unterschieden unabhängig der mittels Point-of-Care-Diagnostik gewonnenen Daten.

Die Gruppe der Diabetikerinnen wies mit 106,07 cm (SD = 4,983 cm) einen signifikant erhöhten Taillenumfang (p -Wert = 0,03) gegenüber weiblichen Kontrollpersonen, welche einen durchschnittlichen Taillenumfang von 85,00 cm (SD = 8,978 cm) aufwiesen, auf (Abbildung 29 a). Der Zusammenhang konnte für das männliche Geschlecht nicht festgestellt werden (p = 0,435). Auch wiesen die Typ-2-Diabetikerinnen (Tabelle 6) mit 115,88 cm (SD = 14,370 cm) einen signifikant erhöhten Hüftumfang (p -Wert = 0,05) gegenüber weiblichen Kontrollpersonen, welche einen durchschnittlichen Hüftumfang von 101,82 cm (SD = 7,574 cm) erreichten, auf (Abbildung 29 b). Der Zusammenhang konnte für das männliche Geschlecht nicht festgestellt werden.

Das durchschnittliche WHR (= Waist-to-Hip-Ratio = Verhältnis Taille zu Hüfte) der Typ-2-Diabetikerinnen unterschied sich mit 0,9136 (SD = 0,07697) signifikant von dem der weiblichen Kontrollpersonen, welche ein mittleres WHR von 0,83388 (SD = 0,462207) aufwiesen (p = 0,02). Der Zusammenhang konnte für das männliche Geschlecht nicht festgestellt werden (Abbildung 29 c).

Insgesamt konnten wir also für das weibliche Geschlecht einen erhöhten Taillenumfang, einen erhöhten Hüftumfang, als auch ein erhöhtes WHR als Risikofaktoren einer Diabetes-Erkrankung anhand der klinisch erhobenen Daten herausarbeiten.

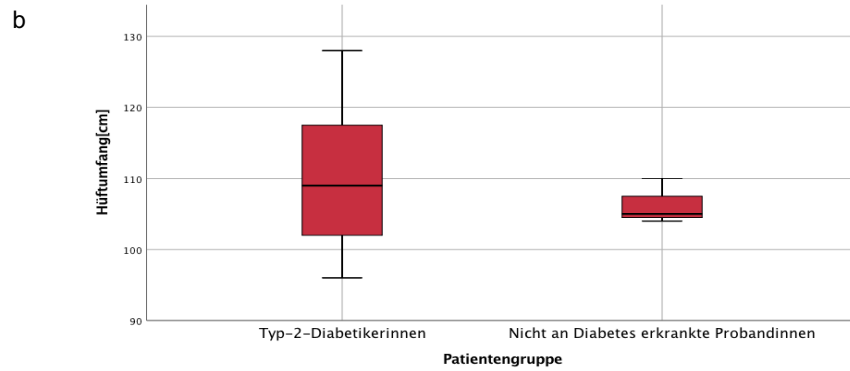
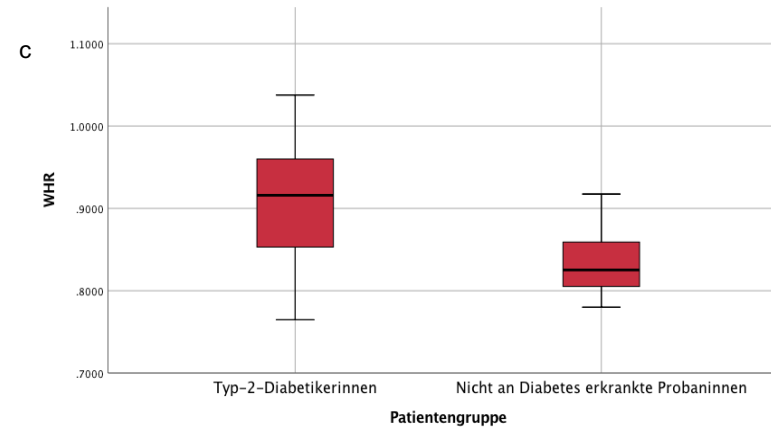
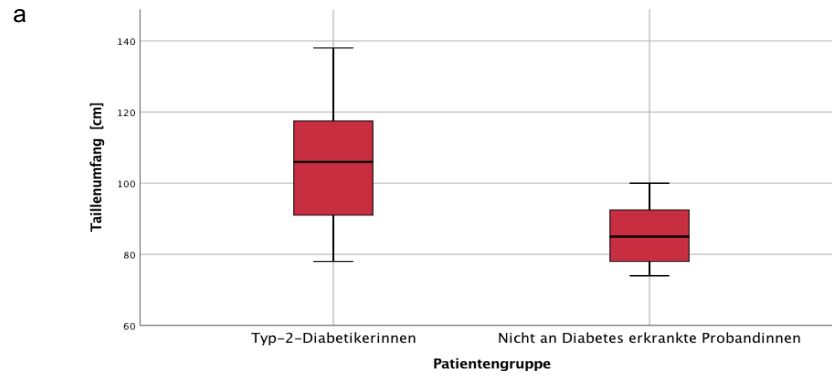


Abbildung 29 a bis c: Signifikant erhöhter Taillen- und Hüftumfang der Typ-2-Diabetikerinnen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe (a und b), sowie signifikant erhöhtes Waist-to-Hip-Ratio der Typ-2-Diabetikerinnen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe

5. Diskussion

Im Resultat konnte ein Verfahren entwickelt werden, das zunächst mittels Point-of-Care-Diagnostik und anschließender mathematischer Differenzierung den Fluss der aufgenommenen Glucose beziehungsweise ihrer Metaboliten erfassen kann.

Insgesamt zeigte sich während der Auswertung der Daten, dass durch die Vielzahl der vorhandenen Flüsse der Glucose sowie ihrer Metaboliten sehr viel redundante Information entsteht. Um in dieser Vielzahl der massenspektrometrisch erfassten Datenmesspunkte ein Muster ähnlicher Verläufe beziehungsweise Ballung von Messpunkten unter bestimmten Bedingungen zu explorieren, wurde initial eine Clusteranalyse durchgeführt. Im Resultat konnten zwei Cluster identifiziert werden (Abbildung 20): In Cluster eins (rot dargestellt) zeigten die Patienten höhere Glucosekonzentrationen und Glucoseproduktionen als in Cluster zwei (grün dargestellt). Cluster eins bestand fast vollständig aus Diabetikern; Cluster zwei aus Nicht-Diabetikern. Lediglich ein männlicher Nicht-Diabetiker (KIT-ID: 2017022213) zeigte ebenfalls eine erhöhte Glucoseproduktion und wurde Cluster eins zugeordnet. Dieser entwickelte zwei Jahre nach Versuchsdurchführung einen gestörten Glucosemetabolismus (= Prädiabetes). Es konnte also exemplarisch gezeigt werden, dass anhand des Clusterings, der in der Untersuchung aus Glucoseproduktion und Glucosekonzentration modellierten Flüsse der Glucose, eine gestörte Glucosetoleranz frühzeitig noch vor klinischer Manifestation erfasst werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit mittels mathematischer Differenzierung geschätzte Gluconeogeneserate ist ermittelt aus Glucoseproduktion und Glucosekonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wiesen die Kontrollpersonen eine mittlere Gluconeogeneserate von 0,732 mg/(kg*min) (SD = 0,92) auf. Die Gruppe der Typ-2-Diabetiker hatte eine mittlere Gluconeogeneserate von 0,662 (SD = 0,382) (Abschnitt 4.3). Somit wiesen die Typ-2-Diabetiker eine niedrigere errechnete mittlere Gluconeogeneserate als die Kontrollpersonen auf. An dieser Stelle ist sicherlich auch zu beachten, dass die an der Studie teilnehmenden Typ-2-Diabetiker bei Versuchsdurchführung bereits antidiabetisch vorbehandelt waren. Mittels Clusteranalyse konnte dennoch eine eindeutige Zuordnung der Probanden zu der Gruppe der Diabetiker beziehungsweise der Kontrollpersonen unabhängig von etwaigen Einflussfaktoren erfolgen. Dementsprechend erfolgte die Differenzierung der Probanden in der Clusteranalyse dynamisch, nicht statisch.

