

Aus der Klinik für Diagnostische Radiologie
Direktor Prof. Dr. med. M. Heller
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**NICHT-INVASIVE MUSKELSPEZIFISCHE QUANTIFIZIERUNG DES
INTRAZELLULÄREN TRIGLYZERIDGEGHALTS MITTELS
¹H-MAGNETRESONANZ-SPEKTROSKOPIE**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

ANATOL MÖLLER

aus Berlin

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Glüer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hellmig

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Oktober 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 6. Oktober 2009

gez. Prof. Dr. Heller
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition und Klinik des metabolischen Syndroms	1
1.2	Fettstoffwechsel in der Leber und im Muskel	2
1.3	Genetische Aspekte des metabolischen Syndroms	4
1.4	Fragestellungen der Studie	5
2	Methoden und Probandenkollektiv	7
2.1	Theoretische Grundlagen	7
2.1.1	Grundlagen der lokalisierten ¹ H-Magnetresonanzspektroskopie	7
2.1.2	MRS der intra- und extrazellulären Triglyzeride im Muskel	11
2.2	Messverfahren	14
2.2.1	Benutzte MRT-Hardware	14
2.2.2	Messprotokoll am Musculus soleus	14
2.2.3	Dekonvolution der Spektren	15
2.2.4	Kurvenanpassung	16
2.2.5	Quantifizierung	18
2.2.6	Statistik	18
2.3	Probandenkollektiv	19
2.3.1	Phänotypen	19
2.3.2	Genotypen: Intestinales Fatty Acid Binding Protein	20
2.3.3	Intervention	20
3	Ergebnisse	22
3.1	Charakteristika des Probandenkollektivs	22
3.2	MRS-Charakterisierung ohne Intervention	23
3.2.1	MRS-Charakterisierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Phänotyp	23
3.2.2	MRS-Charakterisierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp	24

3.3	MRS-Charakterisierung nach Intervention	25
3.3.1	MRS-Charakterisierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp nach Intervention mit mittelkettigen Fettsäuren	25
3.3.2	MRS-Charakterisierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp nach Intervention mit langkettigen Fettsäuren	26
4	Diskussion	28
4.1	Phänotyp	28
4.2	Genotyp vor Intervention	29
4.3	Genotyp nach Intervention	30
4.4	Vor- und Nachteile des Musculus soleus bei der MRS	32
4.5	Probandenkollektiv	35
5	Zusammenfassung und Ausblick	37
6	Literaturverzeichnis	38
7	Anhang	41
7.1	Danksagung	41
7.2	Lebenslauf	42

1 Einleitung

1.1 Definition und Klinik des metabolischen Syndroms

Das metabolische Syndrom oder Syndrom X ist als ein Symptomenkomplex aus androider Fettsucht, gestörtem Kohlenhydratwechsel (Insulinresistenz, pathologischer oraler Glukose-Toleranztest oder Diabetes mellitus Typ II), Hypertriglyzeridämie und arteriellem Hypertonus definiert [1, 2]. Die Ursache des metabolischen Syndroms ist ein multifaktorielles Geschehen, bedingt durch Lebensgewohnheiten, Lebensstil und die Gene.

Durch die Insulinresistenz von Muskel, Fett und Leber kommt es zu einer Hyperinsulinämie, die in der Niere zu einer vermehrten Na^+ -Rückresorption am distalen Tubulus, zu einer Sympathikusaktivierung des autonomen Nervensystems und zu einer verminderten Synthese von Prostaglandinen im Fettgewebe führt. In der Leber kommt es zu einer kompensatorischen Überproduktion von Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) mit Folge einer Dyslipidämie. Insgesamt wird durch diese komplexen Mechanismen ein arterieller Hypertonus induziert, der im Zusammenspiel mit der Dyslipidämie und der Hyperglykämie die Arteriosklerose fördert. Schematisch sind diese Vorgänge in der Abb. 1 vereinfacht dargestellt.

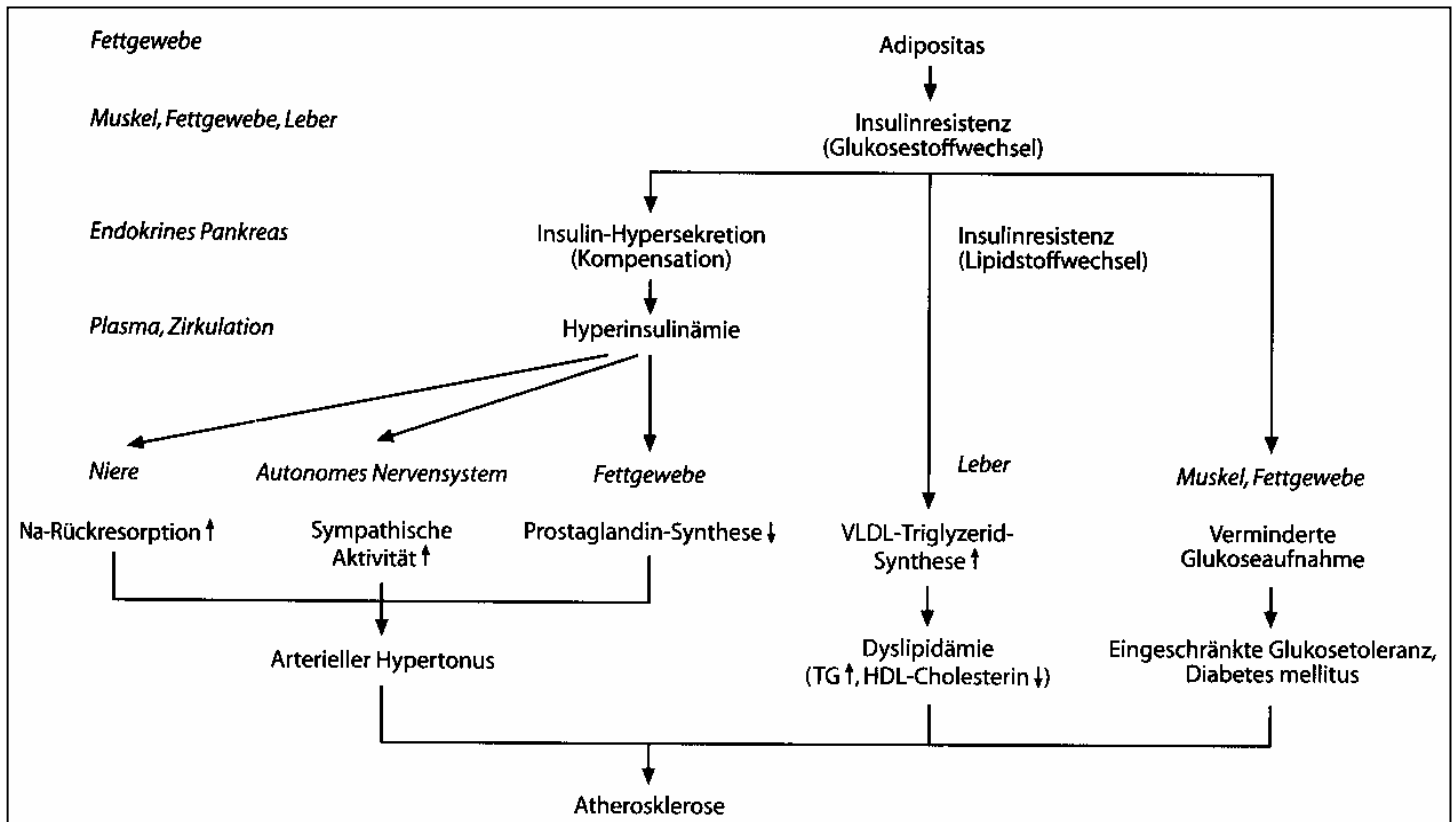


Abb. 1: Schematische Darstellung der pathophysiologischen Abläufe, die zum metabolischen Syndrom führen können [3]

Langfristige Folgen dieser pathophysiologischen Veränderungen können Minderdurchblutungen der Organe mit entsprechenden Fehlfunktionen sein wie z. B. ein Apoplex und/oder weitere Begleiterkrankungen [3] [4].

1.2 Fettstoffwechsel in der Leber und im Muskel

Neben Kohlenhydraten und Proteinen werden auch Fettsäuren in der Darmmucosa aufgenommen. Fettsäuren lassen sich durch ihre Kettenlänge in langkettige Fettsäuren (LCT) mit mehr als 12 Kohlenstoffatomen und mittelkettige Fettsäuren (MCT), deren Kettenlänge zwischen 6 und 12 Kohlenstoffatomen liegt, differenzieren. Langkettige Fettsäuren werden im Darm durch Pankreaslipasen gespalten und als Micellen, die aus Gallensäuren gebildet werden, in die Mukosa aufgenommen. In der Mukosa werden die LCT an das intestinale Fettbindungsprotein (FABP) gebunden, bevor sie als Chylomikronen über die Lymphe durch den Ductus thoracicus ins Blut gelangen. Die zentrale Aufgabe der Fettbindungsproteine ist, hauptsächlich langkettige Fettsäuren (LCT) zu binden und an der basalen Seite der Darmmucosa als Chylomikronen abzugeben [5]. Mittelkettige Fettsäuren werden im Darm unverändert aufgenommen und gelangen unverändert in die Blutzirkulation. Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan regelt die Versorgung des extrahepatischen Gewebes, zu dem auch die Skelettmuskulatur zählt. Neben den zum Teil aus Chylomikronen hydrolysierten Fettsäuren erfolgt der Transport von Fettsäuren zum peripheren Gewebe durch Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL), aus denen durch die Lipoprotein-Lipase Fettsäuren freigesetzt werden. Die dabei entstandenen Remnants werden von der Leber wiederaufgenommen und können durch weitere Triglyzeridhydrolyse zu Low-Density-Lipoproteinen konvertieren, die der Cholesterinversorgung dienen. Die Leber speichert Glucose als Glykogen unter dem Einfluß von Insulin, und entsprechend dem Energiebedarf des extrahepatischen Gewebes wird die Glucose wieder ins Blut abgegeben.

In den Zellen werden die Fettsäuren durch eine dreifache Veresterung mit Glycerol als Tricarbonsäureester, auch Triglyzerid genannt, gespeichert. Im Muskel werden die Triglyzeride als intramyozelluläre Triglyzeride (IMCL) bezeichnet.

Der Kohlenhydratstoffwechsel wird durch Insulin gesteuert. Die physiologische Wirkung von Insulin wird durch membranständige Rezeptoren vermittelt, die intrazellulär über Tyrosinkinasen und eine komplexe Kaskade von Phosphorylierungen die Bereitstellung von Glukosetransportermolekülen (GLUT-4) in der Zellmembran induzieren und u. a. die DNA-Synthese anregen. [6]. Bei Insulinresistenz kommt es zu einer vermehrten VLDL-Synthese in

der Leber und vermehrter Speicherung von Fettsäuren als Triglyzeride im extrahepatischen Gewebe, wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt wurde. Intramyozelluläre Triglyzeride sind ein indirekter Marker für die Insulinresistenz, die die Entstehung eines metabolischen Syndroms begünstigt.

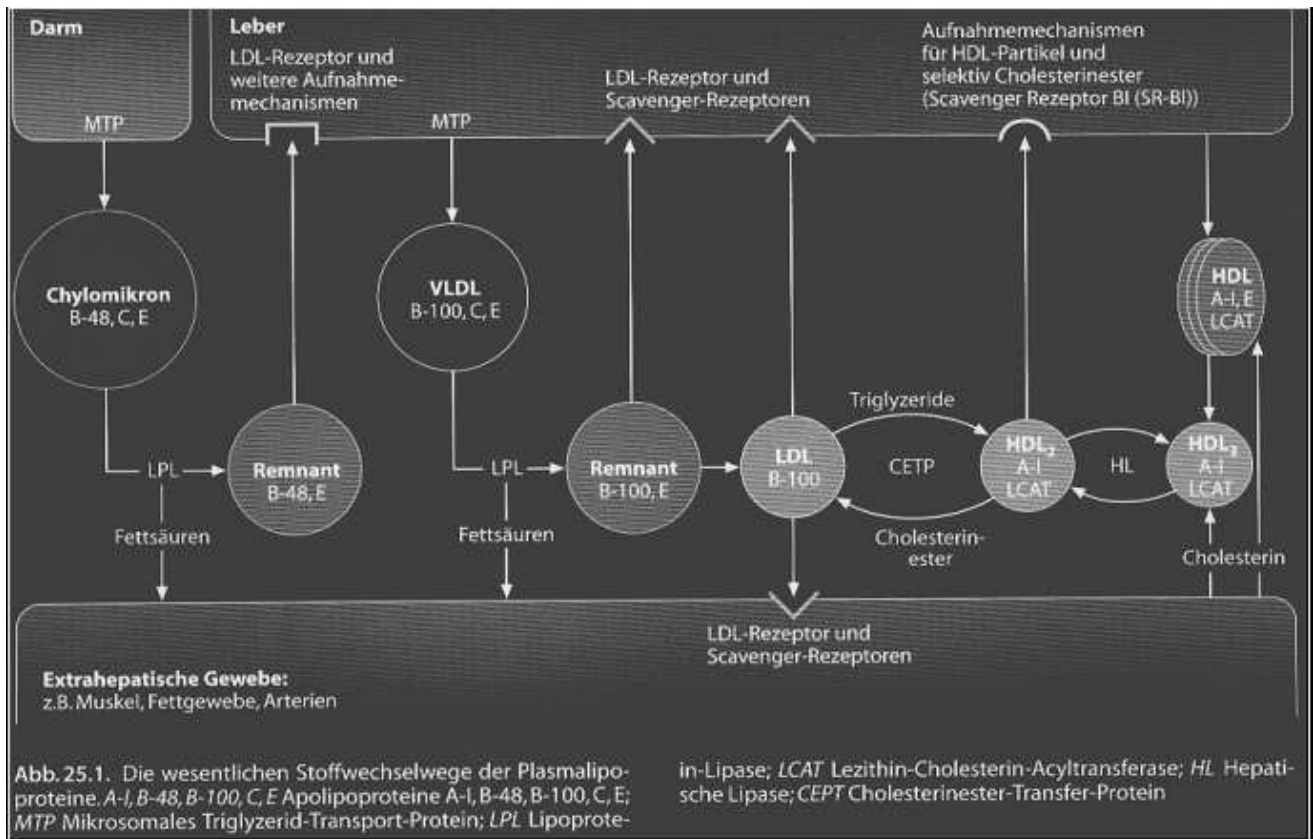


Abb. 2: Vereinfachte schematische Darstellung des Lipidstoffwechsels im menschlichen Körper [3]

