

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H. U. Häring

**Identifizierung und Quantifizierung von myo- und
chiro- Inositol in Plasma und Erythrozyten von
erstgradig Verwandten an Diabetes mellitus Typ 2
erkrankter Patienten**

Inaugural- Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard- Karls- Universität

zu Tübingen

Vorgelegt von

Stefan Johannes Namislo

aus

Ankum

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Luft

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Bruchelt

**Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforschliche erforscht zu haben und
das Unerforschliche zu verehren.**

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Diabetes mellitus | 1 |
| 1.1.1 | Definition | 1 |
| 1.1.2 | Epidemiologie..... | 1 |
| 1.1.3 | Klassifikation | 3 |
| 1.1.4 | Diabetes mellitus Typ 1 | 5 |
| 1.1.5 | Diabetes mellitus Typ 2 | 5 |
| 1.2 | Inositol..... | 6 |
| 1.2.1 | Vorkommen | 6 |
| 1.2.2 | Struktur und Biosynthese | 7 |
| 1.2.3 | Stoffwechsel | 12 |
| 1.2.4 | Physiologische Bedeutung | 13 |
| 1.2.5 | Inositol als second messenger der Insulin- Wirkung..... | 14 |
| 1.3 | Inositol und Diabetes mellitus..... | 16 |
| 1.4 | Inositol und andere Erkrankungen..... | 16 |
| 1.5 | Ziele der Arbeit | 17 |
| 2 | Material und Methoden..... | 18 |
| 2.1 | Chemikalien und Geräte..... | 18 |
| 2.1.1 | Chemikalien..... | 18 |
| 2.1.2 | Geräte | 19 |
| 2.1.3 | Gaschromatographie und Massenspektrometrie | 21 |
| 2.2 | Probenaufarbeitung..... | 27 |
| 2.2.1 | Vorbereitungen..... | 27 |
| 2.2.2 | Aufarbeitung der Plasmaproben..... | 29 |
| 2.2.3 | Aufarbeitung der Erythrozytenisolatproben | 29 |
| 2.2.4 | Lyophilisation..... | 30 |
| 2.2.5 | Umsetzen und Derivatisieren | 30 |
| 2.2.6 | Vorbereitung für die Messung am Gaschromatographen | 30 |
| 2.3 | Messung am Gaschromatographen mit massenspezifischem Detektor..... | 30 |
| 2.4 | Eichkurven | 31 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.5 | Präzision in der Serie | 32 |
| 2.6 | Statistik..... | 32 |
| 2.7 | Klinische Studie..... | 32 |
| 3 | Ergebnisse | 33 |
| 3.1 | Methodenentwicklung | 33 |
| 3.1.1 | Probenaufarbeitung..... | 33 |
| 3.1.2 | Derivatisierung..... | 34 |
| 3.1.3 | Chromatographie..... | 35 |
| 3.1.4 | Verwenden unterschiedlicher Parameter zur Datenakquisition bei Gaschromatographie und Massenspektrometrie | 36 |
| 3.1.5 | Identifikation und Quantifizierung | 36 |
| 3.1.6 | Eichkurven..... | 43 |
| 3.1.7 | Präzision in der Serie | 45 |
| 3.2 | Klinische Studie..... | 46 |
| 3.2.1 | Konzentrationen an Inositol in Erythrozytenisolat und Plasma | 46 |
| 3.2.2 | Verhältnis myo- / chiro- Inositol | 47 |
| 3.2.3 | Streubreite..... | 48 |
| 4 | Diskussion..... | 49 |
| 4.1 | Methodik..... | 49 |
| 4.2 | Klinische Studie..... | 50 |
| 4.2.1 | myo- und chiro- Inositol bei Diabetikern | 50 |
| 4.2.2 | chiro- Inositol | 50 |
| 4.2.3 | myo- Inositol | 51 |
| 4.2.4 | Verhältnisse zwischen myo- und chiro- Inositol..... | 52 |
| 4.3 | Bedeutung der Inositole als Mediatoren der Insulinwirkung bei Diabetes mellitus..... | 52 |
| 4.4 | Streubreite..... | 53 |
| 5 | Zusammenfassung | 55 |
| | Literaturverzeichnis..... | 58 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 66 |
| | Anhang I: Aufarbeitungsvorschrift..... | 68 |
| | Anhang II: Ergebnisse | 69 |

| | |
|------------------|----|
| Danksagung | 79 |
| Lebenslauf | 80 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: allo- Inositol | 7 |
| Abbildung 2: chiro- Inositol | 8 |
| Abbildung 3: cis- Inositol | 8 |
| Abbildung 4: epi- Inositol | 9 |
| Abbildung 5: muco- Inositol | 9 |
| Abbildung 6: myo- Inositol | 9 |
| Abbildung 7: neo- Inositol | 10 |
| Abbildung 8: scyllo- Inositol | 10 |
| Abbildung 9: Mögliche Synthese von myo- Inositol aus Glukose | 11 |
| Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen | 22 |
| Abbildung 11: Beispielhaftes Chromatogramm einer Plasma- Probe | 39 |
| Abbildung 12: Beispielhaftes Chromatogramm einer Erythrozytenisolat- Probe | 39 |
| Abbildung 13 : Spektrum Interner Standard | 40 |
| Abbildung 14 : Spektrum chiro- Inositol | 40 |
| Abbildung 15 : Spektrum myo- Inositol | 41 |
| Abbildung 16 : Ionenchromatogramm Interner Standard mit charakteristischen Ionen im Plasma | 41 |
| Abbildung 17 : Ionenchromatogramm Interner Standard mit charakteristischen Ionen im Erythrozytenisolat | 42 |
| Abbildung 18 : Ionenchromatogramm chiro- und myo- Inositol mit charakteristischen Ionen im Plasma | 42 |
| Abbildung 19 : Ionenchromatogramm chiro- und myo- Inositol mit charakteristischen Ionen im Erythrozytenisolat | 43 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 20: Eichgerade des chiro- Inositols | 44 |
| Abbildung 21: Eichgerade des myo- Inositols | 45 |
| Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationen von chiro- Inositol im Erythrozytenisolat und im Plasma | 46 |
| Abbildung 23: Vergleich der Konzentrationen von myo- Inositol im Erythrozytenisolat und im Plasma | 47 |
| Abbildung 24: Verhältnisse zwischen myo- und chiro- Inositol im Erythrozytenisolat und Plasma | 47 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach (1)..... | 4 |
| Tabelle 2: Ausgangskonzentrationen der verwendeten Substanzen..... | 31 |
| Tabelle 3: Konzentrationen der Eichreihe..... | 31 |
| Tabelle 4: Repräsentative Massenzahlen | 38 |
| Tabelle 5: Streubreite der Plasma- Proben..... | 48 |
| Tabelle 6: Streubreite der Erythrozytenisolat- Proben..... | 48 |
| Tabelle 7: Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben..... | 69 |
| Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben | 70 |
| Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben | 71 |
| Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben | 72 |
| Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben | 73 |
| Tabelle 8: Ergebnisse der Plasma- Proben | 74 |
| Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben | 75 |
| Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben | 76 |
| Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben | 77 |
| Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben | 78 |

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist gekennzeichnet als eine Störung der Glukose-Stoffwechselregulation, die als Hauptkriterium eine chronische Hyperglykämie aufweist (1) . Ursächlich dafür sind entweder eine alterierte Insulinsekretion oder eine verminderte periphere Insulinwirkung oder eine Kombination aus beiden. Durch die chronische Hyperglykämie werden Komplikationen über die diabetesspezifische Mikroangiopathie vorwiegend an Augen, Nieren und Nervensystem sowie über die diabetesassoziierte Makroangiopathie an Herz, Gehirn und peripheren Arterien ausgelöst (1).

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit ist eine Zunahme der Erkrankungshäufigkeit für Diabetes mellitus zu beobachten. Aus epidemiologischer Sicht ist die Datenlage für Deutschland lückenhaft.

1.1.2.1 Prävalenz

Nach Auswertung des Nationalen Diabetesregisters der ehemaligen DDR (2) und der Krankenkassendaten der AOK Dortmund (3) ergab sich für Deutschland bis zum Ende der 80er Jahre eine Gesamtprävalenz des Diabetes mellitus zwischen 4% und 5%.

Laut selbstanamnestischer Angaben im Bundesgesundheitsurvey von 1997/98 sind derzeit 4,7% der Männer und 5,6% der Frauen im Alter von 18-79 Jahren an Diabetes mellitus erkrankt (4). Da aber der Diabetes zu Beginn

der Erkrankung asymptomatisch verlaufen kann, muss eine beträchtliche Dunkelziffer berücksichtigt werden (5). Neue Zahlen weisen auf eine deutliche Steigerung auf 7% bis 8% der Erwachsenenbevölkerung in Deutschland, wie sich in einer neuen epidemiologischen Studie (6) zeigt. Auch in der Anwendung der von der WHO und der IDF gemachten Empfehlungen zur Diabetes-Diagnostik (7, 8) könnten Ursachen für diesen Trend liegen.