Die bisher im klinischen Alltag genutzten Verfahren zur Untersuchung des Glucosemetabolismus (insbesondere HbA1c und oGTT) lassen nur indirekt eine Aussage über die einzelnen Stoffwechselforgänge (Gluconeogenese, Glykogensynthese, Glykogenolyse, Insulinsekretion, Insulinsensitivität der Gewebe etc.) zu. Möchte man den Glucosemetabolismus jedoch

genauer untersuchen, werden Clamp-Techniken angewandt (Karger, 1984). Clamp-Techniken, die dynamische Veränderungen des Glucosehaushaltes messen können, sind jedoch teuer, zeitaufwändig und benötigen oft sehr hohe personelle Ressourcen (Ayala, Bracy, McGuinness & Wasserman, 2006, Patent.de, 2006, Neumaier, 2015). Im klinischen Alltag gibt es daher derzeit kein gängiges Verfahren die Gluconeogenese zu erfassen. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete, innovative Verfahren erlaubt es, mittels Point-of-Care-Diagnostik nicht invasiv eine detailliertere Aussage über den Glucosehaushalt der Probanden zu erhalten. Auch Hill et al. verwendeten bereits nicht radioaktiv markierte Glucose (Isotopolog [$U^{13}C^6$]) zur Metaboliten-Analyse mittels dried-blood-spots-Analytik. Sie schätzten, dass durch die Entnahmetechnik Zellen bereits in kurzer Zeit inaktiviert würden, während die in einem Sammelröhrchen aufbewahrten Vollblut-Zellen bis zu 24 Stunden nach der Entnahme weiterhin Glucose aufnahmen und metabolisierten. Diese Fähigkeit, den Glucosestoffwechsel in kurzer Zeit zu stoppen, sei insbesondere bei der genauen Erfassung des Glucosemetabolismus wichtig, da die Glykolyse einer der aktivsten Stoffwechselwege in den Zellen sei. Darüber hinaus sei die Blutentnahme mit der DBS-Technik im Vergleich zur herkömmlichen Blutentnahme ihrer Meinung nach für die Bevölkerungsgesundheit und Anwendungen der Präzisionsmedizin von entscheidender Bedeutung, da sie ein informatives Auslesen des Metaboloms ermögliche (Hill C et al., 2017). Auch wenn wir denken, dass eine Analytik mittels Plasmaproben noch präziser sein könnte, schätzten auch wir die Inaktivierung der entnommenen Zellen nach kurzer Zeit, da eine Analytik der entnommenen Proben bei entsprechender Lagerung im späteren zeitlichen Verlauf erfolgen konnte. Trotz mangelnder personeller Ressourcen konnten die Proben zunächst gewonnen und (nach entsprechender Personalisierung) später analysiert werden. Wir denken, dass gerade dieser Aspekt angesichts des häufigen Fachkräfte- und Personal-mangels eine wichtige Voraussetzung zur Etablierung einer im Alltag durchführbaren Untersuchungsmethode ist. Um eine Validierung der gewonnenen Daten zu erhalten, ist jedoch eine zweite parallele Versuchsreihe mittels Clamp-Technik sinnvoll. In der Doping-Diagnostik wird die Point-of-Care Technologie bereits zum Nachweis illegaler leistungssteigerender Substanzen verwendet (Deußling & Oettleben, 2020). Auch das Zentrum für Präventive Dopingforschung (ZePräDo) der Sporthochschule Köln verwendet sie bereits zum Nachweis niedermolekularer Peptidhormone und anderer Dopingmittel (Deußling & Oettleben, 2020). Dies zeigt, dass die Diagnostik tatsächlich im Alltag in einem ähnlichen Setting einfach durchzuführen ist. Auch unser Versuchsaufbau könnte somit in Zukunft – nach Abwandlung einzelner Parameter (siehe Abschnitt Limitationen) – in ähnlicher Art und Weise im klinischen Alltag routinemäßig durchführbar sein.

Schilling et al. untersuchten bereits das Verhalten der freien Fettsäuren unter intravenöser Glucosebelastung bei graviden und nicht graviden Patientinnen mit Symptomen eines potentiellen Diabetes mellitus. Als ein Resultat der Studie konnte in der Gruppe der nicht schwangeren Diabetikerinnen in zwei der drei getesteten Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied im Anstieg der freien Fettsäuren nach einem intravenösen Glucosetoleranztest im Vergleich zu Kontrollen ohne Stoffwechselstörungen festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass eine gestörte Glucosetoleranz auch mit einer Störung der Lipogenese einhergehen kann (Schilling, Herberg, Jahnke, Hüter, 1969). Damit sind weitere Diagnostik- und Therapieoptionen z.B. bei Adipositas oder beim Metabolischem Syndrom denkbar.

Die Zuordnung der Probanden zu einem Cluster anhand des gewonnenen Flussprofils könnte eine zusätzliche Methode zur frühzeitigen Erkennung einer gestörten Glucosetoleranz unabhängig von Nüchtern-Plasma-Glucose- oder Langzeitblutzucker-Wertes werden. Diese Beobachtung konnte exemplarisch an einem Patienten mit gestörter Glucosetoleranz lange vor klinischer Manifestation gemacht werden. Allerdings ist es nicht gelungen, aus der Glucoseproduktion die Gluconeogenese und Glykogenolyse einzeln zu differenzieren (Abschnitt 4.3). Wir können also nicht sicher beweisen, dass wir die Gluconeogenese wirklich erfasst haben. Die Korrelation der Glucosemessungen mittels GC-MS mit den Messungen mittels Glucometer (Abschnitt 4.2) zeigt aber, dass die der Berechnung zugrundeliegenden Faktoren annähernd korrekt sind. Die zu den Messungen mittels GC-MS zusätzlich parallel durchgeführten Messungen mittels Glucometer dienen als indirekter Hinweis auf die Richtigkeit unserer Annahmen. Daher nehmen wir an, dass die Ausgangsvariablen der vorgestellten Flussanalysen denen der mit Glucometer gemessenen Glucosewerten nahe kommen. Wir folgern daraus, dass das vorgestellte Verfahren in der Lage ist, hochsensitiv den Glucosemetabolismus dynamisch, nicht statisch zu erfassen. Weitere Versuchsreihen mit parallel entnommen Plasmaglucosewerten und größerer Probandenzahl sind hier notwendig.

Nach Constam hängt die Prognose des Diabetes von diversen Faktoren ab: Hierzu zählen Alter, allgemeiner Gesundheitszustand und Tätigkeit des Patienten, sowie von Diabetes-Typus und Diabetes-Stadium, aber auch von der Dauer der Stoffwechselstörung, vom Vorliegen von Komplikationen und von der Therapie, d.h. vom Zeitpunkt ihres Einsatzes und ihrer Qualität (Constam, 1977). Auch im Deutschen Gesundheitsbericht Diabetes 2021 wird die Prognose der Erkrankung insbesondere in Abhängigkeit der kardiovaskulären, renalen und neuronalen Folgeschäden dargestellt (Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) & diabetes.de - Deutsche Diabetes Hilfe, 2021). Durch die Diagnostik mittels GC-MS könnte eine antidiabetische Therapie (Ernährung, Sport) evtl. frühzeitiger und simpel im ambulanten Setting begonnen

werden und somit die Manifestation eines klinisch manifesten Diabetes und seiner Langzeitschäden gegebenenfalls verhindert werden. Die Sensitivität der frühen Diabetes-Diagnostik könnte in Zukunft durch das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Verfahren zur Charakterisierung des Glucosemetabolismus gesteigert werden.

Darüber hinaus wurde nach Unterschieden in den einzelnen Stoffwechselfvorgängen des Glucosemetabolismus der Probanden (Gluconeogenese, Glucoseproduktion, Laktatproduktion) in Abhängigkeit klinisch erhobener und in REDCap erfasster Merkmale untersucht. Auch hier konnten einzelne Einflussfaktoren herausgearbeitet werden, deren Bedeutsamkeit für den Glucosemetabolismus bis dato teilweise noch nicht in dieser Art und Weise gezeigt werden konnte: Insgesamt wiesen Frauen in der Gruppe der Typ-2-Diabetiker tendenziell eine höhere Gluconeogeneserate als Männer – unabhängig ihres Taillenumfangs, Hüftumfangs, WHRs oder BMIs – auf (siehe Abschnitt 4.4). Eine ähnliche Studie, welche die Gluconeogeneserate der Probanden allerdings unter Fastenbedingungen mit sechs Männern und zwölf Frauen untersuchte, kam zu einem kontroversen Ergebnis: Sie konnte keine signifikanten Unterschiede in der Glucoseproduktion während einer Fastenperiode von weniger als 24 Stunden feststellen (Corssmita, Sauerwein, Endert, Romijn, & Stouthard, 1994). Andere Studien zeigten dagegen eine verringerte endogene Glucoseproduktion bei Frauen gegenüber Männern, oder kamen zu keinem eindeutigen, geschlechtsabhängigen Unterschied in dem Glucosemetabolismus (Soeters, 2007). Diese kontroversen Ergebnisse bezüglich des Glucosemetabolismus beider Geschlechter sind aus unserer Sicht durch eine Vielzahl diverser Einflussfaktoren (Alter, Zyklusphase, Hormonstatus, Fettverteilung) begründet. Auch Kautzky-Willer kam zu dem Ergebnis, dass die geschlechtsabhängigen Unterschiede im Glucosemetabolismus multifaktoriell beeinflusst werden (Kautzky-Willer, 2016). Da der Anteil der Gluconeogenese an der Glucoseproduktion mit Zunahme der Nahrungskarenz größer wird (Hartwig, Biesalski, Druml, Fürst, Weimann, 2004; Landau, 1996; Wajngot, 2001), wäre jedenfalls eine erneute Versuchsreihe, jedoch mit einer längeren Phase der Nahrungskarenz – beispielsweise 42 Stunden – sinnvoll. Nach diesem Zeitraum der Nahrungskarenz wird publizierten Studien zur Folge die Gesamtheit der Glucoseproduktion fast vollständig durch die Gluconeogenese getragen (Landau, 1996).