In der Literatur lassen sich unterschiedliche Studiendesigns über die organspezifische Bestimmung des intramyozellulären Triglyzeridgehaltes (IMCL) mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) finden. Die Reproduzierbarkeit und Überprüfung der Genauigkeit der MRS bei der Bestimmung des IMCL im Vergleich zu histo- und biochemischen Methoden [7] zeigen, dass das Verfahren als nicht invasive Methode valide ist. Die Differenzierung von IMCL und extramyozellulären Triglyzeriden (EMCL) [8], die Abhängigkeit der Insulinsensitivität vom IMCL und die Veränderungen des IMCL durch nicht veresterte Fettsäuren bzw. durch die Ernährung [9] sind dokumentiert. Die Veränderungen des IMCL nach sportlicher Betätigung in Abhängigkeit von der Ernährung [10] sowie der IMCL und der Gehalt anderer Stoffwechselmetaboliten in „slow bzw. fast switch“ Muskelfasern [11] werden ebenfalls dargestellt. Über MRS in Abhängigkeit von Genvarianten im Zusammenhang mit der Ätiologie des metabolischen Syndroms ist noch nichts weiter berichtet worden. Es gibt schon Studien über die postprandialen

Triglyzeridkonzentrationen im Blutplasma in Abhängigkeit von den beiden Genvarianten des FABP [12-14], die auch in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

1.3 Genetische Aspekte des metabolischen Syndroms

Gene sind für Proteine kodierende Abschnitte der Desoxynucleinsäure (DNS), wobei drei Basen, auch genannt Triplets bzw. Codon, für eine Aminosäure oder für Start- und Stop-Funktion stehen. Um ein Protein im Zytosol an den Ribosomen einer Zelle zu synthetisieren, wird eine messenger-Ribonucleinsäure (mRNS), also ein reziproker Strang entlang des codierenden Abschnitts aus der Doppelhelix geschrieben. Dieser Prozess nennt sich Transkription.

Jedem Gen ist ein aus Basenpaaren bestehender Promotor vorangestellt. Der Promotor regelt die Transkription. An ihn binden Transkriptionsfaktoren, die die Ablesung des Gens regeln.

Im Zytosol der Zelle erfolgt die Synthese des Proteins, das durch die entsprechende mRNA codiert wird. Ein Protein setzt sich aus einer Aminosäurenkette zusammen, die sich in Strukturen legt (Abb. 3).

Wenn Veränderungen innerhalb der Abfolge der Basenpaare in einem Promotor entdeckt werden, handelt es sich um einen Polymorphismus. Polymorphismen können die Transkription eines Proteins beeinflussen und damit die Stoffwechselfvorgänge in Zellen massiv verändern.

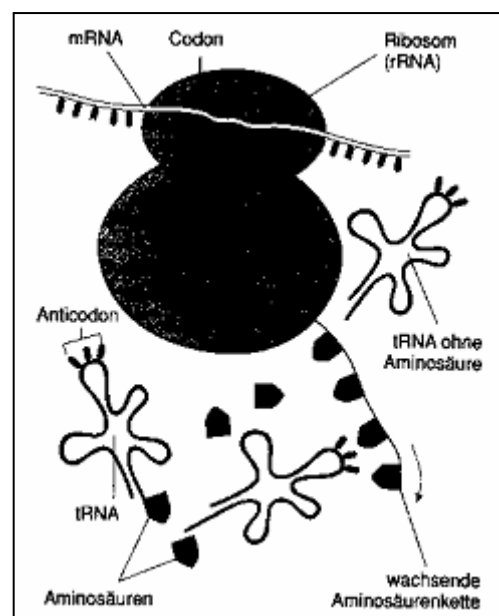


Abb. 3: Translation am Ribosom im Zytosol der Zelle als schematische Darstellung [6]

Die Entstehung des metabolischen Syndroms ist multifaktoriell bedingt. Ein Ansatz fokussiert sich auf die genetischen Ursachen, da Studien eine deutliche familiäre Häufung für metabolische Erkrankungen aufweisen [15]. In der Literatur lassen sich Hinweise auf verschiedene Genloci finden, die für die Entstehung eines Diabetes mellitus in Zusammenhang stehen bzw. assoziiert sind [16-18]. Die divergierenden Genloci, die beschrieben werden, lassen sich zum Teil durch die unspezifische Kollektivauswahl einerseits und andererseits durch die angewendeten statistischen Verfahren erklären [19, 20].

In dieser Studie wird der intramyozelluläre Triglyzeridgehalt des Musculus soleus als indirekter Marker für die Insulinsensitivität in Abhängigkeit eines Promotorpolymorphismus des FABP-Gens untersucht. Das Probandenkollektiv ist homogen und anhand spezifischer Kriterien selektiert.

1.4 Fragestellungen der Studie

Pathophysiologisch spielt die Insulinresistenz bei der Ätiologie des metabolischen Syndroms eine wichtige Rolle.

Mittels der Magnetresonanztomographie (MRS) kann der intrazelluläre Triglyzeridgehalt nicht-invasiv bestimmt werden. Da der intrazelluläre Triglyzeridgehalt mit der Insulinsensitivität korreliert, steht ein indirekter Marker für die Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz zur Verfügung [9, 21]. Durch Messung des Triglyzeridgehalts am Muskel lassen sich somit evtl. Rückschlüsse auf das Risiko für ein metabolisches Syndrom ziehen.

In der vorgelegten Studie werden Probanden, deren Stoffwechselantwort nach metabolischer Belastung als physiologisch oder pathologisch differenziert wird, auf den intramyozellulären Triglyzeridgehalt untersucht.

Zusätzlich werden Probanden mit einem Promotorpolymorphismus des Intestinal Fatty Acid Binding Protein-Genes (I-FABP oder FABP2), dem eine entscheidende Rolle beim Fettstoffwechsel zugeschrieben wird, was erhöhte postprandiale Triglyzeridspiegel, Insulinresistenz und HDL-Spiegel in Studien andeuten [12, 22], auf den Triglyzeridgehalt untersucht.

Außerdem wird der Einfluß einer bestimmten Diät, in diesem Fall von lang- und mittelkettigen Fettsäuren, auf den Triglyzeridgehalt bestimmt.

Die spezifischen Fragestellungen sind:

1. Gibt es einen Unterschied des intramyozellulären Triglyzeridgehalts im Musculus soleus bei Probanden mit physiologischer und pathologischer Stoffwechselantwort?
2. Gibt es einen Unterschied des intramyozellulären Triglyzeridgehalts im Musculus soleus bei Probanden mit Promotorpolymorphismus beim intestinalen Fatty Acid Binding Protein (FABP) ?
3. Kann der intramyozelluläre Triglyzeridgehalt im Musculus soleus unabhängig vom Ausgangswert mittels einer Diät durch lang- und mittelkettige Fettsäuren im Vergleich zu Probanden mit demselben FABP-Promotorpolymorphismus, die ihren normalen Ernährungsgewohnheiten folgen, beeinflusst werden?

Ergänzend zur Bestimmung der intramyozellulären Triglyzeride im Musculus soleus wäre die Bestimmung der intrahepatischen Triglyzeride interessant gewesen, um ein umfassendes Gesamtbild der Stoffwechsellage der Probanden aufzuzeigen. Im Rahmen dieser Studie ließ sich die MRS an der Leber nicht realisieren, weil auf dem zur Verfügung gestellten Gerät keine Atemtriggerung programmiert war, die bei der lokalisierten MRS an der Leber aufgrund der Atemverschieblichkeit des Organs bei Inspiration und Expiration notwendig ist. Die Messung könnte in Expirations- oder Inspirationsstellung mit Atemkommandos durchgeführt werden, liefert aber keine brauchbaren Ergebnisse, weil die vorbereitenden Optimierungsschritte für die Messung nur unter Atmung durchgeführt werden.

2 Methoden und Probandenkollektiv

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Grundlagen der lokalisierten ^1H -Magnetresonanzspektroskopie

Alle Atomkerne, die wie Wasserstoff eine ungerade Protonen- und/oder Neutronenzahl aufweisen, können als magnetische Dipole oder Kernspins angesehen werden (Abb. 4).

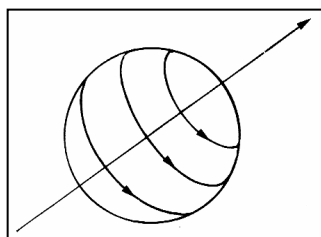


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Wasserstoffprotons mit Magnetachse induziert durch den Spin [23]

In einem äußeren Magnetfeld B_0 richten sich magnetische Dipole parallel oder antiparallel zu diesem Magnetfeld aus und nehmen diskrete Energieniveaus, die durch eine Präzessionsbewegung um die Achse von B_0 charakterisiert sind, ein (Abb. 5).

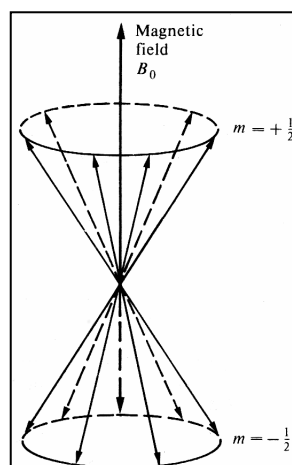


Abb. 5: Parallele oder antiparallele Ausrichtung der Spins im magnetischen Feld B_0 , die einzelnen Spins sind als Vektoren dargestellt[23]

Radiofrequenz-Signale, erzeugt durch eine Hochfrequenzspule, können die Wasserstoffprotonen anregen, so dass sie ein höheres Energieniveau annehmen. Dadurch ändert sich die Ausrichtung des Magnetisierungsvektors. Beim Zurückfall in den ursprünglichen Zustand wird Energie von den Wasserstoffprotonen abgegeben (Abb. 5).

Die Summe der abgegebenen Energie der Wasserstoffprotonen eines zu untersuchenden Objekts beim Zurückfall in den ursprünglichen Energiezustand wird als „free induction decay“ (FID) detektiert.

Die Magnetisierung kann in zwei Komponenten, die Quer- und die Längsmagnetisierung, zerlegt werden. Bezugspunkt ist die Richtung von B_0 . Die Quer- und die Längsmagnetisierung werden durch ihre Relaxationszeiten T_2 und T_1 charakterisiert. T_2 ist die Zeit, nach der 63% ($=1-1/e$) der ursprünglichen Transversalmagnetisierung relaxiert ist. T_1 wird als die Zeit, nach der 63% der ursprünglichen Longitudinalmagnetisierung wieder erreicht ist, definiert. Die Quermagnetisierung ist durch die phasiierte Präzessionsbewegung der Protonen bedingt (Abb. 6), die sich durch die Larmor-Gleichung $\omega_0 = \gamma \cdot B_0$ mit ω_0 =Präzessionsfrequenz in Herz, B_0 =Stärke des externen Magnetfeldes in Tesla und γ =gyromagnetisches Verhältnis (für Protonen 42,5MHz/T) bestimmen lässt. Die Longitudinalmagnetisierung kommt durch die parallele und antiparallele Ausrichtung der Protonen zustande, wobei mehr Protonen parallel zum äußeren Magnetfeld B_0 ausgerichtet sind.

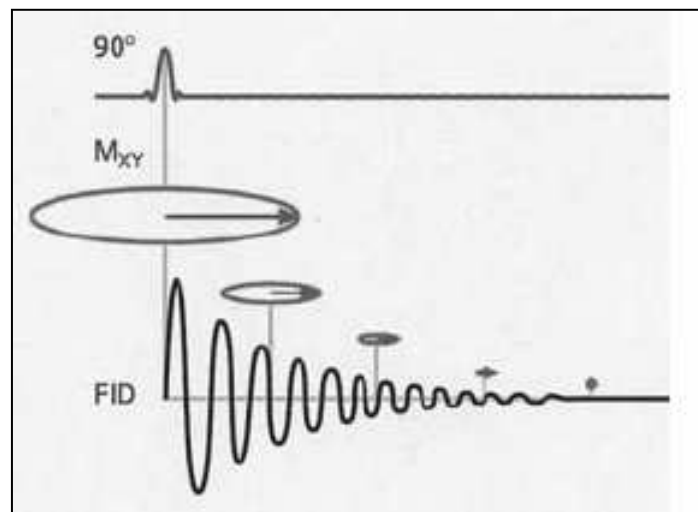


Abb. 6: Zeitliche Darstellung der Transversalmagnetisierung nach Einstrahlung eines 90° -Hochfrequenz-Impulses, Quelle Siemens

Da die Protonen mit ihren Magnetfeldern sich gegenseitig beeinflussen, bildet sich kein homogenes Magnetfeld aus, sondern ein variierendes Magnetfeld. Die Präzessionsbewegung der Protonen ist durch diese internen Inhomogenitäten unterschiedlich. Deshalb unterliegt die

Quermagnetisierung durch die unterschiedlichen Präzessionsfrequenzen einer relativ schnellen Dephasierung der Protonen. Zusätzlich bestehen zum Teil auch noch Inhomogenitäten des externen Magnetfeldes B_0 , die auch die Relaxation der Quermagnetisierung mitbestimmen. Im Vergleich ist die Relaxationszeit von T_1 relativ gesehen wesentlich länger als von T_2 .

Da verschiedene Gewebe unterschiedliche Relaxationszeiten haben, bedingt durch die Strukturzusammensetzung, ist eine Differenzierung von Geweben und Stoffwechselmetaboliten sowie deren Konzentrationsberechnung möglich.