HbA1c-Messungen im Rahmen einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe zeigten eine Gesamthäufigkeit von 8,2% in Deutschland (6). In welchem Ausmaß die neuen Kriterien der American Diabetes Association (obere Normgrenze des Nüchternplasmawertes von 126 mg/dl (7 mmol/l)) die Diabetesprävalenz beeinflussen, ist nicht eindeutig geklärt. Die Auswertung eines amerikanischen Surveys, bei dem einzig der Nüchternblutzucker als Kriterium herangezogen wurde, gibt Hinweise für eine deutliche Abnahme der Prävalenz (9). Dagegen nimmt nach einer Meta-Analyse europäischer Studien die Diabetesprävalenz geringfügig zu (10). Die zur Diagnostik aktuell von der WHO und der IDF empfohlene Kombination von abgesehenem Nüchternblutzucker und 2-Std-Wert nach OGTT (7, 8) resultiert in einer Zunahme der Prävalenz um ca. 30-50% (10-12). Die Prävalenz des Typ 1-Diabetes bzw. des Typ 2-Diabetes stieg in Ostdeutschland zwischen 1960 und 1989 von 0,19% auf 0,66% bzw. von 0,44% auf 3,48% und damit um das 3,5- bzw. 7,9 fache (13). Für Westdeutschland liegen keine vergleichbaren, longitudinalen Studienergebnisse vor. Der Prävalenzanstieg des Typ 2-Diabetes wird auf eine Zunahme der Prävalenz der Adipositas (14) und die höhere Lebenserwartung der Diabetiker zurückgeführt. Der Anteil der Patienten mit Typ 1-Diabetes an allen Diabetespatienten in Deutschland wird gegenwärtig auf mindestens 5% bis 7% geschätzt. Neuere Studien zur Verbreitung des "verzögerten Typ 1-Diabetes im Erwachsenenalter" (Late Autoimmune Diabetes in Adults) lassen aber ein deutlich häufigeres Vorkommen vermuten. Möglicherweise verursacht dieser 10% bis 15% aller Diabetesmanifestationen im mittleren und höheren Lebensalter (15).

1.1.2.2 Inzidenz

Die Inzidenz des Diabetes mellitus über alle Altersgruppen liegt bei 358 pro 100.000 Personenjahre (16). Besonders hoch ist die Inzidenz des Diabetes mellitus bei den über 60jährigen mit etwa 1200/100.000 Personenjahre (2). Die Inzidenz des Typ 1-Diabetes in der Altersgruppe 0 bis 14 Jahren lag Ende der 80er Jahre in Ostdeutschland bei 7,4/100.000 Personenjahren (13). Kinder und Jugendliche der gleichen Altersgruppe in westdeutschen Bundesländern wiesen eine deutlich höhere Neuerkrankungsrate auf (Baden-Württemberg 1987–1993: 11,6/100.000 Personenjahre (17), 1987-1997: 12,4/100.000 Personenjahre (18), Nordrhein- Westfalen 1993/1994: 14,0/100.000 Personenjahre (19)). Vermutlich sind die höheren Inzidenzschätzungen der beiden westdeutschen Bundesländer sowohl auf eine regionale Variation der Diabetesinzidenz in Deutschland als auch auf einen Anstieg der Neuerkrankungsrate in den letzten Jahren zurückzuführen (19, 20).

1.1.3 Klassifikation

In Anlehnung an das Diabetes Programm des amerikanischen Center of Disease Control (21), an das Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (22) und in Übereinstimmung mit der Einteilung der Deutschen Diabetes Gesellschaft (1) werden in einer nosologischen Klassifikation folgende Typen des Diabetes mellitus unterschieden :

Tabelle 1: Klassifikation des Diabetes mellitus nach (1)

| |
|---|
| 1. Diabetes mellitus Typ 1 |
| A. Immunmediert |
| B. Idiopathisch |
| 2. Diabetes mellitus Typ 2 |
| A. Ohne Vorliegen einer Adipositas |
| B. Mit Vorliegen einer Adipositas |
| 3. Andere spezifische Typen |
| A. Genetische Defekte der β- Zellfunktion |
| Chromosom 20, HNF 4a (MODY 1) |
| Chromosom 7, Glukokinase (MODY 2) |
| Chromosom 12, HNF- 1a (MODY 3) |
| Mitochondriale DNA |
| Sonstige |
| B. Genetische Defekte der Insulinaktion |
| Typ A- Insulinresistenz |
| Leprechaunismus |
| Rabson- Mendenhall- Syndrom |
| Lipatrophischer Diabetes |
| Sonstige |
| C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas |
| Pankreatitis |
| Trauma / Pankreatektomie |
| Neoplasie |
| Zystische Fibrose |
| Hämochromatose |
| Fibrokalkulöse Pankreatikopathie |
| Sonstige |
| D. Endokrinopathie |
| Akromegalie |
| Cushing- Syndrom |
| Glukagonom |
| Phäochromozytom |
| Hyperthyreose |
| Somatostatinom |
| Conn- Syndrom |
| Sonstige |
| E. Pharmaka- und Chemikalieninduziert |
| F. Infektionen |
| G. Seltene Formen eines immunmedierten Diabetes mellitus |
| H. Sonstige gelegentlich mit Diabetes mellitus assoziierte genetische Syndrome |
| 4. Gestationsdiabetes |

1.1.4 Diabetes mellitus Typ 1

Beim Typ 1 Diabetes kommt es durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas zu einem Insulinmangel mit einem Insulinmangelsyndrom. Dieses weist die klassischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Keto(azido)se und Gewichtsverlust auf. Dabei zeigt sich eine Manifestationsbreite des Insulinmangels zwischen einer gestörten Glukosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglukosewerte bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung und möglichem Bewusstseinsverlust.

Der Typ 1 Diabetes manifestiert sich zumeist in jüngeren Lebensjahren, kann jedoch auch im späteren Lebensalter erstmals auftreten. Als typisch wird ein abrupter Beginn mit plötzlich einsetzenden Beschwerden und Symptomen angesehen. Dabei fallen 15-25% der schweren, bis zu Bewusstseinsverlust gehenden ketoazidotischen Stoffwechselentgleisungen auf den Beginn der Krankheit (23). Der Insulinmangel kann auch nur als gestörte Glukosetoleranz auftreten, die durch eine akute Stoffwechselbelastung, z.B. durch Infekte oder Operationen, exazerbieren und zur Entgleisung in eine häufig schwere Ketoazidose führen kann. In anderen Fällen kann über Jahre eine Restfunktion der B-Zellen erhalten bleiben, die eine ketoazidotische Stoffwechselentgleisung meist verhindert (24).

1.1.5 Diabetes mellitus Typ 2

Beim Typ 2 Diabetes kommt es eher selten zu schweren Stoffwechselentgleisungen, aber häufig zu schweren Komplikationen wie Mikro- und Makroangiopathie und Neuropathie. In Deutschland tritt diese Form des Diabetes mellitus am häufigsten auf. Die Störungen der Insulinwirkung und der Insulinsekretion bei den meist übergewichtigen Patienten sind stark variabel. Studien mit eineiigen Zwillingen haben gezeigt, dass zu ca. 90%

beide Geschwister an einem Typ 2 Diabetes erkrankten (25, 26). Die genetische Penetranz ist also sehr hoch.

Der Typ 2 Diabetes entsteht entweder durch eine alterierte Insulinsekretion (27-31), eine Insulinresistenz oder eine Kombination aus beiden Phänomenen (30, 32-35).

Im Unterschied zum Typ 1 liegt beim Typ 2 Diabetes keine autoimmune Zerstörung der B-Zellen zugrunde. Eine Therapie mit Diät, Bewegungsaktivierung und oralen Antidiabetika ist hier – zumindest bei Beginn der Erkrankung – häufig ausreichend. Als weitere Risikofaktoren zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes sind Übergewicht, falsche Ernährung sowie mangelnde körperliche Aktivität und höheres Lebensalter zu nennen. Die Adipositas gilt als unabhängiger Risikofaktor für eine Typ 2 Diabetes-Manifestation (36-41).

Er wird in zunehmendem Maße auch bei Kindern und Heranwachsenden diagnostiziert (21).