In der Gruppe der Typ-2-Diabetikerinnen konnten wir eine positive Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Gluconeogeneserate feststellen (Abbildung 24). Rita Basu et al. verglichen in ihrer Studie die Glykogenolyse und Gluconeogenese von Typ-2-Diabetikern insbesondere mit nicht an Diabetes erkrankten normalgewichtigen und nicht an Diabetes erkrankten übergewichtigen Kontrollpersonen. Hier wiesen Typ-2-Diabetiker gegenüber gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte Gluconeogenese auf (Basu, Dicke, Rizza, Landau, Chandramouli, 2005). Typ-2-Diabetiker wiesen hier zudem mit fortschreitender Erkrankungsdauer insgesamt

einen höheren Anteil der Gluconeogenese an der Glucoseproduktion auf. Es kann also angenommen werden, dass bei Typ-2-Diabetikern die Regulation der Gluconeogenese im Laufe der Erkrankung zunehmend gestört ist. Die Abhängigkeit der Gluconeogeneserate von der Erkrankungsdauer – und die möglichst frühzeitige Therapie – lässt demnach die Notwendigkeit einer Früherkennung einer gestörten Glucosetoleranz erkennen.

Typ-2-Diabetiker mit Calciumantagonisten-Einnahme wiesen im Resultat tendenziell höhere Glucosekonzentrationen auf gegenüber Patienten ohne Calciumantagonisten-Einnahme. Da Calciumionen für die Insulinsekretion eine wichtige Rolle spielen (Calcium-abhängige Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas (Hinghofer, 2020)), könnten Calciumantagonisten in Einzelfällen bei Diabetes mellitus den Glucosemetabolismus negativ beeinflussen. Einer Publikation zu Folge, welche die durch Glucagon stimulierte Gluconeogenese in Primärkulturen von Rattenhepatozyten in Abhängigkeit diverser Calcium-Antagonisten untersuchte, konnten Calcium-Antagonisten – insbesondere Nifedipine und Nicardipine – die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und somit eine Glucagon stimulierte Gluconeogenese potenzieren (Oghihara M, 1992). Zur Validierung wären weitere klinische Studien mit höherer Patientenzahl, einer längeren Untersuchungsdauer, höheren Glucosekonzentrationen sowie parallel durchgeführten Clamp-Techniken zur Evaluierung des Verfahrens sinnvoll.

Laktat dient als Substrat der Gluconeogenese in Gluconeogenese betreibenden Organen (Abschnitt 3.3). Bei Glucosemangel wird aus den Laktatmolekülen erneut Glucose gebildet und dem Körper wieder zur Verfügung gestellt (Cori-Zyklus, siehe oben). Kommt es zu Störungen des aeroben Glucoseabbaus, beispielsweise bei Sepsis, Schock, Gewebshypoxien sowie Nekrosen, akkumuliert das Laktat und es kommt zur Laktatazidose (English P & Williams G, 2004). Die Höhe des Laktatspiegels kann also auch indirekt auf einen gestörten Glucosemetabolismus hindeuten. Die Point-of-Care Technologie könnte also auch zukünftig ggf. neben der Charakterisierung des Glucosestoffwechsels bei Diabetikern oder aber zur Früherkennung eines Prädiabetes auch in vielen anderen Bereichen eingesetzt werden. Bisher etablierte Verfahren wie invasives Monitoring oder die Blutgasanalyse könnten so zukünftig zur Erfassung dynamischer Stoffwechselprozesse sinnvoll ergänzt werden. Daher wurden die Probanden auch im Hinblick auf Unterschiede in der Laktatproduktion – also das während der Untersuchung pro Minute und Kilogramm entstandene Laktat aus Glykogenolyse und Glykolyse – untersucht (Abschnitt 4.2). Die Gruppe der männlichen Typ-2-Diabetiker mit Sartan-Therapie wiesen eine signifikant erhöhte mittlere Laktatproduktion gegenüber der männlichen Kontrollgruppe auf. Steckelings untersuchte bereits den AT_2 -Rezeptor in Bezug auf Expression, physiologische Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation. Sie kam zu dem Schluss, dass bei vielen experimentell gefundenen Wirkungen über den

AT-Rezeptoren noch nicht geklärt ist, in welchem Umfang sie bei der Entstehung von Krankheiten und deren Prävention eine Rolle spielen (Steckelings, 2011). Die erhöhte Laktatproduktion unter Sartan-Therapie könnte ggf. als Reaktion auf die Blockierung des RAAS-Systems und daher einhergehendem vermehrten Stress für den Organismus erklärt werden (Stahl & Wolf, 1996).

Auch zeigten Raucher gegenüber Nichtrauchern eine signifikant erhöhte Laktatproduktion. Dieser Effekt zeigte sich insbesondere für Typ-2-Diabetikerinnen. Als Erklärungsansätze für diesen Zusammenhang kann eine Beeinträchtigung der Insulinsensitivität bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern (Frati, Iniestra, Ariza, 1996), ein gestörter Glucosetransport im Skelettmuskel bei Rauchern (Rincon, Krook, Galuska, Wallberg-Henriksson, Zierath, 1999) oder aber eine bei Rauchern erhöhte Anzahl freier Radikale herangezogen werden (Burke & Fitzgerald, 2003). Es ist bekannt, dass bei Rauchern aufgrund reaktiver Sauerstoffspezies der oxidative Stress erhöht ist (Stojkovicj et al., 2016). Es entstehen Schäden wie Lipidperoxidationen, Proteinoxidationen und DNA-Veränderungen. Die Bauchspeicheldrüse ist besonders anfällig für Schäden durch diese reaktive Sauerstoffspezies (= ROS). Sie induziert die Aktivierung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), die eine NAD-Depletion verursacht. Dies führt zur Apoptose von Insulin produzierenden Zellen und Laktatbildung (Bhattacharjee A, 2016). Darüber hinaus untersuchten Richter et al. die Glucose-Aufnahme in den Skelettmuskel unter Belastung. Sie stellten eine verringerte Glucose-Aufnahme in den Skelettmuskel in Abhängigkeit der gesamten beanspruchten Muskulatur fest. Dabei stiegen die Laktatkonzentrationen. Wir nehmen daher an, dass insbesondere erhöhte Laktatspiegel einen gestörten Glucosetransport bewirken (Richter E A, Kens B, Saltin B, Christensen N J, Savard G, 1988).

Die abschließend durchgeführte Untersuchung der einzelnen Kohorten nach klinischen Unterschieden unabhängig der mittels Point-of-Care-Diagnostik gewonnenen Daten zeigte keine besonderen Auffälligkeiten: Die Untersuchung zeigte im Wesentlichen, dass die untersuchte Kohorte den in der Literatur beschriebenen Merkmalen entspricht (Schmidt, 1992; Gokhale, Jagdale, Batra, 2017). So wiesen die weiblichen Typ-2-Diabetikerinnen einen höheren Taillen- und Hüftumfang sowie ein höheres WHR auf als die entsprechende Kontrollgruppe.

Auch wenn der Einfluss des Taillen- und Hüftumfangs auf das Diabetes-Risiko bekannt ist, zeigt dieses Resultat, dass wir eine Kohorte rekrutierten, welche in Bezug auf die Körperzusammensetzung den realen Verhältnissen entspricht.