Die Spektroskopie ist eine Methode, die Stoffwechselmetaboliten als Spektrallinie darstellt. In Abb. 7 ist ein Beispielspektrum des Gehirns zu sehen, bei dem auf der Abszisse die chemische Verschiebung in parts per million (*ppm*) und auf der Ordinate die Signalintensität aufgetragen sind. In einem MR-Spektrum besitzen die Protonen verschiedener chemischer Gruppen eines Moleküls unterschiedliche chemische Verschiebungen. Dies ermöglicht es, mit der ^1H -Magnetresonanzspektroskopie über die Signalposition einzelne Stoffwechselprodukte zu identifizieren und anhand der Fläche der Maxima zu quantifizieren

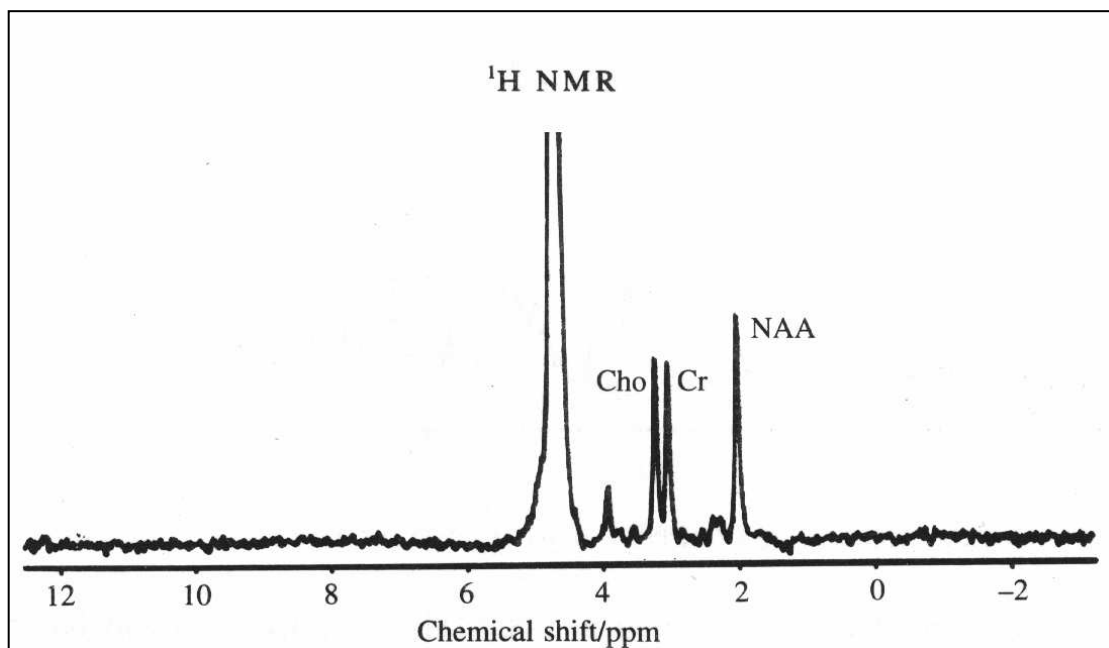


Abb. 7: ^1H Spektrum des Gehirns mit Kreatin+Phosphokreatin (Cr), Cholin (Cho) und N-Acetylaspartat (NAA) [23]

Die Ortsselektion des Spektrums kann mit einer PRESS-Sequenz, point-resolved spectroscopy, durchgeführt werden (Abb. 8).

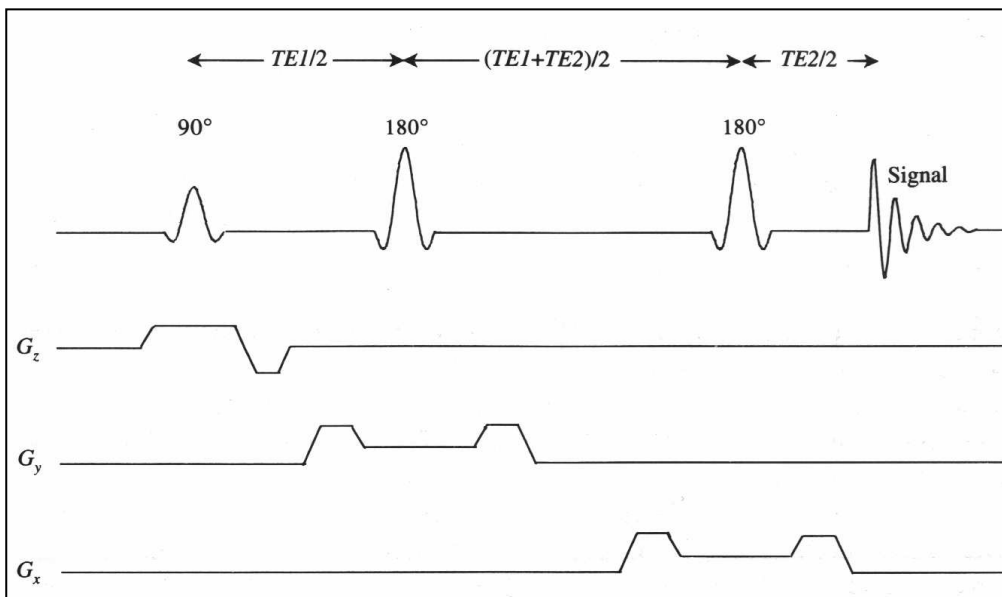


Abb. 8: PRESS-Sequenz für lokalisierte Spektroskopie [23]

Jeder der drei Pulse ist schichtselektiv, d. h. die Kantenlänge des angeregten Volumens kann vom Untersucher gewählt werden entlang der X-, Y- und Z-Achse. Der 90°-Puls selektiert eine Schicht in XY-Richtung, die beiden 180°-Pulse refokussieren die durch die Gradienten in Y- bzw. X-Richtung dephasierte Magnetisierung in der XZ- bzw. YZ-Ebene. Die Schnittstelle der drei Schichten ist das Volumen, von dem das Signal aufgenommen wird.

Das Echo-Signal, das in der Zeitdomäne aufgenommen wird, kann durch die Fourier-Transformation in die Frequenzdomäne, das MR-Spektrum, umgewandelt werden [24] (Abb. 9).

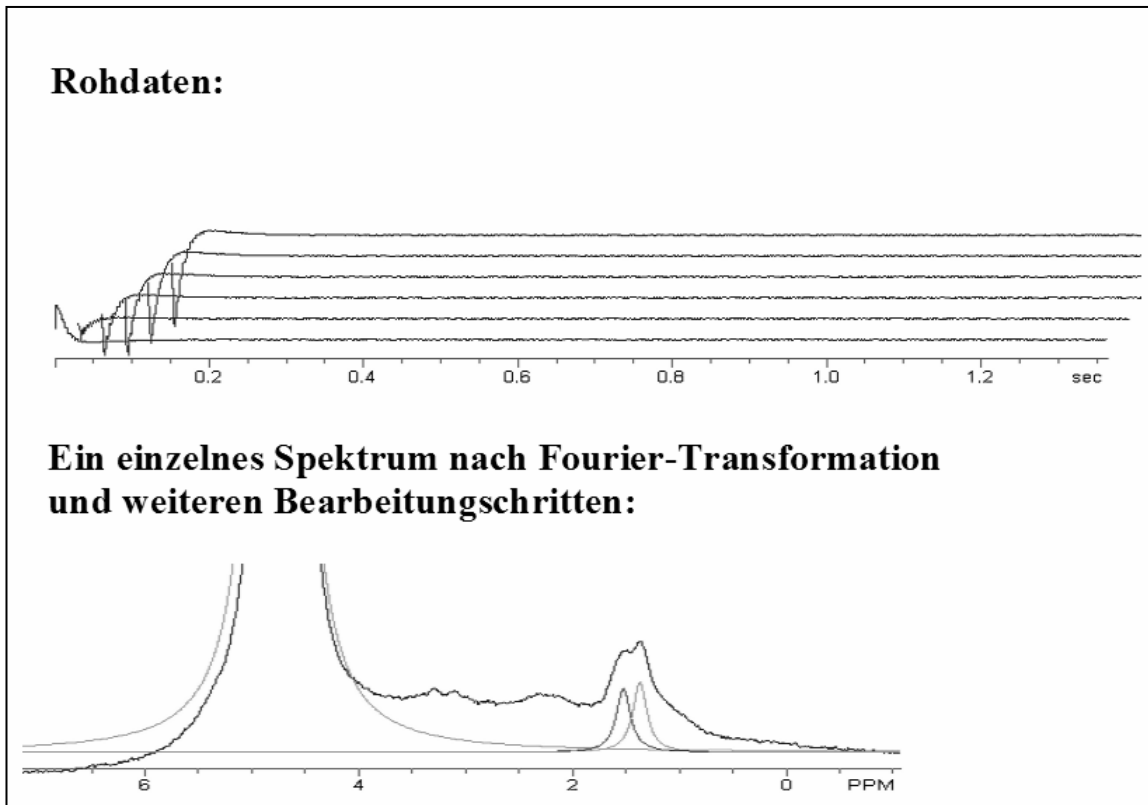


Abb. 9: Oben ist die Zeitdomäne $f(t)$ von 6 Spektren gezeigt, von denen ein Spektrum durch Bearbeitungsschritte und die Fourier-Transformation in die Frequenzdomäne $f(ppm)$ umgewandelt worden ist, hierzu wurde das Programm NUTS verwendet aus eigener Arbeit

2.1.2 MRS der intra- und extrazellulären Triglyzeride im Muskel

Mittels der lokalisierten MRS beobachtet man für Triglyzeride innerhalb und außerhalb der Muskelzellen unterschiedliche chemische Verschiebungen. Diese Unterschiede beruhen auf einer unterschiedlichen Ausrichtung der Triglyzeride in den Muskelzellen und den entlang der Muskelfasern angeordneten Adipozyten. Die intra- und extramyozellulären Triglyzerid-(IMCL und EMCL) Signale liegen $0,2 ppm$ auseinander. Die intramyozellulären Triglyzeride liegen Mitochondrien assoziiert als Tröpfchen im Zytoplasma der Muskelzellen vor und sind deshalb isotrop im Bezug auf das Magnetfeld orientiert. Die extramyozellulären Triglyzeride in den die Muskelzellen septenförmig umgebenden Adipozyten weisen hingegen eine partielle Orientierung gegenüber dem äußeren Magnetfeld auf. Die optimale Trennung vom intramyozellulären und extramyozellulären Triglyzeridsignal ist gegeben, wenn die Muskelfasern parallel zum statischen Magnetfeld B_0 ausgerichtet sind [10]. Beim Musculus soleus, der ein gefiederter Muskel ist, können die beiden Signale teilweise überlagert sein. Das IMCL-Signal bei $1,4 ppm$ und das EMCL-Signal bei $1,6 ppm$ gelegen, werden auch durch die benachbarten Signalintensitäten bei $1,2 ppm$ und $1,0 ppm$ beeinflusst, wie es Abb.

10 zeigt. Die Signalintensitäten bei 1,2 ppm und 1,0 ppm werden durch Methylgruppen hervorgerufen, während die Signale bei 1,6 ppm und 1,4 ppm durch CH₂-Gruppen entstehen.

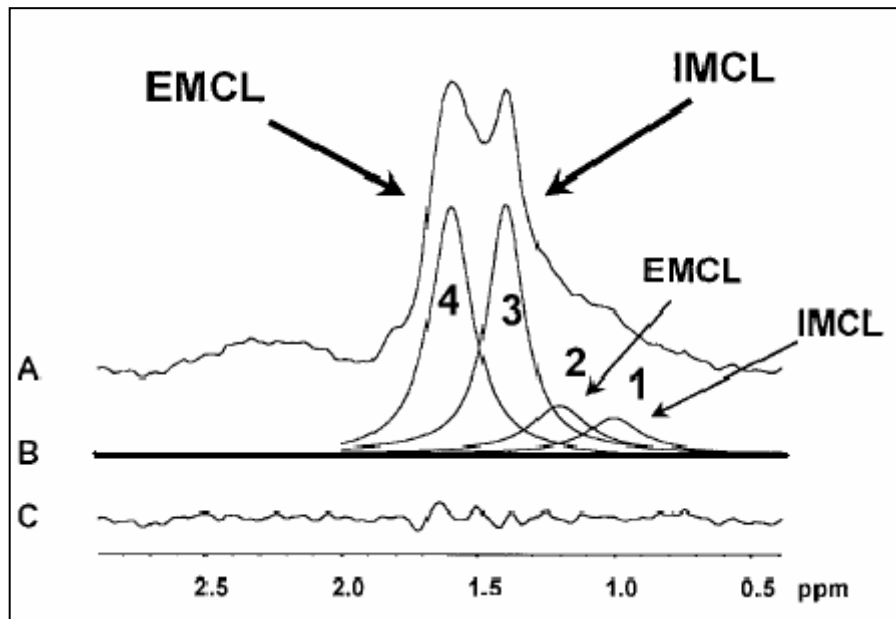


Abb. 10: Modifizierte Signalverteilung der Triglyzeride am *M. soleus* mit A dem aufgenommenen Spektrum, B den angenäherten ortsspezifischen Signalintensitäten und C der Differenz von A und B als Qualitätskontrolle [7] [21]

Die Abb. 11 zeigt das aufgenommene Spektrum A, B stellt die Kurvenanpassung der Signale mit der entsprechenden Software dar, C ist die Subtraktion von A und B und ist ein Indikator für die vorgenommene Kurvenanpassung. Im Idealfall wäre C eine Gerade.

Zur Berechnung des IMCL-Gehalts (C_{IMCL}) wird folgende Gleichung zugrunde gelegt [7]:

$$C_{IMCL} = C_{WASSER} * \frac{N_{WASSER}}{N_{IMCL}} * T_{WASSER} * \frac{M_{0 T2IMCL}}{M_{0 T2WASSER}} * \frac{\left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1WASSER}}\right)\right)}{\left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1IMCL}}\right)\right)} * 1000$$

mit $C_{WASSER}=55\text{mol/Volumeneinheit}$

$N_{WASSER}=2\text{ mmol Protonen/mmol}_{WASSER}$

$N_{IMCL}=62\text{ mmol Protonen/mmol}_{IMCL}$

$T_{WASSER}=0,77=77\%$ [25]

$M_{0 T2IMCL}$ entsprechen der Schnittstelle der Ordinate mit der T₂-Relaxationkurve für IMCL

$M_{0 T2WASSER}$ entsprechen der Schnittstelle der Ordinate mit der T₂-Relaxationkurve für Wasser

Als Referenzwert für die Berechnung der IMCL-Konzentration wird die Fläche des Wassersignals genommen, da ein bekannter Wert für die Wasserkonzentration im Muskelgewebe angenommen werden kann.