1.2 Inositol

1.2.1 Vorkommen

Inositol kommt sowohl in freier als auch in gebundener Form bei Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen sowie in höher organisierten Lebewesen wie Pflanzen und Tieren vor. In pflanzlichen Nahrungsmitteln findet sich Inositol als der Hexaphosphatester Phytinsäure. Es ist in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft sowohl in freier Form als auch als Phospholipid und in dieser Eigenschaft an die Zellmembran gebunden vorhanden (42). Als Bestandteil der Zellmembran findet man Inositol auch in allen menschlichen Zellen, jedoch abhängig vom Gewebe- Typ jeweils in unterschiedlicher Konzentration. Auch zwischen dem Intra- und Extrazellularraum gibt es Unterschiede hinsichtlich der Konzentration des

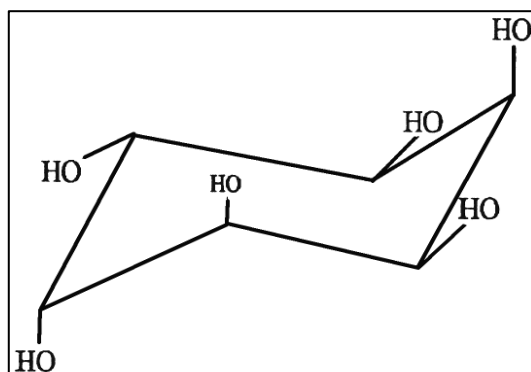
myo- Inositols: intrazellulär werden deutlich höhere Konzentrationen beobachtet als extrazellulär (43).

Industrielle Verwendung findet Inositol in unterschiedlicher Zusammensetzung und Dosierung in Getränken, die nach Angaben der Hersteller die körperliche und geistige Leistungsfähigkeit stärken sollen. Auch als Nahrungsergänzungsmittel und Bestandteil von Präparaten zur Prävention oder günstigen Beeinflussung verschiedener Erkrankungen sind Inositole im Handel frei erhältlich (44).

Mittlerweile ist der jeweilige Gehalt an myo- Inositol für eine Reihe verschiedener Nahrungsmittel bekannt. So findet man die größten Konzentrationen in Früchten, Bohnen, Getreide und Nüssen. Frische Früchte und Gemüse enthalten demnach mehr Inositol als tiefgefrorene oder salzfreie Produkte sowie Konserven. Auf dieser Grundlage lässt sich eine individuelle Diät mit einer bestimmten Menge an täglich aufgenommenem Inositol realisieren (45).

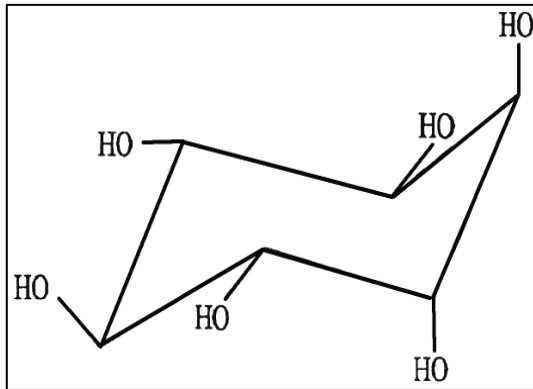
1.2.2 Struktur und Biosynthese

Inositol ist die triviale Bezeichnung für Hexahydroxycyclohexanole, also sechswertige Zuckeralkohole zyklischer Konfiguration mit der chemischen Formel $C_6H_6(OH)_6$. Inositol liegt in verschiedenen isomeren Formen vor, die sich durch die Position und Richtung der Hydroxy- Gruppen bezogen auf die Ringebene unterscheiden. In Anlehnung daran ergibt sich die Nomenklatur der Inositol- Isomere. Unterschieden werden:



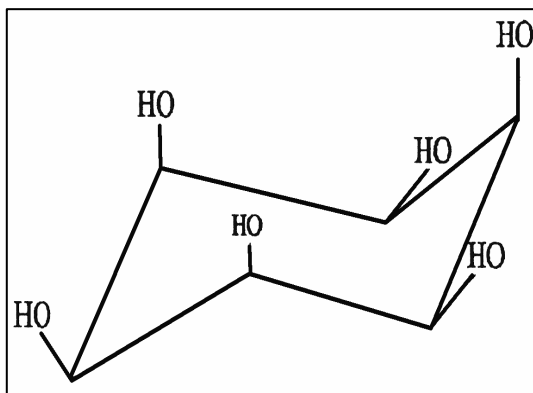
allo- Inositol (OH- Gruppe an Position 1,2,3,4 nach oben, an Position 5 und 6 nach unten gerichtet)

Abbildung 1: allo- Inositol



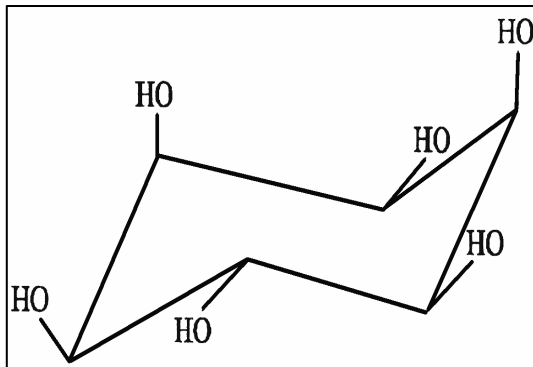
chiro- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,4 nach unten, an Position 3,5,6 nach oben gerichtet)

Abbildung 2: chiro- Inositol



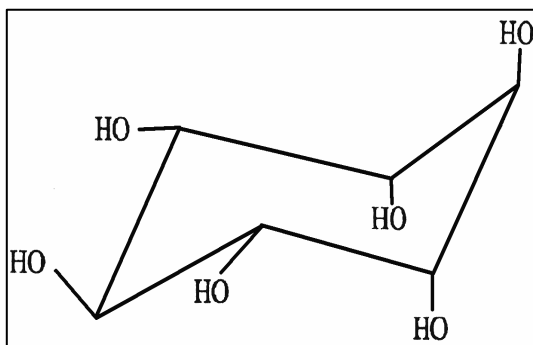
cis- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,3,4,5,6 nach oben gerichtet)

Abbildung 3: cis- Inositol



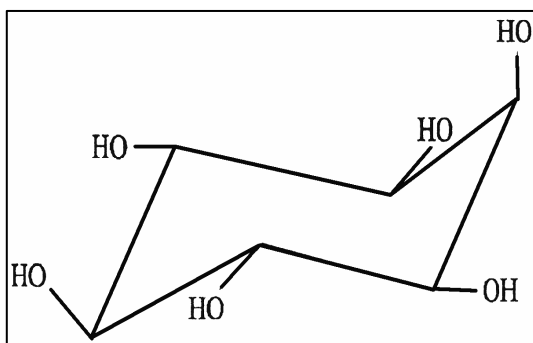
epi- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,3,4,5 nach oben, an Position 6 nach unten gerichtet)

Abbildung 4: epi- Inositol



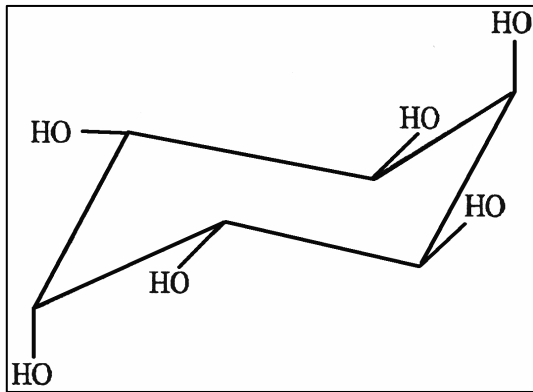
muco- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,4,5 nach unten, an Position 3 und 6 nach oben gerichtet)

Abbildung 5: muco- Inositol



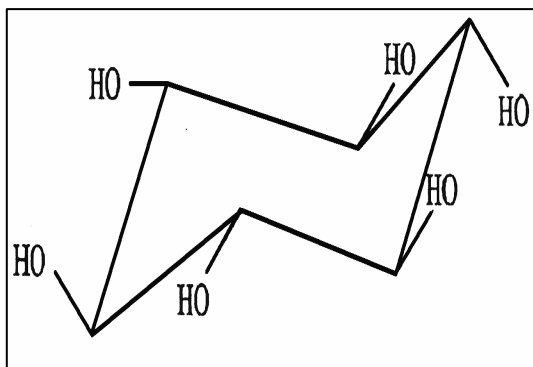
myo- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,3,5 nach oben, an Position 4 und 6 nach unten gerichtet)

Abbildung 6: myo- Inositol



neo- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,2,3 nach unten, an Position 4,5,6 nach oben gerichtet)

Abbildung 7: neo- Inositol



scyllo- Inositol (OH-Gruppe an Position 1,3,5 nach unten, an Position 2,4,6 nach oben gerichtet).