Limitationen:

Im Resultat konnte ein Verfahren entwickelt werden, das zunächst mittels Point-of-Care-Diagnostik und anschließender mathematischer Differenzierung den Fluss der aufgenommenen

Glucose bzw. ihrer Metaboliten erfassen kann. Eine Fortführung weiterer Versuchsreihen mit höherer Patientenanzahl aber auch jüngerem Patientenkollektiv ist dennoch sicher sinnvoll, um den Einfluss diverser Einflussfaktoren auf den Glucosehaushalt noch besser herausarbeiten zu können. Eine Verlängerung der Untersuchungsdauer bzw. Phase der Nahrungskarenz oder Modifikationen bei der Ernährung könnte dazu dienen, den Anteil der Gluconeogenese an der Glucoseproduktion zu erhöhen und damit deutlicher herauszuarbeiten. Sicherlich wäre auch eine Versuchsreihe mit einer größeren Menge Glucose sinnvoll, um eventuell auch die Lipogenese zu erfassen (siehe oben). Auch bedarf es in weiteren klinischen Studien der Validierung einiger technischer Faktoren: In der Studie wurde nicht unterschieden, ob Patienten stationär oder ambulant untersucht wurden. Demensprechend war auch nicht die Zeit der Nahrungskarenz bzw. die Zeit der Energiezufuhr der Tage zuvor sicher objektivierbar. Auch Siegmund et al. untersuchten bereits die antihyperglykämische Therapie bei stationären Patienten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der Insulinbedarf bei stationären Patienten häufiger niedriger sei, als im ambulanten Bereich (Siegmund et al., 2009). Zudem konnten wir zuvor nicht die Therapietreue der Patienten überprüfen: Ein weit verbreitetes Problem im Praxisalltag stellt beispielsweise die konsequente Medikamenteneinnahme dar: Eine Metaanalyse auf Basis klinischer Studien zur Medikamenten-Compliance aus den Jahren 1989 bis 2006 zeigte bereits, dass von den 4783 untersuchten Patienten, die täglich einmal ein Antihypertensivum einnehmen sollten, bereits die Hälfte dieses Präparat nach einem Jahr nicht mehr einnahmen. Auch die Patienten, die sich überwiegend an das Einnahmeschema hielten, „vergaßen“ etwa zehn Prozent der Pillen (Vrijens et al., 2008). Um die Anzahl dieser Störfaktoren zu reduzieren, könnte man in weiteren klinischen Studien beispielsweise nur Patienten aus stationären Pflegeeinrichtungen als Patientenkollektiv wählen. Auch die Messungen mit GC-MS könnten in einigen Variablen modifiziert werden. Klapa untersuchte bereits mögliche Variablen zu Standardisierung der GC-MS Methodik. Sie stellte fest, dass nicht nur der Einfluss des Derivatisierungsmittels, der Derivatmenge, sondern auch der Derivatisierungszeit Einfluss auf die quantitative Bestimmung von Metaboliten haben kann (Klapa, 2008). Wir setzten bereits MSTFA als Derivatisierungsmittel im Überschuss hinzu, um eine vollständige Derivatisierung der Metaboliten zu ermöglichen. Auch wenn die vorgestellte Methodik den Fluss der aufgenommenen Glucose beziehungsweise ihrer Metaboliten erfassen kann, müssen wir einräumen, dass zur Extraktion und Quantifizierung anderer Metaboliten ggf. auch andere Versuchsprotokolle entwickelt werden müssten, wodurch erst einmal personelle, technische, aber auch finanzielle Ressourcen benötigt würden. Auch die Kosten, welche insbesondere durch das verwendete Glucose-Isotopolog $U^{13}C^6$ aber auch durch die Extraktion und Messung mittels GC-MS entstehen, liegen deutlich über dem im klinischen Alltag gebräuchlichen HbA_{1c}-Wert oder dem oralen Glucosetoleranztest und müssen vor jeglicher Versuchsdurchführung berücksichtigt werden. Der Vergleich mit den Kosten, welche für die Behandlung des Diabetes und seiner Folgen

entstehen (4.949 € im Jahr 2015 pro Patient für die Therapie des Diabetes und seiner Folgeerkrankungen (Kähm et al., 2018), zeigt, wie wichtig eine Früherkennung eines Typ-2-Diabetes und dementsprechend eines frühen Therapiebeginns ist.

6. Zusammenfassung/Summary

Ein wichtiges Ziel in der Diabetesforschung besteht darin, Wege zu finden, den Glucosestoffwechsel von Patienten möglichst nicht invasiv und ohne großen Aufwand möglichst präzise darstellen zu können, um so eine drohende Stoffwechselentgleisung möglichst früh zu erkennen, oder aber um gezielte Angriffspunkte für die Therapie eines bereits manifesten Diabetes zu erhalten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch orale Gabe von nicht radioaktiv markierter Glucose (Isotopolog [$U^{13}C^6$]) und seriellen Messungen der Metaboliten mittels Massenspektroskopie die Ermittlung des Flusses der Glucose bzw. der Metaboliten mittels eines „Point of Care (POC) Ansatzes erfassbar zu machen. Hierzu verwendeten wir ein standardisiertes Protokoll zur Extraktion und nachfolgenden massenspektrometrischen Analytik von Isotopenverteilungsmustern der Ziel-Metaboliten Glucose und Laktat. Um aus den Isotopenverteilungsmustern quantitative Cori-Zyklus Flüsse zu gewinnen, modellierten wir diesen Zyklus mit Differentialgleichungssystemen und validierten ihn mittels Messungen über acht Stunden nach Verabreichung von 2 g isotopenmarkierter Glukose an gesunden Probanden und Patienten mit Diabetes mellitus. Im Resultat konnte ein Verfahren entwickelt werden, welches den Fluss der aufgenommenen Glucose beziehungsweise ihrer Metaboliten erfassen kann. Um in dieser Vielzahl der massenspektrometrisch erfassten Datenmesspunkte ein Muster ähnlicher Verläufe beziehungsweise Ballung von Messpunkten unter bestimmten Bedingungen zu explorieren, wurde darüber hinaus eine Clusteranalyse durchgeführt. Hierdurch konnten zwei Cluster identifiziert werden: In Cluster eins zeigten die Patienten höhere Glucosekonzentrationen und Glucoseproduktionen als in Cluster zwei. Cluster eins bestand fast vollständig aus Diabetikern; Cluster zwei aus Nicht-Diabetikern. Lediglich ein männlicher Nicht-Diabetiker zeigte ebenfalls eine erhöhte Glucoseproduktion und wurde Cluster eins zugeordnet. Dieser entwickelte zwei Jahre nach Versuchsdurchführung einen gestörten Glucosemetabolismus (= Prädiabetes). Es konnte also exemplarisch anhand eines Patienten gezeigt werden, dass anhand des Clusterings, der in der Untersuchung aus Glucoseproduktion und Glucosekonzentration modellierten Flüsse der Glucose, eine gestörte Glucosetoleranz frühzeitig noch vor klinischer Manifestation erfasst werden kann. Wir behaupten daher, dass die Sensitivität der frühen Diabetes-Diagnostik in Zukunft durch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methodik gesteigert werden könnte.

An important goal in diabetes research is finding ways to represent the glucose metabolism of patients as non-invasively as possible and with low expenditure, recognizing an impending metabolic imbalance easily or obtaining targeted points of attack for the therapy of an already manifest diabetes. The work's aim was to determine the flow of glucose or metabolites using a point of care (POC) approach through oral administration of non-radioactively labeled

glucose (Isotopolog [U13C6]) and serial measurements of the metabolites using mass spectroscopy to make tangible. Therefore, we used a standardized protocol for the extraction and mass spectrometric analysis of isotope distribution patterns of the target metabolites glucose and lactate. In order to obtain quantitative Cori cycle flows from the isotope distribution patterns, we modeled this cycle with systems of differential equations and validated it by means of measurements over eight hours after administration of 2 g of isotope-labeled glucose to individual patients and patients with diabetes mellitus. Consequently, a method could be developed which can record the flow of glucose ingested or its metabolites. In order to expose a pattern of similar courses or clustering of measuring points under certain conditions in this recorded mass spectrometric data measuring point, a cluster analysis was implemented. As a result, two clusters could be identified: Cluster one shows the patients with higher glucose concentrations and glucose productions than in cluster two. Cluster one quickly consisted entirely of diabetics; cluster two from non-diabetics. Only one male non-diabetic also showed glucose production and cluster one was increased. Two years after the experiment, this patient developed a disturbed glucose metabolism (= prediabetes). Using a patient could be exemplified that a disturbed glucose tolerance can be detected early before clinical manifestation by clustering modeled flows. Therefore, we claim that the sensitivity of early diabetes diagnosis could be increased in the future by the method presented in the present work.