C_{WASSER} gibt die Anzahl der Protonen im reinen Wasser an, N_{WASSER} gibt die Anzahl der Protonen eines Wassermoleküls an und N_{IMCL} die Anzahl der Protonen eines Triglyzeridmoleküls.

C_{IMCL} gibt die Konzentration des IMCL in Abhängigkeit vom Wassergehalt der menschlichen Skelettmuskulatur T_{WASSER} und von dem Intensitätsverhältnis des IMCL zu Wasser ($M_0 T_{2\text{IMCL}}/M_0 T_{2\text{WASSER}}$) an, das mit durch die Anzahl der Protonen von IMCL und Wasser ($N_{\text{WASSER}}/N_{\text{IMCL}}$) charakterisiert wird. Gerätetechnisch bedingt durch die PRESS-Sequenz erfolgt die Aufnahme des Echosignals mit einer Latenzzeit, die die T_2 -Relaxationszeit beeinflusst. Um sicherzustellen, dass die T_1 -Relaxation zwischen 2 Messungen hinreichend abgeschlossen ist, sollte $TR > 5 * T_1$ sein. Wird dies nicht berücksichtigt, würde der Parameter C_{IMCL} relativ zu niedrig wiedergegeben werden. Deshalb wird eine T_1 -Korrektur

durchgeführt, die den Term $\frac{\left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1\text{WASSER}}}\right)\right)}{\left(1 - \exp\left(-\frac{TR}{T_{1\text{IMCL}}}\right)\right)}$ beinhaltet und die folglich durch die

Repetitionszeit der Impulse und die T_1 -Relaxationszeit bestimmt wird.

2.2 Messverfahren

2.2.1 Benutzte MRT-Hardware

Die Messungen wurden an einem Philips Intera 1.5 T – Magnetresonanztomographen, der als Forschungsgerät der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur Verfügung steht, durchgeführt. Es wurde eine C3-Oberflächenspule benutzt.

2.2.2 Messprotokoll am Musculus soleus

Für die Messung wurde die C3-Oberflächenspule mit einem Durchmesser von 11cm unter dem linken Unterschenkel des Probanden fixiert. Das Bein wurde mit Abstützpolstern mittig im Magneten gelagert, wo das Magnetfeld am homogensten ist.

Zur Lokalisierung der Messregion wurde ein Übersichtsbild des Unterschenkels im Bereich seiner größten sagittalen Ausdehnung in den 3 Raumebenen aufgenommen. Für die präzise Positionierung des Volume of Interest (voi: $1,5 \cdot 1,5 \cdot 1,5 \text{ cm}^3$), von dem die Spektren aufgenommen wurden, wurden 9 höher auflösende transversale und sagittale Schichten gefahren. Das voi wurde in einen homogenen, septen- bzw. fasziensfreien und einen nicht durch Nerven oder Gefäße durchzogenen Anteil des Musculus soleus gelegt, um gute und nicht überlagerte Signale zu erhalten, siehe Abb.11.

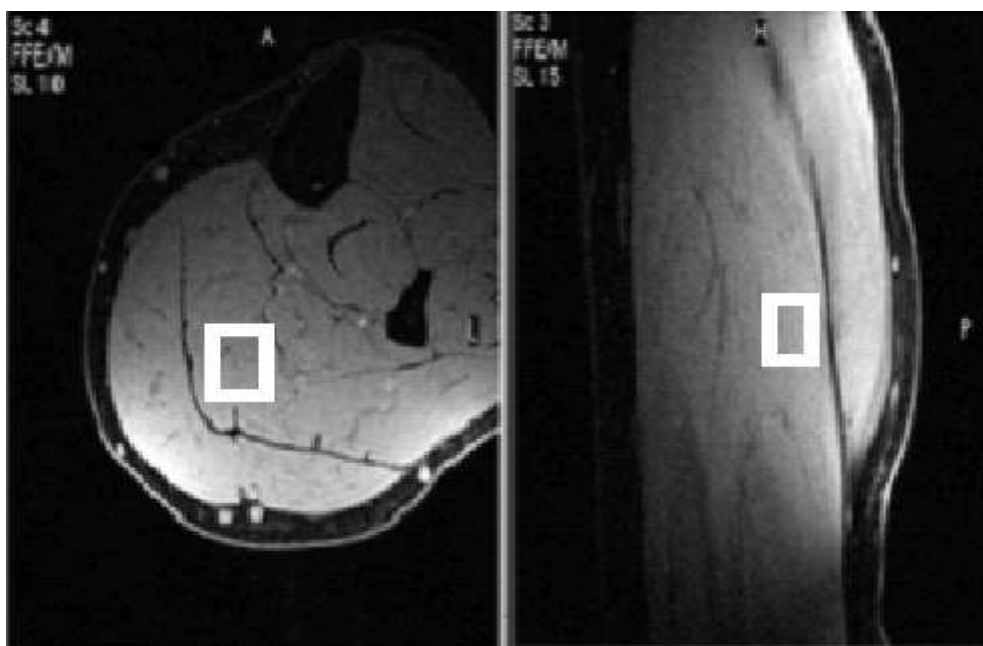


Abb. 11: Beispielhafte Positionierung des voi im M. soleus auf einer Übersichtsbildgebung mit transversaler und sagittaler Ebene

Vor der Spektroskopie wurden die Parameter für die MRS optimiert. Mit einem automatischen Shimmen wird das statische Magnetfeld B_0 über dem *vo* homogenisiert, um eine optimale Trennung der Signale zu erhalten. Für die Quantifizierung des IMCL ist die Kenntnis der Relaxationszeiten T_1 und T_2 notwendig, siehe Formel (1) im Abschnitt 2.1.3. Daher werden die Spektren mit gewichteten T_1 - (*Inversion Recovery*) und T_2 - (*Spinecho*) Sequenzen mit folgenden Parametern aufgenommen, mit denen die Relaxationszeiten berechnet werden, wie weiter unten dargestellt wird:

T_1 : - *Repetitionszeit (TR)* = 6 s

-*Inversionszeit (TI)* = 320/ 880/ 1660/ 2600/ 3580/ 4580 ms

-*spektrale Bandbreite* = 750 Hz

-*Anzahl der Scans* = 8

-*Anzahl der dargestellten Punkte* = 1024

-*Dauer der Messung*: ~8 min.

T_2 : - *TR* = 1,8 s

- *Echozeit (TE)* = 24/ 36/ 51/ 73/ 105/ 150 ms

-*spektrale Bandbreite* = 750 Hz

-*Anzahl der Scans* = 96

-*Anzahl der dargestellten Punkte* = 1024

-*Dauer der Messung*: ~25 min.

2.2.3 Dekonvolution der Spektren

Die gemessenen Rohdaten werden vom Philips Intera 1,5T exportiert. Mit der Software NUTS (ACORNNMR, Fremont, USA) erfolgen die Dekonvolution und Prozessierung mit *exponential multiply*=1, *zerofill*=1024, Fourier-Transformation, Phasierung und Korrektur der Nulllinie. Die Spektren werden mit einer Breite von 3,6 ppm bis 6 ppm für das Wassersignal und von 0,8 ppm bis 1,8 ppm für das Fettsignal exportiert.

2.2.4 Kurvenanpassung

Die Kurvenanpassung der Spektren erfolgt im Programm Origin (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Die Spektren werden als ASCII-Formate mit den entsprechenden Breiten in Origin importiert. In die Kurvenanpassung am Musculus soleus werden neben dem Wassersignal, dem IMCL- und EMCL-Signal die Signalintensitäten der Methyl-Gruppen der Triglyzeride bei 1,2 *ppm* und 1,0 *ppm* einbezogen. Um die Kurvenanpassung durchzuführen, werden sowohl für die Positionen der Intensitäten als auch für die Linienbreite und den Anteil von Gauß- und Lorentzian-Linienformen Bereiche festgelegt, in denen das Programm Origin die optimale Kurvenanpassung ausgibt.

Tab. 1 gibt die Vorgaben für die Kurvenanpassung am Musculus soleus wieder.

Tab. 1: Vorgaben für die Regression in Origin mit der vorgegebenen Position X auf der Abszisse, mit der Linienbreite W auf ½ Höhe des Signals und mit dem Anteil R von Gauß- und Lorentzian-Linienformen

Signale	4,8 <i>ppm</i> (Wasser)	1,6 <i>ppm</i> (EMCL)	1,4 <i>ppm</i> (IMCL)	1,2 <i>ppm</i> Methyl-Gruppen	1,0 <i>ppm</i> Methyl-Gruppen
X	variabel	$1,45 \leq x \leq 1,7$	$1,35 \leq x \leq 1,45$	$1,22 \leq x \leq 1,35$	$x = 1,0$
W	variabel	$5 \leq w \leq 20$	$5 \leq w \leq 20$	$5 \leq w \leq 20$	$5 \leq w \leq 20$
R	$0 \leq R \leq 1$	$0 \leq R \leq 1$	$0 \leq R \leq 1$	$0 \leq R \leq 1$	$0 \leq R \leq 1$

In Abb. 12 wird das Ergebnis von einer T_2 -Messung in Form einer Graphik dargestellt. Die Ausgabe erfolgt natürlich auch in Form von berechneten Integralen mit dem entsprechenden Fehler. In dieser Graphik sind die einzelnen Maxima des IMCL und des EMCL zu erkennen.

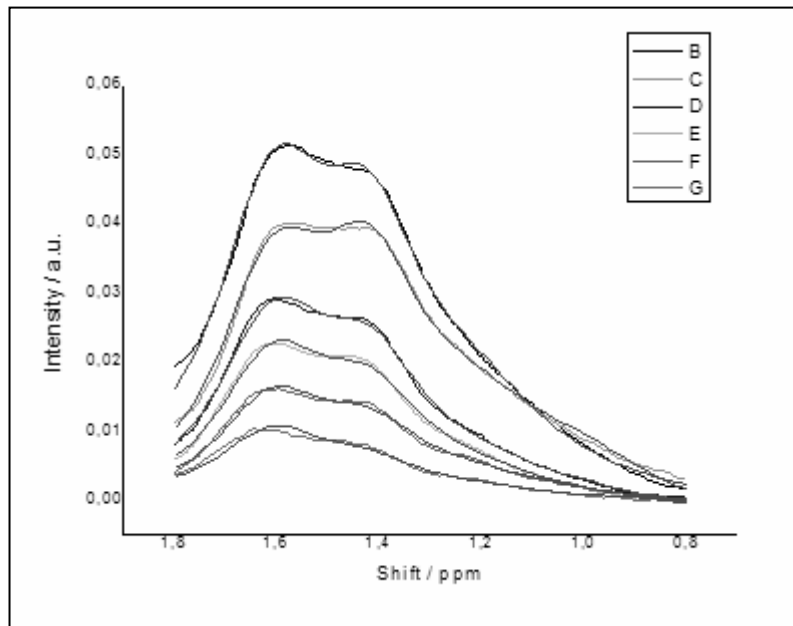


Abb. 12: Kurvenanpassung der Lipidsignale in Origin, bei der die aufgenommenen Signale mit den Linien B-G angenähert werden

Die erhaltenen Flächenwerte für den IMCL und Wasser werden zur Berechnung der T_1 - und T_2 -Relaxationszeit herangezogen, siehe Abb. 13. Dabei fallen die berechneten Flächenwerte mit der geringeren Standardabweichung mehr ins Gewicht als Werte mit zunehmender Standardabweichung.

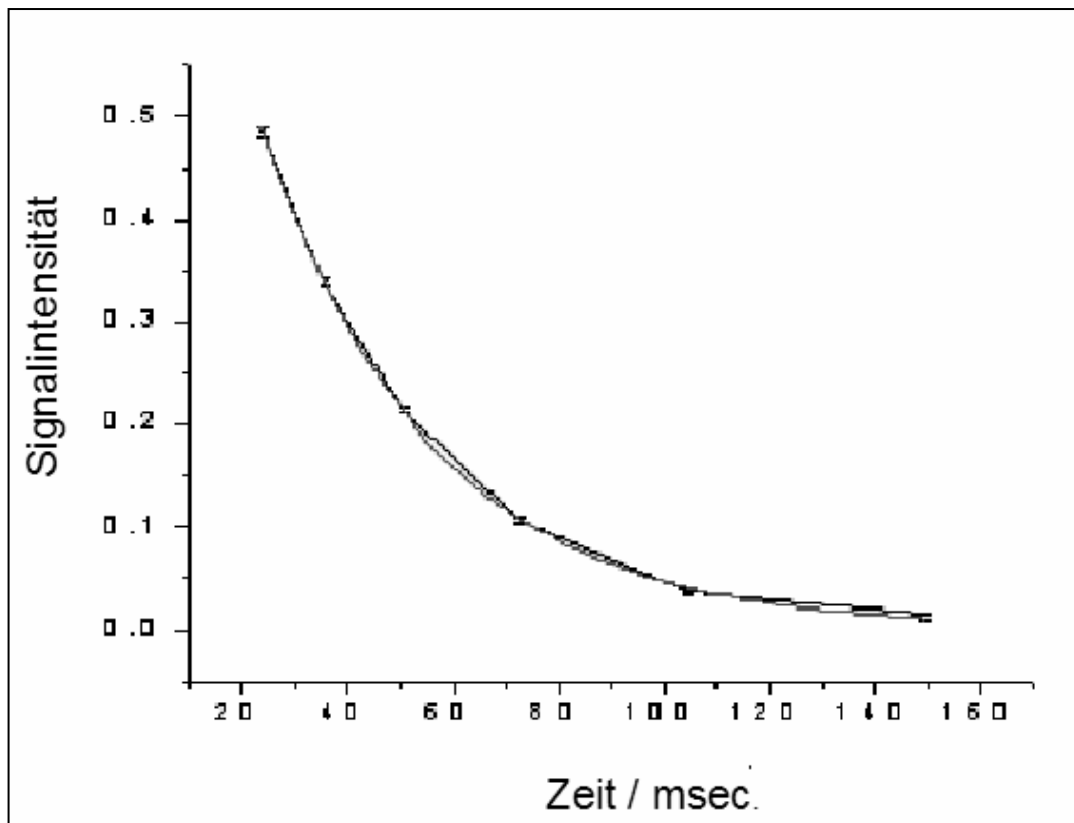


Abb. 13: Berechnung der Fehler gewichteten T_2 -Zeit für Wasser in Origin

2.2.5 Quantifizierung

Zur Quantifizierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts wird die Formel (1) aus Kapitel 2.1.3 benutzt. Da sich während der Berechnung der IMCL-Werte gezeigt hat, dass die T_1 -Korrektur nur minimale Veränderungen brachte, d. h. im Bereich von 1/1000 bis 1/100000, wurde die T_1 -Korrektur vernachlässigt.