Abbildung 8: scyllo- Inositol

Eine Stereoisomerie ist für das chiro- Inositol beschrieben, welches durch chirale Umlagerung als D- chiro- Inositol oder als L- chiro- Inositol vorliegen kann.

Das am häufigsten vertretene Isomer der Inositole im menschlichen Organismus ist das myo- Inositol. Es kann auf unterschiedlichen Wegen de novo synthetisiert werden.

Die erste Möglichkeit besteht in der schrittweisen kompletten Dephosphorylierung von Inositol -1,4,5- Trisphosphat über Inositol- 1,4- Bisphosphat und Inositol- 4- Monophosphat zu freiem Inositol (46).

Einleitung

Eine weitere Möglichkeit soll die enzymatische Synthese aus Glukose sein (47). Zunächst wird Glukose unter ATP- Verbrauch und mit Mg^{2+} als Cofaktor durch die Hexokinase oder Glukokinase in Glukose- 6- Phosphat umgewandelt. Katalysiert durch die Inositol- 1- Phosphat- Synthase in Anwesenheit von NAD entsteht Inositol- 1- Phosphat, welches nach Dephosphorylierung durch die L- myo- Inositol- 1- Phosphat- Phosphatase zu L- myo- Inositol unter Abspaltung von freiem Phosphat umgewandelt wird (47).

Dies ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

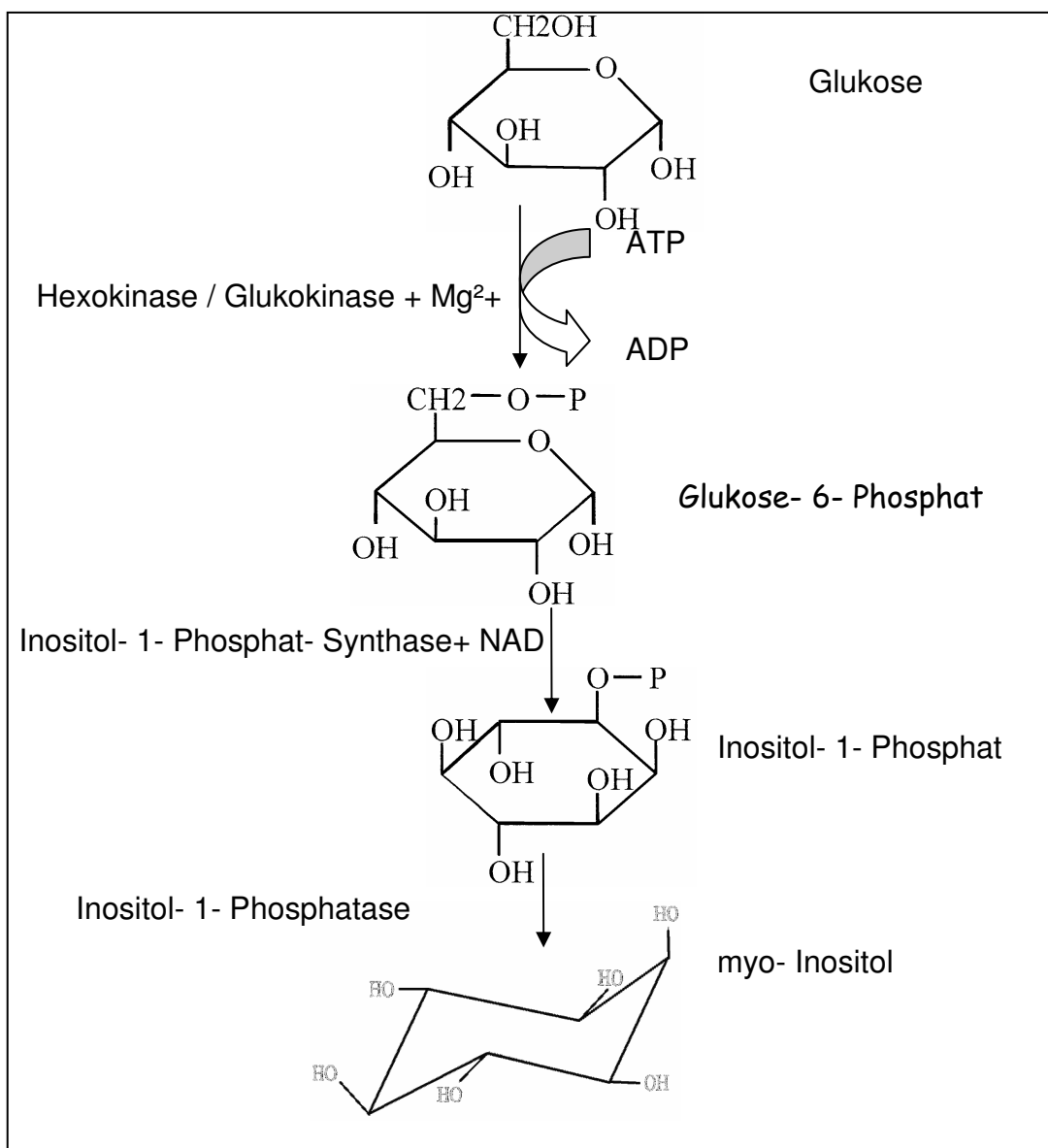


Abbildung 9: Mögliche Synthese von myo- Inositol aus Glukose

1.2.3 Stoffwechsel

Durch Versuche mit radioaktivem Inositol konnte man nachweisen, dass Inositol sich in verschiedenen Geweben in unterschiedlicher Konzentration anreichert (42).

Es liegen unterschiedliche Mechanismen zu Grunde, die die intrazelluläre Aufnahme von Inositol bewirken. Man unterscheidet Na^+ -abhängige und Na^+ -unabhängige Transportsysteme.

Zu den Na^+ -unabhängigen Transportsystemen gehört ein bidirektionales aktives Kanalsystem, das einen Transport von myo- Inositol sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus gegen einen eventuell vorliegenden Konzentrationsgradienten ermöglicht (48). Ein unidirektionales System wurde in Tierversuchen nachgewiesen, das über passive Diffusion und einen stereospezifischen, sättigbaren Carrier funktioniert und eine Aufnahme von myo- Inositol entlang eines Konzentrationsgradienten in die Zelle ermöglicht (49).

In der Mehrzahl der Zellen finden sich jedoch Na^+ -abhängige Transportsysteme, aktive und passive Systeme sind beschrieben. Zu den aktiven Transportern gehört ein stereospezifischer Kanal mit Sättigungskinetik, der in der Lage ist, sowohl myo- als auch chiro- Inositol zu befördern. Interessant hierbei war die Tatsache, dass es sich um einen kompetitiven Transportmechanismus handelte, um den die Inositol- Isomere konkurrieren. Die Affinität dieses Kanals liegt für myo- Inositol jedoch deutlich höher als diejenige für chiro- Inositol (50).

Passive Transportsysteme sind beschrieben, entweder als einfache Diffusion durch die Zellmembran entlang des Konzentrationsgradienten oder als - über bestimmte Carrier- Proteine vermittelte - sogenannte erleichterte Diffusion (48).

Intrazellulär wird Inositol in mehreren Schritten zu einem komplexen Phospholipid metabolisiert. Ausgangsprodukt ist Phosphatidat, aus dem durch Übertragung des Pyrimidinnucleotids CMP durch die Phosphatidat-Cytidyltransferase CDP- Diacylglycerol entsteht, was durch die CDP- Diacylglycerol- Inositol- 3- Phosphatidyltransferase mit Inositol zusammen zu

Phosphatidylinositol umgewandelt wird. Dieses Phospholipid kann jeweils unter ATP- Verbrauch durch die Phosphatidyl- Inositol- Kinase zu Phosphatidyl- Inositol- 4- Phosphat (PInsP) und weiter durch die Phosphatidyl- Inositol- 4- Phosphat- Kinase zu Phosphatidyl- Inositol- 4,5- Bisphosphat (PInsP₂) metabolisiert werden (51). PInsP₂ ist das Substrat der Phospholipase C , die durch hydrolytische Spaltung die Second messenger 2,3- Diacylglycerol (DAG) und myo- Inositol- 1,4,5- Trisphosphat (InsP₃) erzeugt (52).

InsP₃ kann durch entsprechende Phosphatasen schrittweise zu freiem Inositol dephosphoryliert werden.

Der hauptsächliche Katabolismus des Inositols findet in der Niere statt. Teilweise wird Inositol direkt ausgeschieden, teilweise zu Glucose, Glucuronolacton (53) oder zu CO₂ und H₂O metabolisiert (54).