7. Literaturverzeichnis

- Aerzteblatt (2018): Brustkrebs-BRCA-Mutationen-ohne-Einfluss-auf-Behandlungsergebnisse. Abgerufen am 29.12.2019 von [Aerzteblatt.de](https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/87518/Brustkrebs-BRCA-Mutationen-ohne-Einfluss-auf-Behandlungsergebnisse): <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/87518/Brustkrebs-BRCA-Mutationen-ohne-Einfluss-auf-Behandlungsergebnisse>
- AWMF (2019): S-3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. Abgerufen am 26.01.2020 von AWMF: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf
- Ayala J, Bracy D, McGuinness O, Wasserman D (2006): Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse. In: *Diabetes*. 55: 390-397
- Badertscher M (2020): Analytik-Hauptkomponentenanalyse. Abgerufen am 30.12.2020 von Eidgenössische Technische Hochschule Zürich: http://www.analytik.ethz.ch/vorlesungen/chemometrie/2_PCA_Monitor.pdf
- Bartoli E, Fra G, Carnevale S (2011): The oral glucose tolerance test (oGTT) revisited. In: *European journal of medicine*. 8-12
- Basu R, Dicke B, Rizza R, Landau B, Chandramouli V (2005): Obesity and Type 2 Diabetes Impair Insulin-Induces Suppression of Glycogenolysis as well as Gluconeogenesis. In: *Diabetes*. 54: 1942-1948
- Beck C (2015): Diabetische Spätschäden früh erkennen und behandeln. Abgerufen am 15.12.2018 von diabetesinformationsdienst-münchen: <https://www.diabetesinformationsdienst-muenchen.de/erkrankungsformen/folgeerkrankungen/index.html>
- Bhattacharjee A, Prasad SK, Pal S, Maji B, Syamal AK, Mukherjee S (2016): Synergistic protective effect of folic acid and vitamin B 12 against nicotine-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic islets of the rat. In: *Pharm Biol*. 54: 433–444
- Bundesministerium für Gesundheit (2020): Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2. Abgerufen am 06.11.2020 von [bundesgesundheitsministerium.de](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html): <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html>
- Burke A, Fitzgerald G (2003): Oxidative stress and smoking-induces vascular injury. In: *Progress in Cardiovascular Diseases*. 46: 79-90
- Capterra (2020): Castor EDC vs. OpenClinica. Abgerufen am 28.01.2020 von [Capterra.com](https://www.capterra.com/de/compare/143532/78122/castor-edc/vs/openclinica): <https://www.capterra.com/de/compare/143532/78122/castor-edc/vs/openclinica>
- Chain E (1999): Lexikon der Biologie. Insulin. Abgerufen am 12.12.2018 von [Spektrum.de](https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/insulin/34244): <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/insulin/34244>
- Constam GR (1977): Die Prognose des Diabetes. In: *Handbuch der inneren Medizin: Diabetes mellitus B*. 7 / 2 / B: 1067-1092
- Corssmita E, Sauerwein H, Endert E, Romijn J, Stouthard J (1994): Sex differences in the adaptation of glucose metabolism to short-term fasting: Effects of oral contraceptives. In: *Metabolism*. 43: 1503-1508
- Deußling G, Otleben I (2020): Effiziente Dopinganalytik per automatisierter Dried-Blood-Spot-Analyse. Abgerufen am 11.06.2021 von [laborpraxis.de](https://www.laborpraxis.vogel.de/effiziente-dopinganalytik-per-automatisierter-dried-blood-spot-analyse-a-943343/): <https://www.laborpraxis.vogel.de/effiziente-dopinganalytik-per-automatisierter-dried-blood-spot-analyse-a-943343/>
- Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), diabetes DE – Deutsche Diabetes Hilfe (2021): Diabeteskomplikationen und -Folgeerkrankungen. In: *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2021*. 69 ff
- Diabetesinformationsdienst-München (2017): Diabetes und Zähne: Erhöhtes Risiko für Parodontitis. Abgerufen am 16.12.2018 von [Diabetesinformationsdienst-München](https://www.diabetesinformationsdienst-muenchen.de/erkrankungsformen/folgeerkrankungen/diabetes-und-zaehne/index.html): <https://www.diabetesinformationsdienst-muenchen.de/erkrankungsformen/folgeerkrankungen/diabetes-und-zaehne/index.html>
- Diabetesinformationsdienst-München (2017): Hauterkrankungen bei Diabetes. Abgerufen am 16.12.2018 von [Diabetes-Informationsdienst München](https://www.diabetesinformationsdienst-muenchen.de/erkrankungsformen/folgeerkrankungen/diabetes-und-zaehne/index.html)
- English P, Williams G (2004): Hyperglycaemic crises and lactic acidosis in diabetes mellitus. In: *Postgrad Med J*. 80: 253-61
- EUPATI (2015): Molekulare Biomarker. Abgerufen am 13.12.2018 von [EUPATI](https://www.eupati.eu/de/glossary/molekulare-biomarker/): <https://www.eupati.eu/de/glossary/molekulare-biomarker/>

- Frati A, Iniestra F, Ariza C (1996): Acute effect of cigarette smoking on glucose tolerance and other cardiovascular risk factors. In: *Diabetes Care*. 19: 112-118
- Gallwitz B, Krüger J (2017): Gesundheitsbericht Diabetes 2017 - Erreichtes und Unerreichtes. In: *Deutscher Diabetesbericht 2017*. 5-9
- Gerich J, Meyer C, Woerle H, Stummvoll M (2001): Renal Gluconeogenesis. In: *Diabetes Care*. 24: 382-391
- Gokhale V, Jagdale N, Batra T (2017): A study of waist circumference, waist-hip ratio as markers of type 2 diabetes mellitus and their correlation with family history of diabetes. In: *International Journal of Research in Medical Sciences*. 5: 70-74
- Gressner A, Torsten A (2019): *Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 643 ff
- Gutthoff M (2007): -866G/A Polymorphismus in der Promotorregion von Uncoupling Protein 2 – Auswirkung auf den Glucosemetabolismus. Abgerufen am 01.11.2018 von Internetseite Uni Tübingen: https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/bitstream/handle/10900/45033/pdf/Doktorarbeit_endg_374ltig_Ver_366ffentlichung.pdf?sequence=1
- Harris P, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde J (2009): Research electronic data capture (REDCap®) – A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *Journal of Biomedical Informatics*. 42: 377-381
- Hartwig W, Biesalski H, Druml W, Fürst P, Weimann A (2004): Hungerstoffwechsel. In: *Ernährungs- und Infusionstherapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 109-110
- Heidemann C, Scheidt-Nave C (2017): Prävalenz, Inzidenz und Mortalität von Diabetes mellitus bei Erwachsenen in Deutschland-Bestandsaufnahme zur Diabetes-Surveillance. In: *Journal of Health Monitoring*. 2: 105-129
- Heidemann C, Kroll L, Icks A, Scheidt-Nave C, Lampert T (2009): Prevalence of known diabetes in German adults aged 25-69 years: results from national health surveys over 15 years. In: *Diabetic Medicine*. 6: 655-658
- Herold G (2015): *Innere Medizin*. Köln. 719 ff
- Hien P, Böhm B (2013): *Labordiagnostik*. In: *Diabetes-Handbuch*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag: 5-11
- Hill C, Drolet J, Kellogg M D, Tolsikov V, Narain Niven R, Kiebish M A (2017): Blood Sampled Through Dried Blood Spots (DBS) Exhibits Diminished Ex vivo Metabolism Compared to Whole Blood Through Use of a Kinetic Isotope-Labeling Metabolomics Approach. In: *Biochem Anal Biochem, an open access journal*. 2
- Hinghofer H: *Physiologie des Insulinsystems*. Abgerufen am 24.06.2019 von Internetseite Physiologie cc.: <http://physiologie.cc/V.2.htm>
- IDF (2021): Estimated age-adjusted comparative prevalence of diabetes in adults aged 20–79 years in 2021. In: *IDF Diabetes Atlas 2021 – 10th edition*. 9
- Jacobs E (2017): Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data From 65 Million People in Germany. In: *Diabetes Care*. 40: 1611-1613
- Justus-Liebig-Universität-Gießen (2019): *Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und GC-Combustion-IRMS (GCC-IRMS)*. Abgerufen am 24.06.2019 von Justus-Liebig-Universität Gießen: <https://www.uni-giessen.de/fbz/fsp/meu/methodenplattform/analysen1/GC-MS>
- Kähm K, Laxy M, Schneider U, Rogowski W, Lahchimi S, Holle R (2018): Health Care Costs Associated with Incident Complications in Patients with Typ 2 Diabetes in Germany. In: *Diabetes Care*. 5: 971-978
- Karger S (1984): Die euglykämische Insulin- und hyperglykämische Clamp-Technik. Abgerufen am 30.10.2018 von [karger.com](https://www.karger.com/Article/Pdf/221622): <https://www.karger.com/Article/Pdf/221622>
- Karow T (2017): *Diabetes mellitus Typ 2*. In: *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*. 25.Auflage. 673-67
- Kautzky-Willer, A (2016): Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. In: *Endocr Rev.* 3: 278-316