2.2.6 Statistik

Die erhaltenen intramyozellulären Triglyzeridwerte der Probanden werden tabellarisch in die Statistiksoftware JMPTM Release 5.0.1 (SAS Institute Inc., USA) eingegeben.

Es erfolgt die Berechnung der Mittelwerte (Mean) der einzelnen Gruppen und der Standardabweichung (Standard Deviation).

Für die Signifikanzprüfung wird der zweiseitige Student's T-Test mit einem Signifikanzniveau $p=0,05$ benutzt unter der Annahme gleicher Varianzen der Stichproben. Zusätzlich wurden Post-hoc Poweranalysen durchgeführt, um die Ergebnisse in Anbetracht der zum Teil geringen Fallzahl besser interpretieren zu können.

Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt als Rautendiagramm. Die Raute gibt das 95%-Konfidenzintervall wieder. Die Einzelergebnisse werden als Punkte in der gedachten vertikalen Diagonale der Raute dargestellt. Die horizontale Diagonale symbolisiert den Mittelwert des Kollektivs, die oberhalb und unterhalb parallel zur Mittelwertlinie verlaufenden Strecken stellen das 95%ge Konfidenzintervall der Mittelwerte unter Einbeziehung der Werte beider Kollektive dar.

2.3 Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv rekrutierte sich aus der Metabolic Intervention Cohort Kiel (MICK), die durch die Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel (BfEL) aufgestellt wurde. Über das Einwohnermelderegister der Stadt Kiel wurden alle männlichen Personen im Alter zwischen 45 bis 65 Jahren angeschrieben. Sofern keine anderen gravierenden Nebenerkrankungen oder ein Diabetes vorlagen, wurden die Männer bei entsprechender Motivation in die MICK aufgenommen. Es erfolgte eine Phäno- und Genotypisierung der Probanden durch die BfEL [26].

Die Adressen der Probanden wurden für die Studie zur Verfügung gestellt. Durch ein informatives Anschreiben sowie telefonische Abklärung wurde festgestellt, ob die Probanden gewillt waren, an der Studie teilzunehmen.

Eine Genehmigung für die MRS an den Probanden durch die Ethikkommission lag vor.

2.3.1 Phänotypen

Nachdem die Probanden einem oralen Glucose-Toleranztest (oGTT) über einen Zeitraum von 4 Stunden und einem oralen metabolischen Toleranztest (oMTT) über einen Zeitraum von 9 Stunden unterzogen worden waren, war es möglich, die Probanden unabhängig von ihrem Genotyp nach dem Triglycerid-Maxima bei einem Grenzwert von 260mg/dl in Low Responder und High Responder zu differenzieren [27], wie in Abb.14 dargestellt wird.

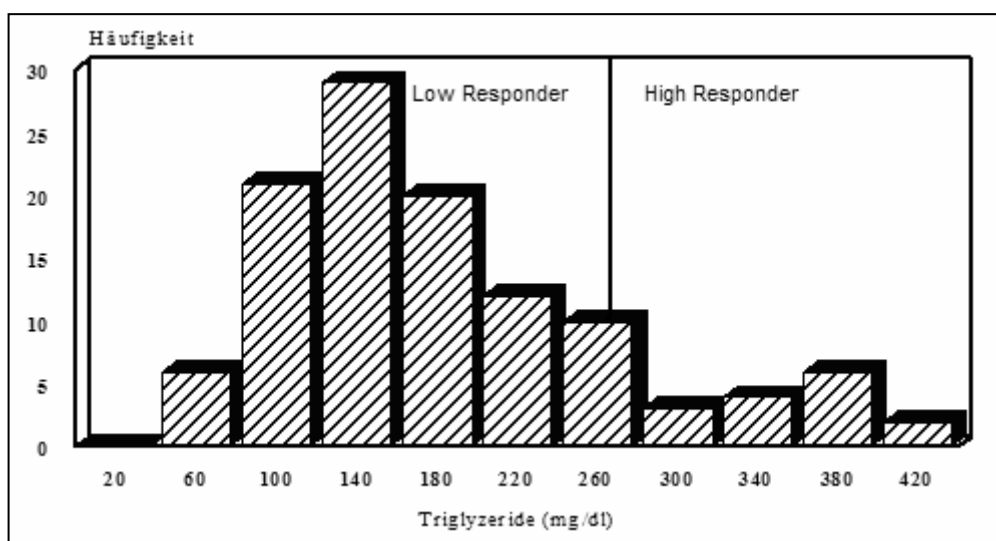


Abb. 14: Bimodale Verteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnov-Lilliefors-Test zeigt Häufigkeitsverteilung der maximalen Triglyceridwerte von 30 gesunden, jungen Männern nach Durchführung eines oMTT unabhängig von den Nüchterntriglyceriden modifiziert nach Dr. Rubin [28]

Die Einteilung der Probanden in Low und High Responder in Abhängigkeit von dem Verlauf der Triglyzeridwerte nach einer metabolischen Belastung ist nicht unkritisch zu sehen, auch wenn diese Korrelation in mehreren Studien sich als sinnvoll erwiesen hat [27, 29] Deshalb wird der postprandiale Triglyzeridwert auch als kontinuierliche Variable behandelt.

2.3.2 Genotypen: Intestinales Fatty Acid Binding Protein

Der Polymorphismus dieser Studie ist in der Abb. 15 dargestellt. Es handelt sich um eine Genvariante, die in der Promotorregion des I-FABP lokalisiert ist. In der Variante B sind Deletionen an den Positionen -108 und -78 vorhanden, an der Position -19 ist die Nukleinsäure (Base) Thymin eingefügt.

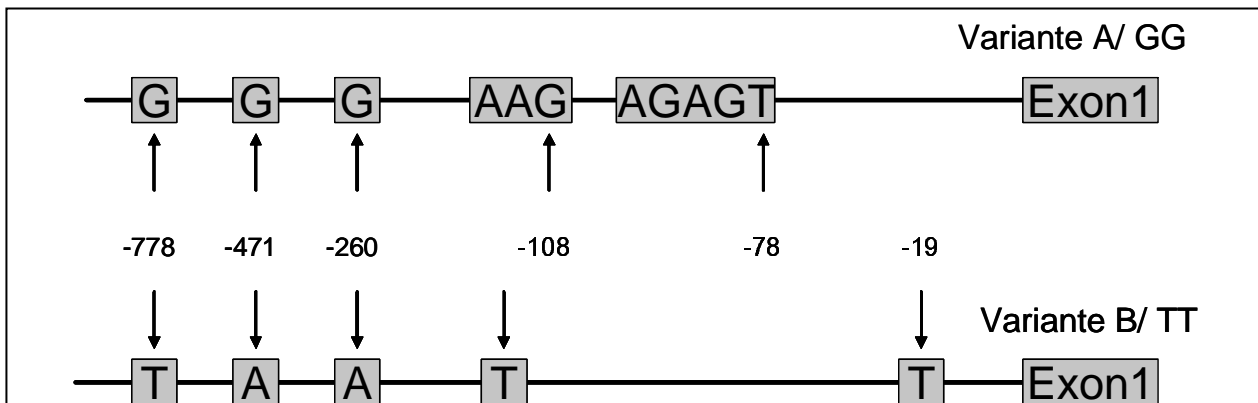


Abb. 15: FABP2-Promoterpolymorphismus, dargestellt sind die beiden Haplotypen A und B

Bisher wird vermutet, dass die Funktion des I-FABP in der intrazellulären Bindung und Abgabe im Jejunum liegt. Die zu beobachtende unterschiedliche Aktivität der Promotoren wird auf der Transkriptionsebene angesiedelt. In vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Variante B eine höhere Promotoraktivität zeigt und somit zu einer verzögerten Bluttriglyzeridkonzentration führt [12].

2.3.3 Intervention

In Abhängigkeit der FABP2-Promotorvarianten wird die Beeinflussung nutritiver Fettsäuren verschiedener Länge auf den postprandialen Triglyzerid- und Insulinstoffwechsel getestet. Deshalb wurden Fette mit langkettigen Fettsäuren und Fette mit mittelkettigen Fettsäuren (MCT) verabreicht. Hierzu wurde von Cognis, Industriepartner, Fett mit gleichem

Sättigungsgrad aber unterschiedlicher Kettenlänge der Fettsäuren durch Mischen natürlicher Fette hergestellt, siehe Tab. 2.

Die mittelkettigen und langkettigen Fettsäuren stimmen im Kaloriengehalt und im Verhältnis der gesättigten zu den ungesättigten Fettsäuren überein.

Die tägliche Verzehrmenge lag bei 40g. Für die genaue Zusammensetzung siehe Tab. 2.

Tab.2: Zusammensetzung der lang- und mittelkettigen Fettsäuren mit Angabe der Namen und der Kettenlänge mit Sättigungsgrad [30]

Fettsäure		MCT		LCT	
		Ölmischung Delios S MCT mit Sonnenblumenöl und Sonnenblumenöl hochölsäure- reich		Palmöl ungehärtet Herstellerangaben Fa. Gustav Hees	
		Hersteller- angaben ¹	eigene Unter- suchung	Hersteller- angaben ¹	eigene Unter- suchung
C6:0	Capronsäure	0,1 %			
C8:0	Caprylsäure	28,7 %	30,13 %		
C10:0	Caprinsäure	12,5 %	12,44 %		
C12:0	Laurinsäure	<0,1 %		0,2 %	0,14 %
C14:0	Myristinsäure	0,1 %		1,1 %	0,9 %
C16:0	Palmitinsäure	2,4 %	2,32 %	44,5 %	43,23 %
C16:1	Palmitoleinsäure	<0,1 %		0,2 %	0,03 %
C18:0	Stearinsäure	1,9 %	1,71 %	4,4 %	4,22 %
C18:1	Ölsäure	40,8 %	41,55 %	38,7 %	40,58 %
C18:2	Linolsäure	10,7 %	11,46 %	9,9 %	10,79 %
C18:3	Linolensäure	<0,1 %		0,3 %	
C20:0	Arachinsäure	0,2 %		0,4 %	0,15 %
C20:1	Eicosensäure	0,1 %		0,1 %	
C20:4	Arachidonsäure				
C22:0	Behensäure	0,5 %	0,4 %	0,1 %	
C22:1	Erucasäure				
C22:2	Docosadiensäure				
C24:0	Lignocerinsäure	0,2 %			
C22:6	Docosahexaensäure				

¹: Hersteller: Cognis Deutschland GmbH & Co. KG

Probanden der FABP-Genotypen führten der normalen alltäglichen Nahrung MCT- bzw. LCT-Fettsäuren über einen Zeitraum von 14 Tagen zu. Danach erfolgte die Bestimmung des IMCL durch die MRS.

3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse bezieht sich nur auf die Probanden, die nicht aufgrund der schlechten Spektrenqualität ausgeschlossen wurden. Von 91 real untersuchten Probanden fließen die Ergebnisse von 52 Probanden in die Statistik ein.

3.1 Charakteristika des Probandenkollektivs

TAB. 3: Probandenkollektiv der MRS-Studie der MICK-Kohorte

		Alter in Jahren	BMI in kg/m ²	Postprandiale Triglyzeridmaxima in mg/dL, nur für die Low und High Responder bestimmt
Gesamtkollektiv mit n=52		59,33 ± 5,33	26,29 ± 3,70	325,41 ± 160,69
Phänotyp	Low Responder mit n=8	53,5 ± 5,39	23,98 ± 2,30	183,04,62 ± 28,26 *
	High Responder mit n=9	61,89 ± 2,13	23,85 ± 1,52	455,08 ± 119,4 *
Genotyp	FABP Variante A mit n=11	60,45 ± 5,81	29,29 ± 4,18	
	FABP Variante B mit n=8	61,13 ± 3,14	27,07 ± 2,25	
Intervention nach MCT	FABP Variante A mit n=5	54,8 ± 4,35	27,26 ± 4,58	
	FABP Variante B mit n=3	59 ± 4,97	22,65 ± 2,75	
Intervention nach LCT	FABP Variante A mit n=1	63 ± 0	24,0 ± 0	
	FABP Variante B mit n=7	61,71 ± 2,86	26,64 ± 2,32	

*Signifikant unterschiedlich mit p=0,0004

In TAB. 3 sind die wichtigsten Merkmale des Probandenkollektivs aufgeführt. Die postprandialen Triglyzeridmaxima der beiden Phänotypen sind mit $p=0,0001$ signifikant unterschiedlich.