1.2.4 Physiologische Bedeutung

Die physiologische Bedeutung der Inositole ergibt sich aus ihrer Funktion als Second messenger und Mediator unterschiedlicher zellulärer Vorgänge. Verschiedene Rezeptoren sind in der Lage, Inositol- 1,4,5- Trisphosphat zu binden. Hier sind unter anderem die Rezeptoren für Acetylcholin, Angiotensin II, Vasopressin, Noradrenalin und Insulin zu nennen. Inositol- 1,4,5- Trisphosphat bewirkt eine Freisetzung von Ca²⁺- Ionen aus membran- gebundenen Kompartimenten und dem endoplasmatischen Retikulum. Die dadurch 100 fach von 10⁻⁷ M auf 10⁻⁵ M erhöhte intrazelluläre Ca²⁺- Konzentration führt unter anderem zu einer Aktivierung verschiedener Enzyme, Ionenpumpen und „Zytoskelett- Komponenten“. So kommt es unter anderem zu einer Stimulierung des Glykogenabbaus in Leber, Muskulatur und Fettgewebe, zu einer Stimulierung sekretorischer Prozesse sowie zu einer Verstärkung einer Reihe von Effekten, die durch cAMP vermittelt sind (55).

1.2.5 Inositol als second messenger der Insulin- Wirkung

Es konnte gezeigt werden, dass Inositol ein Bestandteil von Substanzen ist, die an einigen der Insulin- Wirkungen beteiligt sind. In den letzten Jahren hat sich die Forschung auf zwei Arten von intrazellulären Prozessen konzentriert, die nach der Bindung von Insulin an dessen Rezeptor beobachtet werden konnten.

Der eine ist die Untersuchung von Änderungen des Phosphorylierungs- Grades des Rezeptors, insbesondere der Autophosphorylierung der β - subunit des Insulin- Rezeptors (56). Diese Autophosphorylierung verleiht dem Rezeptor eine Tyrosin- Kinase- Aktivität, die es ermöglicht, intrazelluläre Substrate wie das Insulin- Rezeptor- Substrat – 1 (IRS- 1) zu phosphorylieren mit nachfolgender Aktivierung von Serin- / Threonin- Kinasen (57).

Der andere Typ von intrazellulärem Vorgang, der vermutlich an der Insulin- Wirkung beteiligt ist, ist die Erzeugung bzw. Ausschüttung von Mediatoren und Modulatoren, die die Aktivität von Protein- Kinasen und Phosphatasen regulieren. Darunter ist eine Gruppe von Insulin- abhängigen Enzym- Modulatoren, die Inositol enthalten und zuerst von Saltiel und Cuatrecasas beschrieben wurden (58). Lerner et al. (59) hatten zuvor bereits einige Insulin- stimulierte Glykopeptide teilweise identifiziert und postuliert, dass sie Aminosäuren und Zuckeranteile enthalten. Saltiel und Cuatrecasas (58) gelang es, die Bestandteile als Inositol und Amino- Zucker, vermutlich auch Neutral- Zucker nachzuweisen.

Für myo- Inositol ist gezeigt worden, dass es ein Bestandteil von Phospholipiden und Membranlipiden in tierischen Zellen ist. Nachfolgend erwies es sich als Bestandteil verschiedener membranständiger Proteine (60), unter anderem von spezifischen Insulin- sensitiven Glycophospholipiden (58, 61) oder Phospho- Oligosacchariden (62), die strukturell verwandt sind mit Glykosyl- Phosphatidyl- Inositol (GPI) – Ankern (60). Diese Bestandteile werden auch als Inositol- Glykane oder Inositol- Phosphoglykan- Mediatoren bezeichnet (60). Die Zusammensetzung und Struktur dieser vermutlichen

Mediatoren der Insulin- Wirkung sind gegenwärtig noch nicht abschließend erklärt.

Chiro- Inositol wurde in der hydrophoben Anker- Domäne der Acetylcholinesterase (63, 64) und in der alkalischen Phosphatase der menschlichen Plazenta (64) nachgewiesen. Mato et al. (61) identifizierten ein chiro- Inositol- enthaltendes Insulin- sensitives Glykophospholipid, das von Larner et al. (65) als das D- Isomer von chiro- Inositol bestätigt werden konnte. Larner et al. (66) gelang es, aus diesem Insulin- sensitiven Glykophospholipid zwei vermutliche Mediatoren pH- abhängig zu trennen. Die eine Fraktion bei pH 2,0 enthielt chiro- Inositol und Galaktosamin, die zweite Fraktion bei pH 1,3 enthielt myo- Inositol und Glukosamin. Die erste Fraktion aktiviert die Pyruvat- Dehydrogenase- Phosphatase und die zweite hemmt die cAMP- abhängige Protein- Kinase.

Inositol- Phosphoglykan- Insulin- Mediatoren haben eine Reihe biologischer Effekte, unter anderem aktivieren sie die Glykogen- Synthase- Phosphatase (67), die Pyruvat- Dehydrogenase (68), die Pyruvat- Dehydrogenase- Phosphatase (69) und die cAMP- Phosphodiesterase (70) und hemmen die cAMP- abhängige Protein- Kinase (67). Für die Insulin- Mediatoren, die myo- und chiro- Inositol beinhalten, konnte gezeigt werden, dass sie den Glukose- Einbau in Glykogen fördern und den Plasma- Spiegel von Glukose bei STZ- diabetischen Ratten senken (71). Eine Senkung des postprandialen Glukose- Spiegels wurde auch für übergewichtige Insulin- resistente Rhesusaffen nachgewiesen, ohne dass eine reaktive Hyperinsulinämie ausgelöst wurde (72). Der D- chiro- Inositol enthaltende Insulin- Mediator ist in der Lage, sowohl die Glycerol- 3- Phosphat- Acyltransferase in Adipocyten von Goto- Kakizaki (GK)- Ratten (73) als auch durch allosterische Aktivierung der Protein- Phosphatase 2 C die Glykogen- Synthase zu aktivieren (74).

Im Rahmen von Studien konnte eine Wirkung der Inositole als sogenannte „Insulin- sensitizing agents“ im Sinne einer Senkung des Blutglukose- Spiegels in Rhesusaffen beobachtet werden (75). Auch ist bekannt, dass eine Reihe diabetischer pathophysiologischer Veränderungen mit Veränderungen der Inositol- Konzentration in den jeweiligen Geweben einhergeht (siehe

unten). Bisher ist eine industriell formulierte Anwendung von Inositol als Antidiabetikum noch nicht realisiert.

1.3 Inositol und Diabetes mellitus

Die diabetische Stoffwechselsituation, die durch Hyperglykämie gekennzeichnet ist, beeinflusst auch in hohem Maße den Inositol-Metabolismus. Es gilt als erwiesen, dass Glukose die Na^+ -abhängige Aufnahme von myo- Inositol in die Zelle hemmt (76). Es liegt also bei diabetischer Stoffwechsellage eine Situation des Inositol- Mangels in vielen Geweben vor. Es konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Gabe unterschiedlicher Isomere von Inositol positive Auswirkungen auf verschiedene, von Diabetes betroffene, Gewebetypen aufweist. So verbessert D- chiro- Inositol den Hyperinsulinismus (75), die Glukoseverwertung in Insulin- abhängigen Geweben, fördert den Einbau von Glukose in Glykogen und senkt den Plasmaglukose- Spiegel (71, 72, 74, 75). Im Tierversuch (Streptozocin- Ratten) hat sich gezeigt, dass Myo- Inositol ebenso in der Lage ist, die bei diabetischer Nephropathie erhöhte Aktivität der im Nierenmark gelegenen Na^+ - / K^+ - ATPase zu reduzieren (77) wie auch die Nervenleitgeschwindigkeit bei diabetischer Neuropathie zu verbessern (78).

1.4 Inositol und andere Erkrankungen

Inositole spielen als ubiquitär vorhandene Moleküle eine wichtige Rolle bei einer Reihe unterschiedlicher Erkrankungen.

Bei einigen Erkrankungen verändern sich die Konzentrationen der Inositole in den Zellen und in den die Zellen umgebenden Medien ebenso, wie es beim Diabetes mellitus beobachtet wird. Eine veränderte Produktion von Inositolen ist auch für chronische Niereninsuffizienz, Galaktosämie und Multiple Sklerose beschrieben (79). Eine Gabe von Inositol bei Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen und Panik- Störungen sowie

bei epileptischen Anfallsleiden zeigte eine Verbesserung der Symptome, während bei M. Alzheimer, Schizophrenie, Autismus und ADH (Attention Deficit and Hyperactivity- Syndrom) keine Besserung eintrat (80). Vorteilhaft eingesetzt wird es beim kindlichen respiratorischen Syndrom, als Analgetikum sowie zur Behandlung der unerwünschten Nebenwirkungen einer Lithium-Therapie (79).