- k-labor (2020): GC/MS-Analyse (Gaschromatographie/Massenspektrometrie). Abgerufen am 07.11.2020 von k-labor.de: <https://k-labor.de/gc-ms-analyse-gaschromatographie-massenspektrometrie/>
- Klapa M (2008): Standardizing GC–MS metabolomics. In: *Journal of Chromatography B*. 871: 191-201
- Kottmann T (2019): S-3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. Abgerufen am 26.01.2020 von AWMF: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-007OLI_S3_Kolorektales-Karzinom-KRK_2019-01.pdf
- Krämer L, Jäger C, Trezzi J, Jacobs D, Hiller K (2018): Quantification of Stable Isotope Traces Close to Natural En-richment in Human Plasma Metabolites Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In: *Metabolites*. 1: 15
- Lüthgens KJ (2019): Screening auf Gestationsdiabetes. Abgerufen am 20.01.20 von Labor Enders: <https://www.labor-enders.de/2019/12/17/gdm-screening/>
- Landau B (1996): Contributions of Gluconeogenesis to Glucose Production in the Fasted State. In: *The Journal of Clinical Investigation*. 98: 378-385
- Leyer I, Wesche K (2007): Hauptkomponentenanalyse (PCA). In: *Multivariate Statistik in der Ökotrophologie*. 105-123
- Libby P (2002). Inflammation and Atherosclerosis. In: *Circulation*. 105: 1135
- Lichtinghagen R (2018): Klinische Chemie. Abgerufen am 22.09.2018 von Medizinische Universität Hannover: https://www.mh-hannover.de/fileadmin/institute/klinische_chemie/downloads/fh-vorlesung6.pdf
- Lungcancergroup (2018): Treibermutationen. Abgerufen am 08.11.2019 von lungcancergroup: <https://lungcancergroup.de/molekularpathologie/treibermutationen>
- Magnusson I, Rothman D, Katze L, Shulman R, Shulman G (1992): Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. In: *The Journal of Clinical Investigation*. 4: 1923-1927
- Meisinger C, Heier M, Doering A, Thorand B, Loewel H (2004): Prevalence of Known Diabetes and Antidiabetic Therapy Between 1984/1985 and 1999/2001 in Southern Germany. In: *Diabetes Care*: 2985-2987
- Michaelis D, Jutzi E (1991): Epidemiologie des Diabetes mellitus in der Bevölkerung der ehemaligen DDR: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz- und Prävalenzrends im Zeitraum 1960-1987. In: *Zeitschrift für Klinische Medizin*. 46: 59-64
- Microsoft (2019): Erstellen eines Datenmodells in Excel. Abgerufen am 28.01.2020 von Support.office: <https://support.office.com/de-de/article/erstellen-eines-datenmodells-in-excel-87e7a54c-87dc-488e-9410-5c75dbcb0f7b>
- Müller-Wieland (2018): S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes. Abgerufen am 17.04.2021 von awmf online.de: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/057-013I_S3-Therapie-Typ-1-Diabetes_2018-08.pdf
- Nauck M, Petermann A, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, ... Heinemann, L. (2019): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes. In: *Diabetologie*. 15: 128-134: <https://doi.org/10.1007/s11428-019-0460-1>
- Nauck M, Petermann A, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, ... Heinemann, L. (2017): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes. In: *Diabetologie und Stoffwechsel, Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft*. 12: 94-100.
- Neufang-Sahr A, Scherbaum W, Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut Düsseldorf (2003): Was ist eine Makro- bzw. Mikroangiopathie? Abgerufen am 18.12.2018 von Diabetes-Deutschland: <https://www.diabetes-deutschland.de/archiv/4654.html>
- Neumaier M (2015): Aktualisierte Anforderungen an die Messqualität und Qualitätssicherung (QS) von Point-of-Care-Testing (POCT)-Blutglukose-Messsystemen mit Unit-use Reagenzien, die für die Erstdiagnostik eines manifesten Diabetes in der Schwangerschaft oder eines Gestationsdiabetes mellitus (GDM) gemäß der GDM-Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) geeignet sind. Abgerufen am 12.01.2020 von deutsche-diabetes-gesellschaft: http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Stellungnahmen/2015/Aktualisierte_Anforderungen_andie_Messqualität_..._TK_2015_2_10.pdf

- Ogihara M (2012): Effects of nifedipine and nircadipine on glucagon-stimulated glucoegeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. In: Japanese journal of Pharmakology. 59: 413-416
- Patent.de (2006): Verfahren und System zur Untersuchung des Glucosestoffwechsels. Abgerufen am 26.01.2020 von Patent.de: <http://www.patent-de.com/20060928/DE102005011755A1.html>
- Polonsky K (2012): The past years in diabetes. In: N Engl J Med. 14: 1332-1340
- Profil I (2020): Methodology fact sheet: Hypoglycemic glucose clamp studies. Abgerufen am 26.01.2020 von Profil. Answers fo diabetes.: https://cdn2.hubspot.net/hubfs/481167/PROFIL%20Hypoglycemic%20glucose%20clamp%20studies%20Fact%20Sheet%202019%20DIGITAL.pdf?__hssc=102478878.1.1580115579063&__hstc=102478878.6fe3b5e33d20122d5e9b5fa7cd271c0e.1580115579063.1580115579063.1580115579063.1&__hs.
- REDCap® (2018): REDCap®. Abgerufen am 25.06.2019 von Project-redcap.org. REDCap®: <https://www.project-redcap.org>
- Renz-Polster H, Krautzig S (2013): Stoffwechsel. In: Basislehrbuch Innere Medizin kompakt: 743
- Renz-Polster H, Krautzig (2013): Stoffwechsel. In: Basislehrbuch Innere Medizin kompakt. 5. Auflage. 747 ff
- Richter E A, Kiens B, Saltin B, Christensen N J, Savard G (1988): Skeletal muscle glucose Uptake during dynamic exercise in humans: role of muscle mass. In: Endocrinology and Metabolisme. 5: E 555 – E 561
- Rincon J, Krook A, Galuska D, Wallberg-Henriksson H, Zierath J (1999). Altered skeletal muscle glucose transport and blood lipid levels in habitual cigarette smokers. Clinical Physiology. 19: 135-142
- Rudloff S (2020): Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und GC-Combustion-IRMS (GCC-IRMS). Abgerufen am 07.11.2020 von Internetseite Justus-Liebig-Universität Gießen: <https://www.uni-giessen.de/fbz/fsp/meu/methodenplattform/analysen/1/GC-MS>
- RKI (2018): Studie DEGS1, Erhebung 2008-2011. Abgerufen am 20.07.2018 von RKI: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html
- Schäffler A (2018). Funktionsdiagnostik. In: Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. 4. Auflage. Gießen. 7ff
- Schatz H, Pfeiffer A (2014): Diabetologie kompakt. 4 Auflage. Springer Verlag.1-22 und 100-106
- Scheckenbach K (2018): Radiomics: Big Data statt Biopsie in der Zukunft? Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Düsseldorf. In: Laryngo-Rhino-Otologie. 97: 1-15
- Scherbaum W (2018): Häufigkeit des Diabetes mellitus. Abgerufen am 12.12.2019 von Diabetes-Deutschland: <http://www.diabetes-deutschland.de/archiv/796.html> abgerufen
- Schilling W.H., Herberg L, Jahnke K, Hüter K.A. (1969): Das Verhalten der freien Fettsäuren unter intravenöser Glucosebelastung bei graviden und nicht graviden Patientinnen mit Symptomen eines potentiellen Diabetes mellitus. In: Diabetologia. 5: 34-41
- Schleicher E; Gerdes C, Petersmann A, Müller-Wieland D et al. (2021): Praxisempfehlungen der Deutschen Diabetes Gesellschaft. In: Diabetologie und Stoffwechsel. 16: 110-118
- Schmidt M (1992): Association of waist-hip ratio with diabetes mellitus. Strength and possible modifiers. In: Diabetes Care. 15: 912-914
- Siegmund T, Gutt B, Stock T, Dodt C, Schumm-Draeger P: Hyperglykämie-management in der Klinik: Review und praktisches Vorgehen. Abgerufen am 11.12.2021 von arzneimitteltherapie.de: <https://www.arzneimitteltherapie.de/heftarchiv/2009/02/hyperglykämie-management-in-der-klinik-review-und-praktisches-vorgehen.html>
- Soeters M (2007): Gender-Related Differences in the Metabolic Response to Fasting. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 9: 3646–3652

- Steckelings U (2011): Der AT₂-Rezeptor: Untersuchungen zu Expression, physiologischen Wirkungen und zum therapeutischen Potential einer pharmakologischen Stimulation. Habilitationsschrift. FU Berlin
- Stojkovikj J, Zafirova-Ivanovska B, Kaeva B, Anastasova S, Angelovska I, Jovanovski S, Stojkovikj D (2016): The Prevalence of Diabetes Mellitus in COPD Patients with Severe and very Severe Stage of the Disease. In: Open Access Maced J Med Sci. 4: 253-258
- Thefeld W (1999): Prävalenz des Diabetes mellitus in der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands. In: Gesundheitswesen. 61: 85-89
- Trezzi JP, Jäger C, Galozzi S, Barkovičs K, Marcus K, Mollenhauser B, Hiller K (2017): Metabolic profiling of body fluids and multivariate data analysis. In: MethodsX. 4: 95-103
- Urbach D (2012): MSTFA und MSTFA-D9-unverzichtbare Werkzeuge für die massenspektrometrische Strukturaufklärung. In: Toxichem Krimtech. 79: 137
- Vogel M (2019): Isotope. Abgerufen vom 30.05.2019 von chemie.de: <https://www.chemie.de/lexikon/Isotop.html>
- Vogel M. (2019): GC/MS. Abgerufen am 13.06.2019 von chemie.de: <https://www.chemie.de/lexikon/GC%2FMS.html>
- Vrijens B, Vincze G, Kristanto P, Urquhart J, Burnier M (2008): Adherence to prescribed anti-hypertensive drug treatments: longitudinal study of electronically compiled dosing histories. In: Bmj. 336: 1114-1117
- Wajngot A (2001): Quantitative contributions of gluconeogenesis to glucose production during fasting in type 2 diabetes mellitus. In: Metabolism. 50: 42-47
- Wang B, Goode J, Best J, Meltzer J, Schilman P, Chen J, ..., Montminy M (2008): The Insulin-Regulated CREB Coactivator TORC Promotes StressResistance in Drosophila. In: Cell Metab.. 7: 434-444
- Whitaker R (1975): A historical note on the conservation of mass. 52. 658-659
- Wolf G, Stahl R (1996): Angiotensin-II-Wirkungen an der Niere: mehr als ein Vasokonstriktor. In: Deutsches Ärzteblatt. 93: A-2039-A2042
- World-Health-Organization (2008): Waist Circumference and Waist-Hip-Ratio. 34. Report of a WHO Expert Consultation. World-Health-Organization. Geneva
- World-Health-Organization (2016): Global report on diabetes. Geneva: World Health Organization
- Wutke, L (2020): Clusteranalyse einfach erklärt. Angerufen am 01.01.2021 von datasolut.de: <https://datasolut.com/wiki/clusteranalyse/>