3.2 MRS-Charakterisierung ohne Intervention

3.2.1 MRS-Charakterisierung des intramyozellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Phänotyp

Die Abb. 16 zeigt die statistische Auswertung der Messungen von den phänotypisierten Probanden. Es zeigt sich eine Differenz zwischen den beiden Probandenkollektiven, die jedoch nicht signifikant ist. Von den High Respondern mit $n=9$ ließ sich der Mittelwert $18,44\mu\text{mol/g} \pm 8,38\mu\text{mol/g}$ ermitteln, für die Low Responder mit $n=8$ der Mittelwert von $14,12\mu\text{mol/g} \pm 7,18\mu\text{mol/g}$. Bei dem gezeigten Vergleich beträgt $p=0,27$. Aufgrund mangelnder Qualität der Spektren konnten Daten von weiteren $n=2$ Teilnehmern der High Responder und von weiteren $n=8$ Teilnehmern der Low Responder nicht valide ausgewertet werden. Die Power beträgt 0,19.

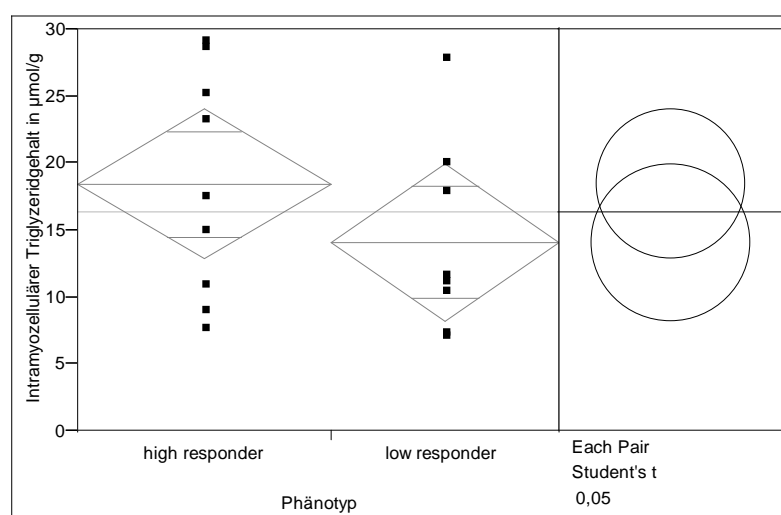


Abb. 16: Zweiseitiger t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen der Stichproben „High und Low Responder“

Die Abb. 17 zeigt den intramyozellulären Triglyzeridgehalt in Abhängigkeit vom maximalen postprandialen Triglyzeridgehalt im Serum des jeweiligen Probanden. Dabei weist die lineare

Regressionsgerade eine Steigung von 0,0079 auf, auch Regressionskoeffizient genannt. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist $r=0,16$.

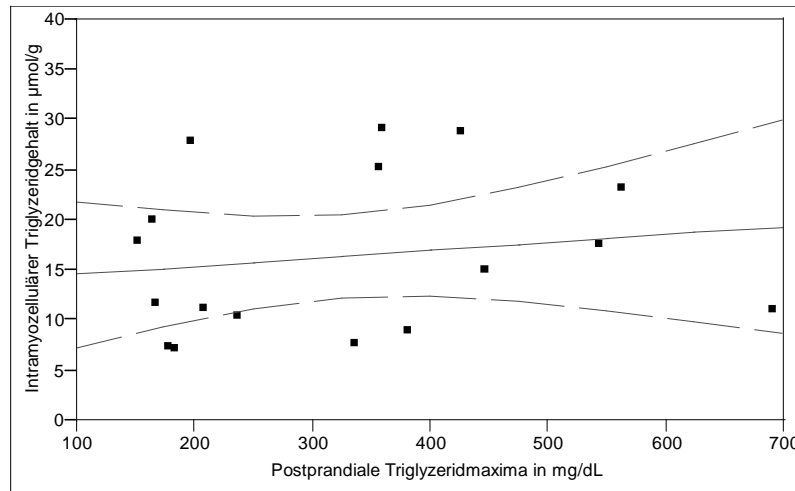


Abb. 17: Bivariater Zusammenhang zwischen intramyocellulären Triglyzeridgehalt und postprandialen Triglyzeridmaxima im Serum mit Regressionsgerade und Konfidenzintervall

3.2.2 MRS-Charakterisierung des intramyocellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp

Bei den Mittelwerten von $34,95\mu\text{mol/g} \pm 17,08\mu\text{mol/g}$ mit $n=11$ für Variante A und $21,63\mu\text{mol/g} \pm 8,61\mu\text{mol/g}$ mit $n=8$ für Variante B ist mit $p=0,06$ der Unterschied im Triglyzeridgehalt grenzwertig signifikant. Bei dem gezeigten Vergleich beträgt $p=0,27$. Aufgrund mangelnder Qualität der Spektren konnten Daten von weiteren $n=7$ Teilnehmern der Variante A und von weiteren $n=10$ Teilnehmern der Variante B nicht valide ausgewertet werden. Die Power beträgt 0,48.

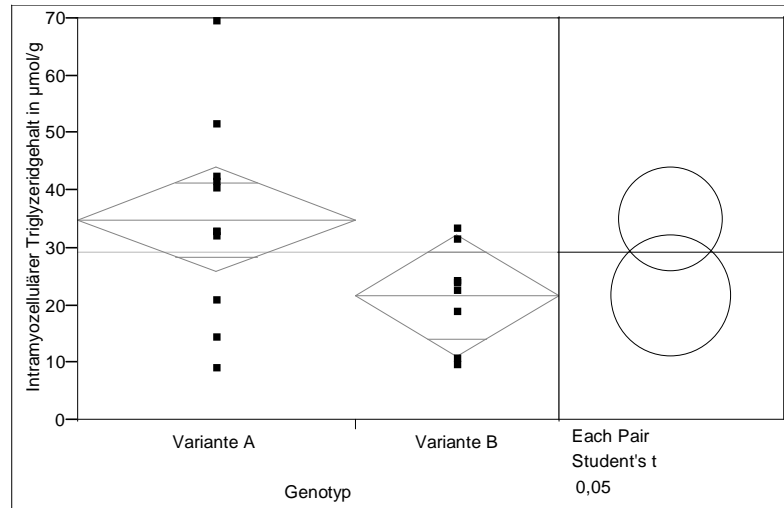


Abb. 18: Zweiseitiger t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen der Stichproben Variante B und Variante A

3.3 MRS-Charakterisierung nach Intervention

3.3.1 MRS-Charakterisierung des intramyocellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp nach Intervention mit mittelkettigen Fettsäuren

Nach Intervention mit mittelkettigen Fettsäuren ergibt sich für die Variante A ein Mittelwert von $15,91\mu\text{mol/g} \pm 6,14\mu\text{mol/g}$ mit $n=5$. Bei Variante B liegt der Mittelwert bei $14,92\mu\text{mol/g} \pm 4,48\mu\text{mol/g}$ mit $n=3$. Bei $p<0,82$ ist der Unterschied der Mittelwerte nicht signifikant. Aufgrund mangelnder Qualität der Spektren konnten Daten von weiteren $n=4$ Teilnehmern der Variante A und von weiteren $n=5$ Teilnehmern der Variante B nicht valide ausgewertet werden. Die Power beträgt 0,055.

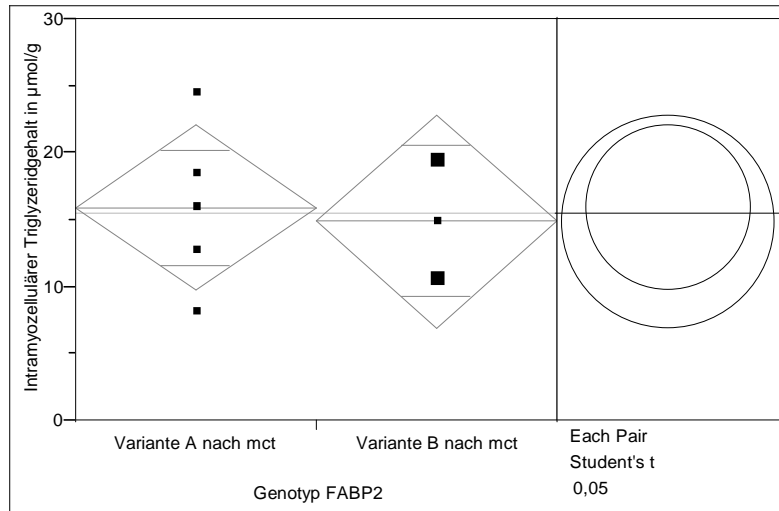


Abb. 19: Zweiseitiger t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen der Stichproben Variante A und Variante B nach Intervention mit mittelkettigen Fettsäuren

3.3.2 MRS-Charakterisierung des intramyocellulären Triglyzeridgehalts in Abhängigkeit von dem Genotyp nach Intervention mit langkettigen Fettsäuren

Nach der Nahrungsergänzung mit langkettigen Fettsäuren liegt für die Variante B der Mittelwert bei $23,52\mu\text{mol/g} \pm 11,95\mu\text{mol/g}$ mit $n=7$, während bei Variante A nur ein Wert mit $44,41\mu\text{mol/g}$ in die Statistik eingegangen ist. Aufgrund mangelnder Qualität der Spektren konnten Daten von weiteren $n=2$ Teilnehmern der Variante A und von weiterem $n=1$ Teilnehmer der Variante B nicht valide ausgewertet werden. P ist 0,15 und die Power 0,12.

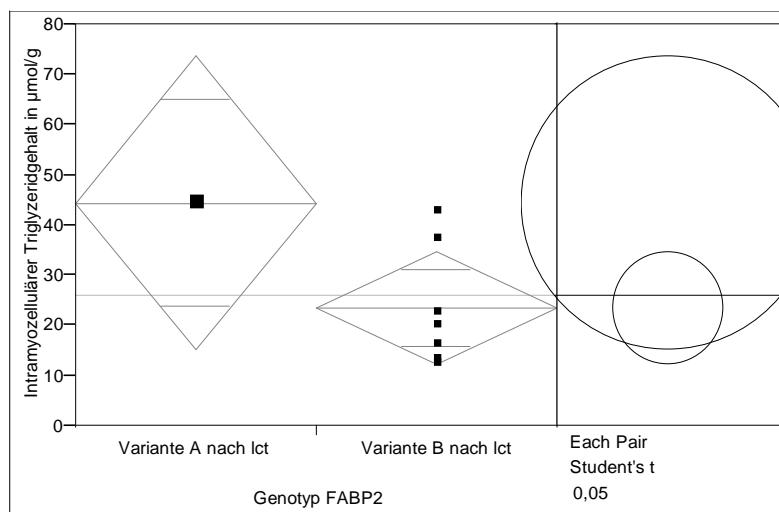


Abb. 20: Zweiseitiger t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen der Stichproben Variante A und Variante B nach Intervention mit langkettigen Fettsäuren

Die Annahme gleicher Varianzen ist für einen Wert, wie in dieser Statistik gemacht, nicht überprüfbar.

4 Diskussion

Mit dem erarbeiteten MRS-Protokoll wurde die Methode etabliert.

4.1 Phänotyp

Die beiden Probandengruppen, Low Responder und High Responder, charakterisieren sich durch physiologische Stoffwechselfparameter, die sich im Blut bestimmen lassen und evtl. auf eine Prädisposition schließen lassen und/oder sich als Trigger für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms verstehen lassen.

Die High Responder werden anhand ihrer postprandialen Triglyzerid-Maxima, die über 260 mg/dl liegen, nach Aufnahme eines standardisierten oralen Lipidtoleranztests unabhängig vom Nüchterntriglyzeridwert klassifiziert [29]. Neben dieser spezifischen Eigenschaft der High Responder sind weitere Merkmale in der Literatur beschrieben. Bei den High Respondern ist die Insulinsensitivität reduziert. Es ist eine höhere viszerale Fettmasse nachweisbar. Postprandial wird ein höherer Energieverbrauch gemessen und das Verhältnis der Proinsulin- und Insulinsekretion ist erhöht [31]. Weitere Studien zeigen, dass erhöhte postprandiale Triglyzerid-Maxima mit Chylomikronen-Remnants und Intermediate-Density-Lipoproteinen (IDL), die durch ihre atherogenen Eigenschaften bekannt sind, korrelieren [27]. Hohe postprandiale Triglyzeridmaxima sind mit erhöhtem Atheroskleroserisiko assoziiert. Auch die Tatsache, dass die Insulinspiegel ebenfalls erhöht sind, deutet in Richtung eines metabolischen Syndroms [27, 32-35].

In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem IMCL der Low Responder und der High Responder nachgewiesen werden, obgleich der Mittelwert der High Responder um $4\mu\text{mol/g}$ höher als bei den Low Respondern liegt. Im weiteren Rahmen lässt sich $p < 0.27$ als eine Tendenz werten. Der Unterschied der im Blut bestimmten Triglyzeridmaxima zwischen High und Low Respondern lässt sich also an dem Ergebnis des IMCL nur bedingt vermuten und ablesen.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass der IMCL ein guter Parameter ist, um die Insulinsensitivität zu bestimmen, und dass darüber hinaus Lipide ein wichtiger Faktor bei der Insulin vermittelten Glucosetoleranzstörung sind. Lipidoxidation ist bei Insulinresistenz erhöht, und freie Fettsäuren vermindern die Glucoseaufnahme am Skelettmuskel [9]. Auch ist neben der ^1H -MRS evtl. die ^{13}C -MRS geeignet, nicht-invasiv die Veränderungen des IMCL bei Menschen mit Diabetes bzw. mit einer Glucosetoleranzstörung zu detektieren [36] [37].

Da die Einteilung der Probanden nach einem diskreten Wert, in diesem Fall 260 mg/dl, nicht unkritisch zu sehen ist, erfolgte eine Regressionsanalyse. Bei einem linearen Zusammenhang des IMCL mit den postprandialen Triglyzeridwerten wären zwei Cluster bzw. Punktwolken zu erwarten gewesen, was nicht der Fall ist. Dies gibt auch der Korrelationskoeffizient nach Pearson mit 0,16 wieder, der gegen null tendiert, wenn kein Zusammenhang zwischen den korrelierten Werten vorliegt. In Bezug auf die Aussagen der im vorhergehenden Absatz genannten Literatur wäre ein Zusammenhang bzw. eine Korrelation zwischen den beiden Werten zu erwarten gewesen. Aufgrund der im Vergleich zur Effektstärke großen Streuung der Messungen lässt sich das hier nicht zeigen. Für eine Teststärke von 80% wäre ein Stichprobenumfang von mehr als 55 Teilnehmern pro Gruppe nötig gewesen. Der Zusammenhang ist hier also recht schwach, was sich auch in der niedrigen nicht-signifikanten Korrelation der MRS Ergebnisse mit den maximalen postprandialen Serum-Triglyzeridwerten von $r=0,16$ widerspiegelt. Auf den Aspekt der begrenzten Teststärke wird in der allgemeinen Fehlerdiskussion weiter unten noch einmal eingegangen.