Auch in der Thrombogenese und der Genese der Atherosklerose spielt Inositol in gebundener Form eine Rolle, da verschiedene Faktoren zur Plättchenaggregation durch Inositol- Derivate gehemmt werden (81). Der Nutzen von Inositol in der Schwangerschaft wird kontrovers diskutiert. Obwohl ein Vorteil bei der Prävention von Neuralrohrdefekten dokumentiert ist, besteht die Gefahr der Auslösung von Uterus- Kontraktionen (79). Beim Syndrom der polycystischen Ovarien wird Inositol bereits erfolgreich verwendet (82-84).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Bestimmung von myo- und chiro- Inositol in Plasma- und Erythrozyten- Proben zu entwickeln und zu validieren.

Als klinische Anwendung erfolgte dann der Einsatz dieser Methode im Rahmen der Tübinger Familien- Früherkennungs- Studie (TÜFF). Dabei wurden erstgradige Verwandte von an Diabetes- Typ 2 erkrankten Personen untersucht. Eine Analyse dieser Individuen auf den Inositol- Gehalt im Urin ist bereits durchgeführt worden. Unter Verwendung der neu etablierten Methode sollen Plasma und Erythrozyten auf ihren Inositol- Gehalt hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Alle Chemikalien- sofern nicht anders bezeichnet- wiesen den Qualitätsgrad "pro analysi" auf.

2.1.1 Chemikalien

AGA Gas, Hamburg:

Helium, verdichtet, Plus 4.6

Dr. L. Huang, Health Sciences Centre, Department of Pharmacology,
University of Virginia, USA:

D- chiro- Inositol

Fresenius, Bad Homburg:

physiologische Natrium- Chlorid- Lösung 0,9%ig

Charge: GG 1113

ICN Biochemicals Inc., Ohio, USA:

Myo- Inositol

Merck, Darmstadt:

2- Propanol

Charge: K 24078934 726

Acetanhydrid

Charge: K 21219042 519

Methanol

Charge: K28997609 111

Sigma- Aldrich, Steinheim:

Pyridin, wasserfrei, 99,8%ig

Charge: 32070 010

Sigma- Chemical Company, St. Louis, USA:

1,2,6- Trihydroxyhexan

Charge: 113 H 3521

2.1.2 Geräte

Analyseröhrchen

Röhrchen PP

12 * 75 mm, 5 ml, natur, Charge G. 115201

Heizblock

PIERCE, Rockford, USA:

Reakti- Therm Module

Typ 18940

Kulturröhrchen

VETTER, Ammerbuch:

PYREX®- Kulturröhrchen mit teflonbeschichtetem Deckel

Mikroliter- Zentrifugenröhrchen

Greiner Labortechnik:

PP- Microcentrifuge tubes

Charge: 00470108

Milliliter- Injektionsflasche mit Einsatz und Deckel

Ziemer, Mannheim:

1 ml- Injektionsflasche, Artikelnummer 1.300002

0,25 ml- Glasmikroeinsatz, Artikelnummer 1.300407

Bördelkappen, Artikelnummer 2.301079

Routineanalysegerät zur Bestimmung klinischer Parameter

Coulter® Electronics, Krefeld:

Coulter® Stacker Splus

Seriennummer: 6702882

Rotationsvakuumkonzentrator

Christ, Osterode:

Kühlfalle: ALPHA 2- 4, Typ 100402

Vakuumzentrifuge: ALPHA RVC, Typ 100000

Rüttelgerät (Vortex)

Heidolph, Kehlheim:

REAX 2000

Seriennummer: 59237712

Spitze Zentrifugengläser

Schott:

Spitze Reagenzgläser

Standzentrifuge

Hettich, Tuttlingen:

Zentrifuge Rotanta / RPC

Katalognummer: 4301

Tischzentrifuge

Hettich, Tuttlingen:

Mikroliter

Typ 2020

Ultraschallgerät

BANDELIN, Berlin:

Sonorex RK 100

Typ 43084

2.1.3 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

2.1.3.1 Gaschromatographie

Eine Analyse mittels Gaschromatographie (GC) wird in folgenden, kontinuierlich nacheinander ablaufenden Teilschritten durchgeführt: Ein Gas, eine verdampfbare Flüssigkeit oder ein verdampfbarer Feststoff wird in eine Trennsäule gegeben. Dort werden die Substanzen mit Hilfe eines Trägergases durch die thermostatisierte Säule transportiert, wo der chromatographische Trennvorgang stattfindet. Die getrennten Substanzen passieren dann nacheinander am Säulenende einen Detektor, der jeden einzelnen Bestandteil über einen Schreiber oder einen Computer anzeigt. Die Zeit zwischen Injektion der Probe und Signal am Detektor heißt Retentionszeit t_R . Die Netto-Retentionszeit t_R' ist die Differenz zwischen der Brutto-Retentionszeit t_R und der Zeit t_0 , in der ein, in der Säule keinen Wechselwirkungen ausgesetztes, Teilchen den Detektor erreicht. Voraussetzung für den Einsatz der GC ist, dass die zu untersuchenden Proben vollständig und unzersetzt in den Gaszustand überführt werden

können oder unter Zersetzung reproduzierbar verdampfbar sind. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau eines Gaschromatographen.

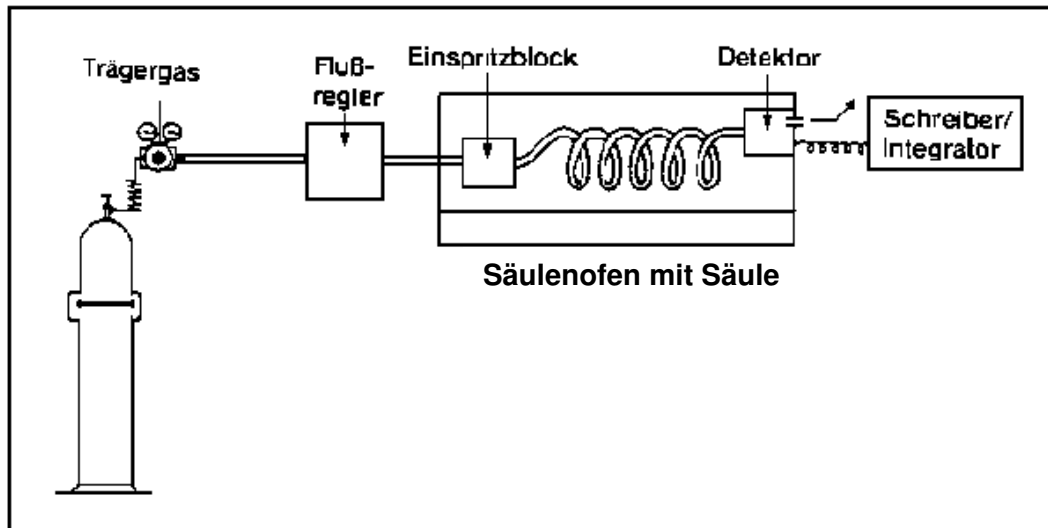


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographen

Gewöhnliche GC-Säulen haben Durchmesser von 3 bis 8 mm und eine Länge von 1 bis 3 m. Entsprechend dem Trennproblem kann die Füllung (stationäre Phase) aus einem festen Adsorptionsmaterial oder aus einem Material bestehen, bei dem auf einem festen, inerten Träger eine flüssige Trennphase aufgebracht ist.

Kapillarsäulen weisen Innendurchmesser von 0.1 bis 1 mm und Längen von 30 bis 300 m auf. Dabei wird die trennwirksame Schicht an der Innenwandung der Kapillare so angebracht, dass ein gasdurchgängiger Mittelkanal frei bleibt. Zu den Vorteilen der Kapillargaschromatographie zählen die ausgezeichnete Auftrennung sehr komplexer Gemische und chemisch sehr ähnlicher Verbindungen, die relativ große Sicherheit bei der Peakidentifizierung, die erhöhte Empfindlichkeit und hohe Trennleistung sowie die Möglichkeit der Kopplung mit spektroskopischen Methoden.

Die GC eignet sich prinzipiell für die Trennung von chemisch sehr ähnlichen Substanzen (z.B. homologen Reihen) mit unterschiedlichen Siedetemperaturen sowie die Trennung von Substanzen gleicher

Siedetemperatur mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und damit verschiedenen Wechselwirkungen mit der stationären Phase.

Der Erfolg einer gaschromatographischen Trennung ist im wesentlichen abhängig von der richtigen Wahl der Trennmedien. Darüber hinaus kann das Ergebnis der Trennung aber auch durch die Wahl einer geeigneten Temperatur bzw. eines Temperaturprogramms optimiert werden.