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cori-Zyklus

Quelle: Medizinische Physiologie der Leberfunktion: Rolle der Leber für Energiehaushalt und Substrat-Interkonversion. In: Internetseite Physiologie. URL: <http://physiologie.cc/III.5.html>
Abruf am 13.12.2018

Abbildung 2: Acanthosis nigricans

Quelle: Internetseite Omics International. URL: <https://www.omicsonline.org/india/acanthosis-nigricans-peer-reviewed-pdf-ppt-articles/>
Abruf am 14.12.2018

Abbildung 3: Necrobiosis lipoidica der Unterschenkel.

Quelle: Peckruhn, M., Tittelbach, J. and Elsner, P. (2017), Update: Treatment of necrobiosis lipoidica. JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. 15: 151-157

Abbildung 4: Personen mit Diabetes (55 - 74 Jahre): Schätzungen des DDZ (= Deutsches Diabetes-Zentrum zufolge werden 2030 3,9 Millionen Personen in der Altersgruppe der 55 bis 74-Jährigen an Typ-2-Diabetes erkrankt sein (Männer: 2,3 Mio., Frauen: 1,6 Mio.).

Quelle: Jacobs E (2018): Personen mit Diabetes (55-74 Jahre). In: Internetseite diabetesinformationsdienst. URL: <https://diabetesinformationsdienst.de/entwicklung-des-diabetes-deutschland-dramatischer-als-bisher-erwartet/>
Abruf am 30.12.2019

Abbildung 5: Verbreitung von diagnostiziertem Diabetes mellitus – Anteile an der gleichaltrigen Bevölkerung, aufgeschlüsselt nach Altersgruppen sowie nach Sozialstatus

Quelle: © Robert Koch-Institut (2016). Studie DEGS1. Erhebung 2008–2011. In: Internetseite Robert Koch-Institut. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/Diabetes/Diabetes_node.html
Abruf am 14.12.2018

Abbildung 6: Geschätzte altersbereinigte Diabetesprävalenz bei Erwachsenen (20 bis 79 Jahre) für 2017.

Quelle: International Diabetes Federation (2017): Geschätzte altersbereinigte Diabetesprävalenz bei Erwachsenen (20 bis 79 Jahre) für 2017. In: Internetseite diabetes-online.de. URL: <https://www.diabetes-online.de/rechteck/a/idf-diabetes-atlas-aktuelle-zahlen-zur-globalen-diabetes-pandemie-1852724>
Abruf am 16.12.2019

Abbildung 7: Blutzuckersenkende Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2.

Quelle: Wiener Wochenschrift (2019): Blutzuckersenkende Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2. In: Antihyperglykämische Therapie bei Diabetes mellitus Typ 2 (Update 2019). 131: 37 - 38

Abbildung 8: Wirkmechanismus der oralen Antidiabetika

Quelle: Karow T et al.: Diabetes mellitus Typ 2. In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis. 25. Auflage. 656-666

Abbildung 9: Glucose-Peroxidase-Reaktion

Quelle: Jvo Siegrist: Enzymatic food analysis. In: Internetseite Sigma-Aldrich. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/enzymatic-foodanalysis.html>
Abruf am 01.11.2018

Abbildung 10: FORA Diamond Mini: Das in der Studie verwendete Blutzuckermessgerät (FORA Diamond Mini) verwendet die Glucose-Peroxidase-Reaktion zur Messung der Blutglucosekonzentrationen

Quelle: Gdanietz I et al. (2013): Blutzucker messen mit dem FORA Diamond Mini. In: Internetseite [mein-diabetes-blog.com](http://www.mein-diabetes-blog.com). URL: <http://www.mein-diabetes-blog.com/blutzucker-messen-mit-fora-diamond-mini/>

Abbildung 11: Blutzuckerspiegel bei Blutzucker-Belastungsprobe. Im Vergleich zum Gesunden findet man beim Zuckerkranken: einen höheren Ausgangswert, einen höheren Anstieg, einen langsameren Abfall.

Quelle: Hübl W (2014): Blutzucker-Belastungsprobe (oraler Glucosetoleranz-Test, oGTT) – Übersicht. In: Internetseite [med4you](https://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef__blutzuckerbelastung.htm). URL: https://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef__blutzuckerbelastung.htm

Abruf am 29.12.2019

Abbildung 12: Tablet und passendes Glucometer

Abbildung 13: Filterkarten mit Aluminiumbeutel, SilicaGel, Glucose, Lanzetten, Wasserflaschen und Tupfer

Abbildung 14: Etikett für die Trockenblutkarten: Es handelt sich um ein Etikett für die erste Blutentnahme nach Versuchsbeginn (T1) des Patienten mit der Patienten-ID 2016092003

Abbildung 15: Stabilisierung der Derivate nach Methoxyaminierung in E- und Z-Form

Quelle: MISB Analytics Tutorial I (2016): 2-Step-derivatization

Abbildung 16: Beispielhafte Reaktion von MSTFA mit einem Alkohol unter Bildung von TMS

Quelle: Dieter Urbach (2012): MSTFA und MSTFA-D9 – unverzichtbare Werkzeuge für die massenspektrometrische Strukturaufklärung. In: Toxichem Krimtech 2012. 79: 137

Abbildung 17 a und b: Aufbau eines Gaschromatographen mit Einlass, Ofen und Detektor (a) und Autoinjektor (b). Quelle: Agilent Technologies (2010): Agilent 7890A Gaschromatograf. In: Internetseite Agilent Technologies. URL: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3430-92011.pdf>

Abruf am 08.07.2019

Abbildung 18: Cori-Zyklus-Flüsse. Nach der oralen Aufnahme der markierten Glucose besteht der „Glucosepool“ im Blut aus nicht markierten und markierten (nicht radioaktiven, in der Natur vorkommenden) Glucose-Isotopologen. Durch Glykolyse in Organen (z. B. Muskeln) wird die Glucose in zwei markierte Laktatmoleküle umgewandelt. Diese gelangen wieder zurück in den Blutkreislauf und werden irgendwann in der Leber in neue Glucosemoleküle zurückkonvertiert

Abbildung 19: Differenzialgleichungssystem zur Differenzierung des Cori-Zyklus

Quelle: Trezzi J (2014): Système d'équations différentielles pour la modélisation du cycle de Cory. Université du Luxembourg

Abbildung 20: Clustering der Patienten je nach Gluconeogeneserate bzw. Glucoseproduktion. Alle Patientin aus Cluster eins (grün) waren Kontrollpersonen. In Cluster zwei (rot) sind nur Typ-2-Diabetiker dargestellt

Abbildung 21: Positive Korrelation zwischen den Mittelwerten der Glucosekonzentrationen bei der Messmethoden über die gesamte Messdauer in der gesamten Kohorte

Abbildung 22 a und b: Mittlere Gluconeogeneserate (a) und mittlere Glucoseproduktion (b); aufgeteilt nach untersuchter Patientengruppe (= Typ-1-Diabetiker, Typ-2-Diabetiker, Kontrollpersonen)

Abbildung 23 a und b: Kein signifikanter Unterschied in der mittleren Gluconeogeneserate, sowohl beim weiblichen (a), als auch beim männlichen (b) Geschlecht

Abbildung 24: Positive Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und mittlerer Gluconeogeneserate unter den Typ-2-Diabetikerinnen

Abbildung 25 a und b: Probanden, die einen regelmäßigen Nikotinkonsum angaben, zeigten eine signifikant erhöhte Laktatproduktion (a). Dieser Zusammenhang gilt insbesondere für die Gruppe der weiblichen Typ-2-Diabetiker (b)

Abbildung 26: Probanden, die eine tägliche Calciumantagonisten-Einnahme angaben, zeigten eine signifikant erhöhte durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration

Abbildung 27 a und b: Typ-2-Diabetiker, die eine tägliche Calciumantagonisten-Einnahme angaben, zeigten eine signifikant erhöhte durchschnittliche mittlere Glucosekonzentration

Abbildung 28: Signifikant erhöhte mittlere Laktatproduktion unter Sartan-Einnahme in der Gruppe der männlichen Typ-2-Diabetiker

Abbildung 29 a-c: Signifikant erhöhter Taillen- und Hüftumfang der Typ-2-Diabetikerinnen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe (a und b), sowie signifikant erhöhtes Waist-to-Hip-Ratio der Typ-2-Diabetikerinnen gegenüber der weiblichen Kontrollgruppe (c)

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mögliche Folgen einer Diabetes-Erkrankung

Quelle: Libby P (2002): Inflammation and Atherosclerosis. In: Circulation. 105: 1135

Tabelle 2: Aufteilung der Kohorte nach Diabetes-Typ, Alter und Geschlecht

Tabelle 3: Erhobene Laborwerte vor Studienteilnahme

Tabelle 4: Benötigte Materialien und Reagenzien zur Weiterverarbeitung der Proben

Tabelle 5: Vorbereitung der Kalibrierungskurven: Pipettierschema

10. Anhang

Eine Übersicht über die klinischen Charakteristika der Kohorte findet sich in Tabelle 6-9. Alle Parameter wurden in vier Klassen aufgeteilt (Anthropometrische Daten, Laborparameter, Lebensführung, Medikation).

Tabelle 6: Erhobene Anthropometrische Daten der Patienten.

Diabetes-Typ	Geschlecht			Erkrankungsdauer	BMI	WHR	Geschlecht	Gewicht	Größe	Bauchumfang	Hüftumfang	Alter zum Untersuchungzeitpunkt
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	25	25	24	25	25	25	25	24	25
			fehlend	0	0	1	0	0	0	0	1	0
	Weiblich	N	gültig	17	17	17	17	17	17	17	17	17
			fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	3	4	4	3	4	4	3	3	4
			fehlend	1	0	0	1	0	0	1	1	0
	Weiblich	N	gültig	9	12	12	11	12	12	11	11	12
			fehlend	3	0	0	1	0	0	1	1	0

Tabelle 7 a-d: Erhobene Laborparameter der Patienten

Diabetes-Typ	Geschlecht			HbA1c	TSH	Triglyceride	LDL	HDL	Y-YT	GPT	Lipase
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	23	10	19	18	17	20	15	9
			fehlend	21	15	6	7	8	5	10	16
	Weiblich	N	gültig	16	8	13	11	11	14	10	8
			fehlend	1	9	4	6	6	3	7	9
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	0	0	1	1	1	0	0	0
			fehlend	4	4	3	3	3	4	4	4

	Weiblich	N	gültig	4	5	8	5	5	6	6	2
			fehlend	8	7	4	7	7	6	6	10

Diabetes-Typ	Geschlecht			Amylase	GOT	Leukozyten	Neutrophile	Erythrozyten %	Eosinophile	Basophile %	Basophile
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	9	13	16	7	7	7	7	7
			fehlend	16	12	9	18	18	18	18	18
	Weiblich	N	gültig	7	9	14	6	6	6	6	6
			fehlend	10	8	3	11	11	11	11	11
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	0	0	1	0	0	0	0	0
			fehlend	4	4	3	4	4	4	4	4
	Weiblich	N	gültig	2	3	6	3	3	2	3	2
			fehlend	10	9	6	9	9	10	9	10

Diabetes-Typ	Geschlecht			Neutrophile %	Lymphozyten %	Lymphozyten	Monozyten	Hb	MCV	Hämatokrit	RDW
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	7	7	7	7	18	18	18	16
			fehlend	18	18	18	18	7	7	7	9
	Weiblich	N	gültig	6	6	6	6	15	15	15	15
			fehlend	11	11	11	11	2	2	2	2
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	0	0	0	0	1	1	1	0
			fehlend	4	4	4	4	3	3	3	4

	Weiblich	N	gültig	2	3	2	2	7	9	8	4
			fehlend	10	9	10	10	5	3	4	8

Diabetes-Typ	Geschlecht			MCH	Thrombozyten	Vitamin D	MCH C	Monozyten %	Erythrozyten	Cholesterin Total	GFR
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	17	18	3	18	7	16	18	20
			fehlend	8	7	22	7	18	9	7	5
	Weiblich	N	gültig	15	15	5	15	6	14	13	12
			fehlend	2	2	12	2	11	3	4	5
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	1	1	0	1	0	1	1	1
			fehlend	3	4	4	3	4	3	3	3
	Weiblich	N	gültig	6	8	2	9	3	8	9	7
			fehlend	6	4	10	3	9	4	3	5

Diabetes-Typ	Geschlecht			Kreatinin	C-Peptid	Nüchtern-Plasmaglucose
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	21	8	12
			fehlend	4	17	13
	Weiblich	N	gültig	17	5	11
			fehlend	0	12	6
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	1	0	1
			fehlend	3	4	3
	Weiblich	N	gültig	9	2	8
			fehlend	3	10	4

Tabelle 8: Erhobene Daten zur Lebensführung der Patienten

Diabetes-Typ	Geschlecht			Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Diät seit Diagnosestellung	Ernährungsstellung	Gewichtsverlust seit Diagnosestellung	Beruflich empfundener Stress	Sport	Privat empfundener Stress
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	gültig	25	25	25	25	25	25	25	25
			fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0
	Weiblich	N	gültig	17	17	17	17	17	17	17	17
			fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrollgruppe	Männlich	N	gültig	4	4	4	4	4	4	4	4
			fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0
	Weiblich	N	gültig	12	12	12	12	12	12	12	12
			fehlend	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9 a-c: Erhobene Daten zur Medikation der Patienten.

a

Diabetes-Typ	Geschlecht			Biguanide	Sulfonylharnstoffe	Sulfonylharnstoff-Analoga	GLP-1-Agonisten	DDP-4-Inhibitoren	Insulin	Beta-blocker	Diuretika
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	Ja	10	3	0	3	7	3	11	3
			Nein	14	21	24	21	17	20	13	21
	Weiblich	N	Ja	6	1	1	0	6	3	3	6
			Nein	16	16	16	16	10	13	13	10
Kontrollgruppe	Männlich	N	Ja	0	0	0	0	0	0	2	0
			Nein	4	4	4	4	4	0	2	4
	Weiblich	N	Ja	0	0	0	0	0	0	1	1
			Nein	12	12	12	12	12	0	11	11

b

Diabetes-Typ	Geschlecht			Calciumantagonisten	Sartane	Reninhibitoren	Parasympatholytika	Zentrale Alpha-Agonisten	Corticoide	β2-Sympathomimetika	SSRI:
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	Ja	11	9	1	2	1	2	2	0
			Nein	13	15	23	22	23	22	14	24
	Weiblich	N	Ja	2	4	0	0	9	2	1	0
			Nein	14	12	16	16	7	14	13	16
Kontrollgruppe	Männlich	N	Ja	1	1	0	0	0	0	0	1
			Nein	3	3	4	4	4	4	4	3
	Weiblich	N	Ja	1	2	0	0	0	0	0	1
			Nein	11	10	12	12	12	12	12	12

c

Diabetes-Typ	Geschlecht			NAS SA	Benzodiazepine	Trizyklische Antidepressiva	Hypnotika	Atypische Neuroleptika	Antikonvulsiva	L-Thyroxin
Typ-2-Diabetes	Männlich	N	Ja	2	0	3	0	0	3	3
			Nein	22	24	21	24	24	21	21
	Weiblich	N	Ja	0	2	0	3	1	3	4
			Nein	16	14	16	13	15	13	12
Kontrollgruppe	Männlich	N	Ja	0	0	0	0	0	0	0
			Nein	4	4	4	4	4	4	4
	Weiblich	N	Ja	1	0	2	0	0	0	3
			Nein	12	12	10	12	12	12	9

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Jochen Schneider, der mir mit all meinen Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand und der auch mit seiner konstruktiven Kritik immer wieder für sinnvolle Denkanstöße sorgte.

Auch gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meiner Zwillingsschwester Franziska und meiner Mutter Ulrike, die mir oft Mut zusprachen und mich immer und immer motivierten sorgfältig und gewissenhaft meinen Weg zu gehen und das Ziel auch nicht im Berufsalltag aus den Augen zu verlieren.

Abschließend danke ich auch den Studienteilnehmern, die unentgeltlich oft sehr viel Zeit auf sich nahmen, um an der Studie teilzunehmen. Ohne sie wäre die Studie in dieser Art und Weise wohl nicht durchführbar gewesen.

12. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 05.09.2022
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med Michael Menger
Berichterstatter: Prof. Dr. med Jochen Schneider
Prof. Dr. Ulrich Boehm