4.2 Genotyp vor Intervention

Das intestinale FABP-Gen erhielt diesen Namen, weil es im Intestinum, präzise im Ileum und Jejunum des Dünndarms, entdeckt worden ist und dem Protein dort eine herausgehobene Rolle bei der Aufnahme von Fettsäuren beigemessen wird.

Phenotype	Genotype			Allele frequency	
	A/A	B/B	A/B	A	B
Controls	31%	20%	49%	55%	45%
Diabetics	40%	20%	40%	60%	40%

Abb. 21: Verteilung der FABP Varianten A und B in Menschen mit und ohne Diabetes im Vergleich [12]

Die Abb. 21 stellt dar, dass die Gen-Varianten ungefähr gleich verteilt sind. In den Untersuchungen [12] sowohl in vitro als auch in vivo war die Aktivität der Variante B signifikant höher als die Aktivität der Variante A, d. h. dass in den Enterozyten des Dünndarms entweder die Bindungskapazität der Variante B oder die Expression des entsprechenden Proteins größer ist, wobei nicht geklärt ist, ob FABP nur als Speicherprotein fungiert oder auch am Transport von Fettsäuren in das Blut bzw. in die Lymphe beteiligt ist.

Bisher gibt es keine MRS-Daten zur Bestimmung des IMCL-Gehaltes in Abhängigkeit von Genvarianten zur Abschätzung der Insulinsensitivität im Hinblick auf die Genese des metabolischen Syndroms. Somit werden die beschriebenen FABP-Genvarianten darauf hin untersucht.

In dem Ergebnis spiegelt sich eine Tendenz mit $p=0,06$ wider, dass ein geringerer IMCL-Gehalt bei der FABP Variante B vorliegt, was auch als grenzwertige Signifikanz gewertet werden kann. Zu beachten ist auch hier, dass aufgrund der messtechnischen Probleme die statistische Teststärke mit 0,48 begrenzt war, wie die Post-hoc Poweranalyse ergab. Hätten alle Probanden valide Ergebnisse gezeigt, hätte mit 80%iger Teststärke mit einem signifikanten Ergebnis gerechnet werden können. Ansonsten würde das bedeuten, dass bei Variante B im Gegensatz zu Variante A periphere Zellen besser auf Insulin ansprechen würden und dass Variante B eher protektiv für die Prädisposition eines metabolischen Syndroms sprechen würde. Eine Studie kann diese These dadurch zum Teil untermauern, dass gezeigt wurde, dass die Variante B mit einem geringeren Risiko für Diabetes korrespondiert [38]. Es finden sich allerdings auch gegenteilige Ergebnisse für die Variante B [14], bei der jedoch noch ein Exon im FABP-Gen eine wichtige Rolle einnimmt. Es handelt sich um eine homozygote Genausprägung mit T54T, die höhere postprandiale Triglyzerid-Spiegel und eine verminderte Insulinsensitivität nach sich zieht unabhängig vom FABP2-Promotorpolymorphismus.

4.3 Genotyp nach Intervention

Durch fettreiche Diät kann eine schnelle Veränderung des IMCL erreicht werden [39]. Über mittelkettige Fettsäuren, die diätetisch verabreicht werden, ist ein positiver Effekt auf den Insulin vermittelten Glucosemetabolismus beschrieben [40], während bei langkettigen Fettsäuren kein entsprechender Einfluß zu beobachten ist. Zu erklären ist dieser Aspekt durch die bessere Wasserlöslichkeit der mittelkettigen Fettsäuren. Daher erfolgt die bessere Aufnahme im Dünndarm sowie der nicht über Chylomikronen vermittelte Transport zur Leber und der nicht an Enzym (Carnitin gebunden) gekoppelte Übertritt in die Mitochondrienmatrix, wo die β -Oxidation zur ATP-Gewinnung stattfindet, relativ schneller [40]. Zusammenfassend steht im Vordergrund die Verstoffwechslung der mittelkettigen Fettsäuren anstatt der Einlagerung im peripheren Gewebe als Energiereserve, wie es bei den langkettigen Fettsäuren häufig der Fall ist. Bei längerer Diät mit mittelkettigen Fettsäuren ist

die positive Auswirkung umstritten. Weitere Eigenschaften, die den mittelkettigen Fettsäuren zugeschrieben werden, sind nicht eindeutig belegt [41].

Bei den beiden Genvarianten liegt der IMCL-Wert nach 14-tägiger Nahrungsergänzung mit mittelkettigen Fettsäuren praktisch auf demselben Niveau ($p < 0,82$). Aufgrund von Rekrutierungsproblemen sowie den messtechnisch bedingten Ausschlüssen konnten nur 5 bzw. 3 Teilnehmern in den beiden Genvariantengruppen untersucht werden. Ferner handelte es sich nur um eine Querschnittsanalyse nach Ende der Intervention, ein Basiswert konnte nicht erhoben werden. Somit ist die Aussagekraft sehr eingeschränkt. Akzeptiert man die begrenzten Daten als Anhaltspunkt für die Streuung der Werte bei einer derartigen Querschnittsuntersuchung, so wäre auch bei erheblich gesteigerter Fallzahl kaum mit gruppenspezifischen Unterschieden zu rechnen (für eine Teststärke von 80% wären über 500 Patienten pro Gruppe vonnöten). Geht man allerdings von den an anderen Patienten in der Querschnittsanalyse ohne Intervention beobachteten Gentypp-assoziierten Unterschieden aus, so stellt sich die beobachtete Gleichheit der Werte nach Intervention in einem anderen Licht dar.

Da im Studiendesign keine Messung des Ausgangswerts des IMCL vor Intervention vorgesehen war, ist ein Rückgriff auf die beiden Probandengruppen ohne Intervention erforderlich, um evtl. eine grobe Einschätzung der Veränderung des IMCL durch mittelkettige Fettsäuren zu machen. Danach wäre bei Variante A ein Rückgang um $19,04 \mu\text{mol/g}$, bei Variante B nur um $6,71 \mu\text{mol/g}$ aufgetreten. Dabei wäre anzunehmen, dass der Effekt von mittelkettigen Fettsäuren bei Variante A, die mit einem höheren Risiko einzuschätzen war, größer ist als bei Variante B. Das höhere Risiko eines metabolischen Syndroms bei Menschen mit homozygoter Chromosomenanlage der Variante A ließe sich durch Ernährung mit mittelkettigen Fettsäuren vermindern. Eine entsprechende Ernährung wäre also als vorteilhaft anzusehen.

In der Literatur sind bisher im Zusammenhang mit dem FABP und mittelkettiger Fettsäureintervention keine Beobachtungen beschrieben. Zur weiteren Analyse der Effekte von mittelkettigen Fettsäuren wäre also eine kontrollierte Longitudinalstudie erforderlich.

Da langkettige Fettsäuren nicht hydrophil wie die mittelkettigen Fettsäuren sind, ist die Eigenschaft der Membrangängigkeit nicht gegeben. Für den Metabolismus von langkettigen Fettsäuren sind Transportenzyme notwendig sowohl im Darm als auch in den nachgeschalteten zentralen und peripheren Geweben [42, 43]. In der Lymphe gelangen die langkettigen Fettsäuren in Chylomikronen in den Blutkreislauf, wo ein Teil der Fettsäuren durch Hydrolyse für die Versorgung von Muskel und Fettgewebe freigesetzt wird. Die entstehenden Remnants werden durch die Leber aufgenommen [3].

Die Interpretation des Einflusses einer Intervention mit langkettigen Fettsäuren müssen auf Grund der niedrigen Fallzahlen spekulativ bleiben. Zwar deutete sich ein Trend ($p < 0,15$) im Unterschied zwischen den Genvarianten an, doch basierte dies auf nur einem Wert für die Gruppe mit Genvariante A. Immerhin ist die Streuung der Werte für die Genvariante B im üblichen Bereich, so dass man bei Annahme eines Gruppenunterschiedes in der beobachteten Größenordnung von etwa $20 \mu\text{mol/g}$ schon mit einem geringem Stichprobenumfang von 7 Personen pro Gruppe mit 80% Teststärke ein signifikantes Ergebnis erwarten könnte. Im Vergleich zu mittelkettigen Fettsäuren ist bei langkettigen Fettsäuren kein positiver Effekt, der den IMCL beeinflusst, beschrieben [40]. Im Gegenteil, langkettige Fettsäuren können, wenn auch nicht für den Musculus soleus, sondern für den Musculus tibialis anterior beschrieben, den IMCL erhöhen [39]. Mit aller Vorsicht kann man die gewonnenen Daten als Bestätigung für diese Literaturquelle ansehen. Während die Werte für die Variante B praktisch unverändert blieben, käme es unter Intervention mit langkettigen Fettsäuren nicht zu einem Abfall, sondern ev. zu einem Anstieg des IMCL bei der Genvariante A.

4.4 Vor-und Nachteile des Musculus soleus bei der MRS

Wie eingangs erwähnt, konnten 49% der Spektren nicht in die Statistik eingeschlossen werden. Unter diesen Umständen ist eine allgemeine Fehlerdiskussion angebracht. Zunächst wird auf die Wahl des Musculus soleus eingegangen.

Der Musculus soleus, an dem die MRS durchgeführt wurde, ist ein gefiederter Muskel.

Die Ausrichtung der Muskelfasern ist nicht parallel zum Magnetfeld B_0 , sondern die Muskelfasern laufen in einem spitzen Winkel zueinander und überkreuzen sich zum Teil [21]. Erklären lässt sich diese Anordnung durch die Anatomie des Muskels. Die Ursprünge des Musculus soleus setzen sowohl am Wadenbein als auch am Schienbein an [44]. Der Muskel formt einen Sehnenspiegel, der die Achillessehne mit bildet, die am Fersenbein ansetzt. Damit lässt sich die Fiederung des Musculus soleus erklären (Abb. 22).

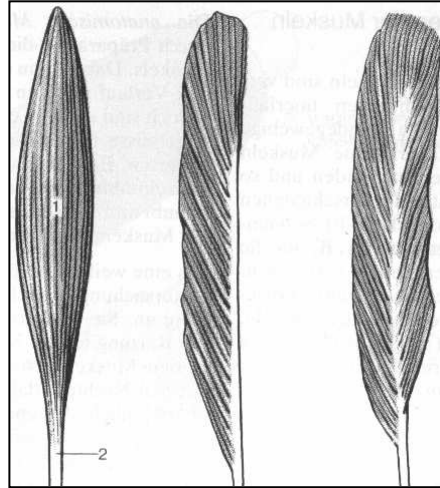


Abb. 22: Darstellung der Muskelformen mit 1 als Muskelbauch und 2 als Sehne, links M. fusiforme (parallele Muskelfasern), in der Mitte und rechts Mm. pennati (gefiederte Muskelfasern) [45]

Für die MRS ist ein spindelförmiger Muskel besonders geeignet, in dem die Muskelfasern annähernd parallel laufen, weil daraus eine bessere Signalauftrennung von IMCL und EMCL resultiert. Als Beispiel wäre am Unterschenkel der Musculus tibialis anterior anzuführen, an dem auch Messungen gemacht werden können (Abb. 23).

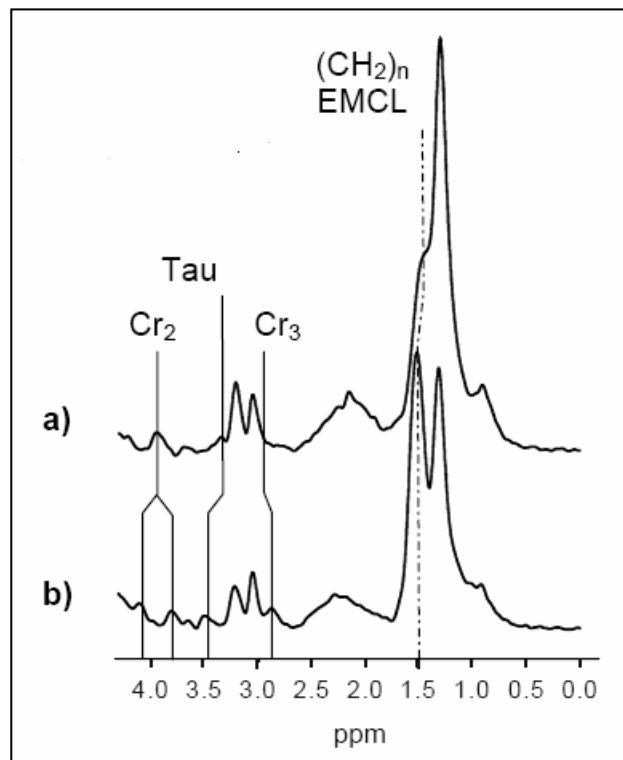


Abb. 23: Vergleich der MR-Spektren am M. soleus (a) und am M. tibialis anterior (b) [46]

In dieser Studie wurde der Musculus soleus gewählt, weil ein höheres Signal erwartet wurde. Das Aktivitätsniveau im Musculus soleus und im Musculus tibialis anterior ist unterschiedlich und damit auch die Faserverteilung von slow twitch und fast twitch Fasern, die im Volksmund auch als rote und weiße Muskelfasern bekannt sind [47]. D. h. der M. soleus arbeitet hauptsächlich aerob, während im M. tibialis anterior die Energiebereitstellung anaerob abläuft. In der aeroben Muskulatur ist der Anteil der Lipide höher [11, 44]. Mit einem höheren Lipidanteil ist die Signalintensität besser. Der Nachteil ist aber, dass das IMCL und das EMCL sich überlagern. Zwei Spektren zeigen dies beispielhaft in Abb. 23. Das rechte Spektrum wird in die Statistik einbezogen, weil eine gute Separation der beiden Peaks sichtbar ist. Im linken Spektrum lassen sich die IMCL- und EMCL-Signale bei 1,4 ppm und 1,6 ppm nicht differenzieren, siehe bitte Abb. 24. Der Proband musste also aus dem Datensatz ausgeschlossen werden.