Nichtflüchtige oder unzersetzliche Verbindungen können durch chemische Umsetzungen in flüchtige stabile, für die GC geeignete Derivate überführt werden. Damit ist diese Technik zu Trennungen vor allem organischer, aber auch flüchtiger anorganischer Verbindungen einsetzbar. So können organische Einzelkomponenten oder Stoffgruppen bei Gehalten von bis zu wenigen 10^{-3} mg/m³ simultan bestimmt werden. Die Analysezeiten (ohne Probenvorbereitung) schwanken je nach Aufgabenstellung zwischen wenigen Minuten und mehreren Stunden bei schwierigen Trennproblemen.

2.1.3.2 Massenspektrometer (MS)

Bei der Massenspektroskopie werden die in der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehenden Molekülonen bzw. deren Fragmente zur Strukturaufklärung von Stoffen herangezogen. Voraussetzung für ihre Anwendbarkeit ist, dass die Probensubstanz im Vakuum ohne Zersetzung den zur Aufnahme des Spektrums erforderlichen Dampfdruck erreicht. In einer Ionisierungskammer werden die gasförmigen Moleküle dann mit Elektronen bombardiert, die gewöhnlich eine Energie von ca. 70 eV besitzen. Diese Energie reicht nicht nur aus, um die Moleküle durch Herausschlagen eines Elektrons zu ionisieren, sondern darüber hinaus die entstandenen positiven Ionen zu fragmentieren. In Abhängigkeit von der Molekülstruktur entstehen so charakteristische Bruchstücke, die entsprechend ihrem Verhältnis Masse/Ladung in einem Analysator (magnetisches und / oder elektrisches Feld) aufgetrennt (Massenfokussierung) und schließlich einem Empfänger zugeführt werden. Die Gesamtheit der Signale ergibt das

Massenspektrum. Die Lage des Signals (Peak) entspricht dem Verhältnis Masse/Ladung (m/z-Wert), die Intensität der Häufigkeit des jeweiligen Ions. Der m/z-Wert gibt zum einen Auskunft über die relative Molekülmasse. Zum anderen lassen sich aus ihm die Strukturen der geladenen Bruchstücke ableiten, die ihrerseits wiederum zur Struktur des intakten Moleküls in Beziehung stehen.

Analytisch wichtige Charakteristika der MS sind ihr hohes Nachweis- und Auflösungsvermögen sowie ihr Informationsgehalt hinsichtlich Molmasse und Molekülstruktur. Aufgrund seiner schnellen Ansprechzeit und seiner Aussagekraft ist das MS besonders gut zur Kombination mit GC-Säulen geeignet.

2.1.3.3 Quantitative Analyse

Die GC wird vielfach zur quantitativen Analyse von Flüssigkeits- und Gasmischungen eingesetzt. Die Fläche unter einem GC-Peak (area under the curve =AUC) ist der Konzentration der entsprechenden Komponente in der Mischung proportional. Aus diesem Grund liefert die Auftragung der Peakfläche gegen die Konzentration von Kalibrierstandards eine Kalibriergerade für die quantitative Analyse.

Die quantitative Analyse beruht auf der Proportionalität zwischen der Fläche des Peaks, der von einer Komponente hervorgerufen wird, und der Gesamtmenge der jeweiligen Komponente in der Probe. Somit ergibt die Auftragung der Gesamtmenge n_A der Komponente A gegen die Peakfläche F_A eine Ursprungsgerade mit der Steigung S_A : $n_A = S_A F_A$. Entsprechend erhält man eine zweite Gerade mit der Steigung S_B für eine reine Substanz B. S_A und S_B sind dabei die Nachweisempfindlichkeiten für die Komponenten A und B. Solche Kalibriergeraden können prinzipiell zur Analyse einer Mischung verwendet werden, die Genauigkeit dieser Methode ist jedoch durch die Genauigkeit begrenzt, mit der das Volumen und damit die Gesamtmenge der eingespritzten Probe bestimmt werden kann.

Für binäre Mischungen, die nur aus zwei Komponenten bestehen, kann diese Einschränkung durch die Aufnahme einer Kalibriergeraden umgangen werden, für die das Verhältnis der zwei Peakflächen als Funktion der Zusammensetzung der Mischung dargestellt ist. Dieses Peakflächenverhältnis sollte unabhängig vom Probenvolumen sein. Ist diese Kalibriergerade durch Vermessen verschiedener bekannter Mischungen einmal erstellt worden, so kann anhand des Peakflächenverhältnisses der entsprechende Wert für eine unbekannte Mischung abgelesen oder berechnet werden.

Zur Bestimmung des Peakflächenverhältnisses muss die Fläche unter den jeweiligen Chromatogramm-Peaks integriert werden. In Relation zur AUC einer Substanz, die in einer definierten Konzentration und Masse dem zu analysierenden Medium hinzugefügt wurde, kann die Konzentration und Masse der zu analysierenden Substanz selbst quantitativ errechnet werden. Diese Substanz mit definierter Konzentration und Masse wird im folgenden als Interner Standard bezeichnet.

2.1.3.4 Verwendete Geräte und Einstellungen

Verwendet wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Geräte mit den dazugehörigen Parametern:

Gaschromatograph mit automatischem Probengeber

Hewlett Packard, Böblingen:

Gaschromatograph HP 5890 Series II

Injektor Autosampler HP 6890 Series

Injektionsvolumen: 1 µl, injiziert nach 4maligem automatischen Spülen der Injektionsspritze

Injektorblocktemperatur: 275 °C

Vordruck: 8 PSI

Trägergas: Helium

Total flow: 7 ml/min, 1,1 min splitless

Gaschromatographiesäule

Restek, Bad Homburg:

Rtx 1701

Katalognummer 12023, Seriennummer 198582

Material: Crossbond 14% Cyanpropylphenyl mit 86% Dimethylpolysiloxan

Maximal zulässige Temperatur: 280 °C

Länge: 30 m

Durchmesser: 0,25 mm

Filmstärke: 0,25 µm

Massenspektrometer

Mass Selective Detector HP 5971 Series

Interface- Temperatur: 275 °C

Temperatur der Ionenquelle: 275 °C

Elektronenstoßionisierung mit 70 eV

Single Ion Acquisition Mode:

Gesamtdauer: 46, 45 min

Lösungsmittelverzögerung: 8 min

Berücksichtigung der jeweiligen Ionen für 100 msec

Gruppe I: Interner Standard:

Berücksichtigte Ionen: 85 und 140

Gruppe II: chiro- Inositol und myo- Inositol

Berücksichtigte Ionen: 115, 126, 168 und 217

Temperaturprogramm

Anfangstemperatur: 160 °C

Heizrate 1: + 2 °C pro min bis auf 230 °C

Heizrate 2: +60 °C pro min bis auf 275 °C

Ausheiztemperatur: 275 °C, konstant für 10 min

Zur Steuerung des halbautomatisierten Mess- Ablaufes und Erstellung des Chromatogrammes sowie zu dessen Auswertung wurde das Programm HP Chem Station, Serie G1034C, Revision C.03.00, verwendet.

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Vorbereitungen

2.2.1.1 Trennen von Plasma und korpuskulären Blutbestandteilen sowie Isolation der Erythrozyten

Zunächst wurden die Vollblutröhrchen mit der Standzentrifuge bei Raumtemperatur und 4000 U/min, entsprechend 3210 g, für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde abgenommen, in entsprechende Reagenzröhrchen gefüllt und mit einem passenden Deckel versehen bis zur weiteren Verarbeitung bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Der "buffy coat" wurde verworfen. Um die im Röhrchen verbliebenen Erythrozyten zu isolieren, wurden sie mit 3 ml physiologischer Natrium-Chlorid- Lösung aufgefüllt. Nach sorgfältigem und schonendem Mischen der beiden Phasen wurde es erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Isolationsvorgang wurde noch einmal wiederholt. Zur Analyse wurden 100 µl Erythrozytenisolat entnommen, der Rest bei einer Temperatur von -20°C gelagert

2.2.1.2 Analyse des Erythrozytenisolates

100 µl des Erythrozytenisolates wurden in ein Mikroliter- Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 100 µl physiologischer Natrium- Chlorid- Lösung versetzt. Nach sorgfältigem Mischen mit Hilfe des Rüttelgerätes wurden am Coulter® Stacker Splus die Zahl der Erythrozyten pro µl, der Hb- sowie der Hk- Wert

bestimmt. Die Bestimmung des Hämatokritwertes wurde zur Korrektur und besseren Vergleichbarkeit der Erythrozytenzahl pro μl durchgeführt und nach folgender Formel in die Berechnung mit einbezogen:

$$\text{AUC}_{\text{Inositol}}^* \cdot 100 / \text{Hk.}$$

2.2.1.3 Erstellen einer Trihexanollösung als Interne Standardlösung

Erforderlich für eine Interne Standardlösung ist, dass sie in Blut natürlicherweise nicht vorkommt, ausreichend haltbar und stabil ist und sich unter den gleichen Bedingungen wie die Inositole nachweisen lässt. Dies trifft auf Trihexanol zu, denn als dreiwertiger Alkohol verhält es sich chemisch und chromatographisch ähnlich wie die Inositolmoleküle. Es wurde eine methanolische Lösung von Trihexanol hergestellt, wobei 800 mg Trihexanol in 200 ml Methanol gelöst wurden. Aus dieser Stammlösung wurde eine methanolische Verdünnung mit einer Endkonzentration von 1 : 100 hergestellt. Diese wird im folgenden als Interne Standardlösung bezeichnet. Die Lösung wurde in einem Erlenmeyer- Kolben luftdicht verschlossen bei einer Temperatur von $+6^\circ\text{C}$ gelagert.