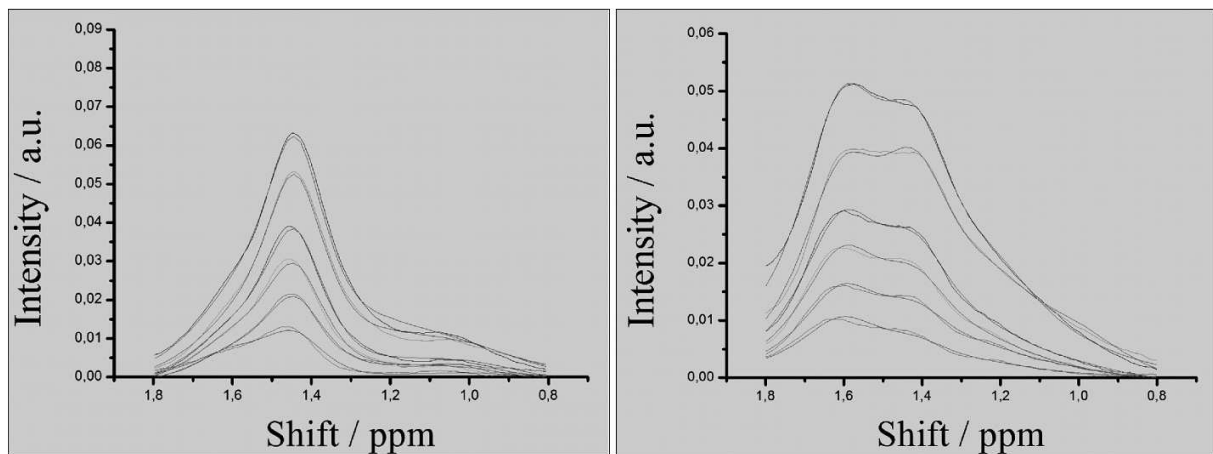


Abb. 24: Beispielhafte Darstellung von IMCL- und EMCL-Spektren nach 6 Echozeiten (TE) mit Regressionsanalyse

Die Probanden wurden im MRT mittels Kissen standardisiert gelagert. Hier wäre eine Lagerungsmöglichkeit mit Fixierung auch von Vorteil gewesen, mit der sich das Bein der Probanden hätte festschnallen lassen, um evtl. Bewegungsartefakten vorzubeugen, die zum Teil durch eine Kamera während der Messung gesehen wurden. Diese Artefakte wurden jedoch weder protokollarisch erfasst noch den Probanden zugeordnet.

Natürlich hat die Physiognomie der Probanden, die determiniert ist, Einfluß auf den muskulären Faserverlauf im Magnetfeld, der die Signalauftrennung mitbestimmt. Bei Probanden, bei denen der Musculus soleus schwach ausgebildet war bzw. wenig trainiert war, gab es zum Teil Schwierigkeiten, das voi zu positionieren.

Aus diesen Gründen ließen sich von 91 Messungen nur 52 auswerten.

Diese Faktoren erklären die große Streuung zwischen den IMCL-Werten in den einzelnen Gruppen. Die Wahl des Musculus soleus zur Bestimmung des IMCL hat den größten Einfluß auf die Spektrenqualität.

Um eine größere Zahl verwertbarer Spektren zu erhalten, wäre in Zukunft die Wahl des Musculus tibialis anterior anzuraten, bei dem die Signaltrennung aufgrund des Muskelfaserverlaufs besser ist. Trotzdem ließe sich vermutlich eine Streuung bei dieser Messung auch nicht vollständig verhindern, weil bei longitudinalen MRS-Studien des Musculus tibialis anterior an unterschiedlichen Tagen der IMCL um 15% variierte [48].

4.5 Probandenkollektiv

Bei dem Probandenkollektiv liegt das Hauptaugenmerk auf dem Fehler des IMCL in Zusammenhang mit körperlicher Fitness.

Bei den Probanden, die nach Intervention gemessen wurden, gab es keine Kontrollmechanismen bezüglich der Durchführung. Es versteht sich, dass es nicht möglich ist, Probanden in ihrem Lebensstil und –wandel aufgrund einer Studie zu überwachen oder zu restringieren. Inwiefern eine Intervention auch das Eßverhalten insgesamt beeinflusst, sei es bewusst oder unbewußt, ist und bleibt ungewiß. Insofern kann eine Intervention nur auf Vertrauensbasis verlaufen, die gleichzeitig eine Fehlerquelle darstellt.

Die Compliance der Probanden konnte anhand der veränderten Fettsäurenverteilung in den Chylomikronen des Blutserums im nüchternen Zustand verifiziert werden [30]. Diese Untersuchung wurde in der BfEL durchgeführt. Dabei waren alle Probanden compliant.

Anzumerken ist noch, dass die Probanden sich auf unterschiedliche Weise zu den Messungen begeben haben. Über die Auswirkungen von körperlicher Aktivität auf den IMCL-Wert kommen Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen [10, 49]. Unter der Annahme, dass Probanden zu Fuß oder auf dem Fahrrad sich nicht bis zur körperlichen Erschöpfung verausgabt haben, ist davon auszugehen, dass der IMCL nicht beeinflusst wurde, weil bei leichter bis mittlerer Aktivität die Energie aus den Phosphocreatin- und Glykogenreserven ausgenutzt wird [49]. Anders wäre die Situation, wenn sich die Probanden an das Aktivitätsniveau zum Beispiel wie bei einem Marathon annähern würden. Dann würden durch die Verstoffwechslung von IMCL falsch erniedrigte Werte desselbigen bestimmt. Letzteres anzunehmen wäre aber in diesem Fall eher unwahrscheinlich. Deshalb kann der Aspekt der Präuntersuchungsaktivität als Fehlerquelle vernachlässigt werden.

Bei der MRS-Messung ist das durchschnittliche sportliche Fitnessniveau der Probanden zu beachten. Es gibt Studien, die eine positive Korrelation zwischen erhöhtem IMCL-Gehalt und physischer Fitness belegen [21]. Dabei ist insbesondere das rechte Schema der Abb. 25 interessant, weil die Insulinsensitivität nicht unbedingt negativ mit hohem IMCL korreliert. Ausschlaggebender Faktor ist die physische Fitness, d. h. bei trainierten Menschen kann der IMCL bei guter Insulinsensitivität des peripheren Gewebes erhöht sein.

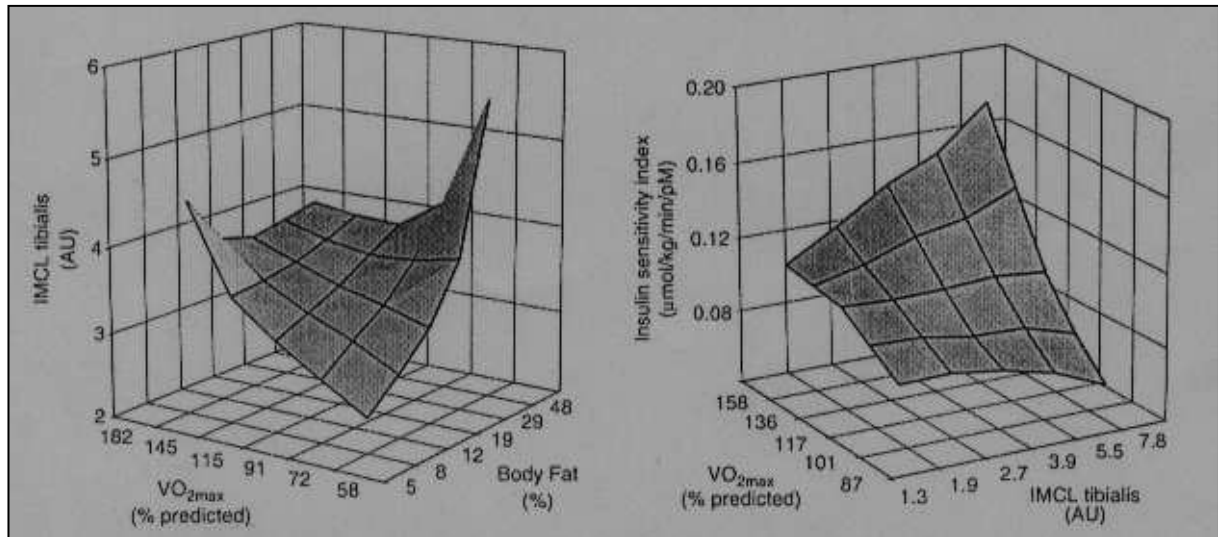


Abb. 25: Abhängigkeit von IMCL-Gehalt, physischer Fitness und Insulinsensitivität [21]

Da wir keine Aussagen zur Fitness der Probanden treffen können bzw. dieses Kriterium nicht abgefragt wurde, können auch zum Teil entsprechend falsch erhöhte IMCL-Werte bei den Probanden vorliegen und eine Signifikanz verdecken. In welchen Probandengruppen falsch erhöhte IMCL vorliegen, lässt sich nicht sagen, da es sich nicht um einen gruppenspezifischen Effekt handelt. Ein Punkt, der sich aus diesem Sachverhalt ergibt, stellt einen Widerspruch zwischen negativer Korrelation von Insulinsensitivität und IMCL-Gehalt dar. Es ist davon auszugehen, dass dieser Effekt in der Speicherung des IMCL auf molekularer Ebene, d. h. im Zytosol der Myozyten, begründet liegt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die ^1H -Magnetresonanztomographie stellt eine nicht invasive Methode zur Bestimmung von Stoffwechselmetaboliten dar, die ohne Nebenwirkungen und Strahlenbelastung für Probanden angewendet werden kann.

Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie zum Teil keine Signifikanzen aufweisen, lassen sich anhand von Tendenzen Trends erkennen. Der auf Grund begrenzter Teststärke nur leicht und nicht signifikant niedrigere Wert des Phänotyps der Low Responder entspricht den Ergebnissen des oralen Glucose-Toleranztests und des oralen metabolischen Toleranztests. Bei den genotypisierten Probanden ist der IMCL bei der FABP Variante B grenzwertig signifikant niedriger als bei der Variante A. Damit wäre Variante B als protektiver Faktor gegenüber der Entwicklung eines metabolischen Syndroms anzusehen. Nach Intervention mit mittelkettigen Fettsäuren, denen ein positiver Effekt zugeschrieben wird, liegen die beiden Varianten mit dem IMCL auf demselben Niveau. Potentiell profitieren die Probanden mit einem höheren Risiko eines metabolischen Syndroms also stärker bei einer Diät mit mittelkettigen Fettsäuren. Langkettige Fettsäuren erhöhen den IMCL beider Genotypen nur mäßig. Eine Abklärung dieser Hypothesen müsste durch kontrollierte Longitudinalstudien erfolgen, bei denen MRS Untersuchungen vor und nach Intervention mit Fettsäuren durchgeführt werden sollten.

Die Ergebnisse hätten insgesamt vermutlich deutlicher ausfallen können, wenn der Musculus tibialis anterior zur Untersuchung gewählt worden wäre. Eine am Magneten befestigte Halterung zur Fixierung der Unterschenkel wäre auch von Vorteil gewesen.

Insgesamt ist die ^1H -Magnetresonanztomographie bei den Untersuchungen für den Stoffwechselmetabolismus eine etablierte Methode, deren Vorteile in dem nicht invasiven Vorgehen und der lokalisierten Messung in bestimmten Organen liegen.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich danke allen, die durch ihre Mitwirkung das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. rer. nat. C.-C. Glüer, Leiter der Arbeitsgruppe „Medizinische Physik“ an der Klinik für Diagnostische Radiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung. Ich danke ebenfalls Herrn Prof. Dr. med. J. Schrezenmeir, Direktor des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Kiel, der maßgeblich für die Thematik verantwortlich ist.

Meinen Betreuern, Herrn Dr. C. Liess, Herrn Dr. M. Wenzler sowie Frau Dr. E. Kossel, danke ich für die gute Betreuung und die kompetente Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Für die gute Kooperation mit den Mitarbeitern der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel möchte ich mich an dieser Stelle auch bedanken.

Frau P. Zschoche, die einen Teil der Messungen ausgeführt hat, und Frau P. Fadenrecht danke ich für ihre Unterstützung.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben

<i>Name</i>	Möller
<i>Vornamen</i>	Anatol Reuven
<i>Geburtsdatum/-ort</i>	20.04.1978 in Berlin
<i>Familienstand</i>	verheiratet mit einem Sohn
<i>Adresse</i>	Feldstr. 116, 24105 Kiel
<i>Telefon</i>	0431 8001993
<i>Email</i>	Anatol_Moeller@web.de

Schulbildung

<i>08/1988 - 05/1997</i>	Besuch der Kieler Gelehrtenschule mit der Allgemeinen Hochschulreife abgeschlossen
<i>08/1994 - 03/1995</i>	Besuch der Frensham Heights School, England
<i>08/1984 - 07/1988</i>	Besuch der Grundschule Kiel-Schilksee

Zivildienst

<i>08/1997 - 08/1998</i>	Zivildienst im Eiderheim Flintbek, Wohn- und Werkstätten für Behinderte
--------------------------	---

Studium

<i>04/2005</i>	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>04/2004 - 03/2005</i>	Praktisches Jahr mit dem Wahlfach Diagnostische Radiologie
<i>03/2004</i>	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>03/2002</i>	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
<i>08/2000</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>10/1998</i>	Beginn des Medizinstudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Berufserfahrung

<i>Seit 07/2006</i>	Assistenzarzt in Chirurgie/Unfallchirurgie in der Landkreis Mittweida Krankenhaus gGmbH, Standort Rochlitz, Sachsen
<i>08/2005 - 04/2006</i>	Assistenzarzt in der Neurochirurgie in der Ostseeklinik Damp GmbH