2.2.1.4 Herstellen einer Pyridin- Acetanhydrid- Lösung

Es wurde eine Lösung, bestehend aus Pyridin und Acetanhydrid, im Konzentrationsverhältnis 1 Teil Pyridin zu 2 Teilen Acetanhydrid in einem Kulturröhrchen hergestellt und zur Lagerung bei Raumtemperatur luftdicht durch einen geeigneten Deckel verschlossen.

Die Kombination von Acetanhydrid und Pyridin bot den Vorteil, dass bei der Veresterung – mit dem Ziel der Hitzestabilisierung- in einem basischen Milieu gearbeitet werden konnte. Die H^+ - Ionen der Inositole ließen sich in einem solchen Milieu leichter abspalten. Die Veresterung funktionierte daher

schneller und vollständiger. Bei der Umsetzung wurde als Nebenprodukt Essigsäure frei, die durch das basische Milieu gut abgepuffert werden konnte.

2.2.2 Aufarbeitung der Plasmaproben

Die bei – 20° C tiefgekühlten Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen und gründlichem Mischen (Vortex) wurde 1ml Plasma entnommen und in ein spitzes Zentrifugenglas gegeben. Das Plasma wurde mit 100 µl der Internen Standardlösung versetzt und sorgfältig gemischt. Unter Einsatz des Rüttelgerätes wurde 1 ml Isopropanol im Schuss beigegeben, um die noch in der Lösung vorhandenen Protein- Strukturen auszufällen. Nach sorgfältigem Mischen der Reagenzien wurde das Röhrchen unter den oben genannten Bedingungen in der Standzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Kulturröhrchen gegossen, der Bodensatz verworfen.

2.2.3 Aufarbeitung der Erythrozytenisolatproben

Die bei – 20° C tiefgekühlten Erythrozytenisolatproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen und gründlichem Homogenisieren mit dem Rüttelgerät wurde 1ml Erythrozytenisolat entnommen und in ein spitzes Zentrifugenglas gegeben. Das Isolat wurde mit 100 µl der Internen Standardlösung versetzt und sorgfältig gemischt. Unter Einsatz des Rüttelgerätes wurde 1 ml Isopropanol im Schuss beigegeben, um die noch in der Lösung vorhandenen Protein- Strukturen auszufällen. Um dieses Ausfällen noch zu unterstützen und dabei besonders die Membranstrukturen der Erythrozyten zu zerstören, wurde die Probe nach gründlichem Mischen mit dem Rüttelgerät einer 15 minütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Daraufhin wurde sie erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Kulturröhrchen gegossen, der Bodensatz verworfen.

2.2.4 Lyophilisation

Die jeweilige Probe wurde im Rotationsvakuumkonzentrator plaziert und für 6 h bei einem Temperaturgefälle zwischen Vakuumzentrifuge (+60 °C) und Kühlfalle (-80 °C) von 140 °C und einem Luftdruck von 15 mbar gefriergetrocknet.

2.2.5 Umsetzen und Derivatisieren

Die nun als körniger Bodensatz im Kulturröhrchen vorliegende Probe wurde mit 200 µl der Pyridin- Acetanhydrid- Lösung versetzt, mit einem geeigneten Deckel luftdicht verschlossen und für 60 min bei einer Temperatur von 90 °C im Heizblock inkubiert.

2.2.6 Vorbereitung für die Messung am Gaschromatographen

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Probe in ein Mikrozentrifugationsröhrchen pipettiert und in der Tischzentrifuge bei 15.000 U/min für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine mit passendem Einsatz versehene Injektionsflasche gegeben und mit einem entsprechenden Deckel verschlossen.

2.3 Messung am Gaschromatographen mit massenspezifischem Detektor

Den zu messenden Proben wurde je Lauf zur späteren eindeutigen Quantifizierung ein Set von Eichkurven (n=5) vorangestellt. Die gerätetechnischen Bedingungen sind zuvor bereits beschrieben worden.

2.4 Eichkurven

Zur Quantifizierung der in den Proben vorhandenen Konzentrationen an chiro- und myo- Inositol wurden Eichkurven erstellt. Dabei wurden aus einem Pool von n= 10 Proben 5 nach der Vorschrift aufgearbeitet und die in der Tabelle angegebenen Mengen an Reinsubstanz hinzugefügt. Die Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Substanzen ergeben sich aus der folgenden Tabelle.

Tabelle 2: Ausgangskonzentrationen der verwendeten Substanzen

| Ausgangskonzentrationen | Material |
|--------------------------------|-------------------|
| 20,27/100 | Myo- Inositol |
| 5,0/50 | Chiro- Inositol |
| 1,0/10 | Trihexanol (IST) |

In der folgenden Tabelle sind die endgültigen Konzentrationen der jeweiligen Substanz angegeben. Die Probe Nummer 1 versteht sich als Leerwert.

Tabelle 3: Konzentrationen der Eichreihe

| Probennummer | Interner Standard (μl) | Konzentrationen chiro- Inositol (μg / ml) | Konzentrationen myo- Inositol (μg / ml) |
|---------------------|---|--|---|
| 1 | 100 | 0 | 0 |
| 2 | 100 | 0,5 | 2,027 |
| 3 | 100 | 1 | 4,054 |
| 4 | 100 | 1,5 | 6,081 |
| 5 | 100 | 2 | 8,108 |

Anhand des Quotienten aus Peakfläche Inositol geteilt durch Peakfläche Interner Standard ließ sich nach Subtraktion des Leerwertes eine Korrelation

zwischen ansteigender Konzentration der Reinsubstanz und ansteigendem Anteil der Peakfläche des Inositols an der Peakfläche des Internen Standards berechnen und eine Regressionsgerade erzeugen.

2.5 Präzision in der Serie

Zur Bestimmung des Variationskoeffizienten wurde ein Pool aus $n=20$ Vollblutproben aus dem Routinebetrieb des Zentrallabors des UKT erzeugt. Nach der Trennung von Plasma und Erythrozytenisolat wurden je 10 Proben gemäß der Vorschrift aufgearbeitet.

2.6 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der t- Test verwendet.

2.7 Klinische Studie

Die mit EDTA beschichteten Vollblutröhrchen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. K. Rett, IV. Medizinische Klinik der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Sie enthalten Blut von erstgradig Verwandten an Diabetes Typ 2 erkrankter Patienten, die an der Tübinger Familien Früherkennungs-Studie (TüFF) teilgenommen haben. In diese Untersuchung wurden in den letzten Jahren normotensive Probanden mit zumindest einem an Diabetes Typ 2 erkrankten Elternteil eingebunden. Ausschlusskriterien waren hierbei ein bestehender Diabetes mellitus oder eine verminderte orale Glukosetoleranz nach den gültigen WHO- Kriterien sowie eine regelmäßige Einnahme von Medikamenten oder Hinweise auf andere Erkrankungen, die die Ergebnisse beeinflussen könnten. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenentwicklung

Zunächst wurde eine Reihe von Vorversuchen unternommen, um die Aufarbeitung und Messung der Proben im Sinne optimaler Analyseergebnisse zu verändern.

3.1.1 Probenaufarbeitung

3.1.1.1 Bestimmung der zur kompletten Proteindenaturierung erforderlichen Menge an Isopropanol

Hierzu wurde 1 ml Plasma aus einem Pool von n= 10 Proben mit 200 µl Isopropanol versetzt und unter Standardbedingungen zentrifugiert. Es erfolgte die weitere Zugabe von Portionen zu je 200 µl Isopropanol, bis sich keine weitere Ausfällung mehr zeigte. Es stellte sich heraus, dass die erforderliche Menge zur Deproteinisierung 1ml Isopropanol ist.

3.1.1.2 Vortrennung mittels Festphasenextraktion

Da für die Bestimmung der Inositole im Urin eine Vortrennung mittels Festphasenextraktion notwendig war, wurde dies auch für die Plasmaproben untersucht. Dazu wurde die Probe auf eine vorher konditionierte Multi- Mode-Säule gegeben. Es wurde ein Sog angelegt, und das Probenmaterial wurde mit Unterdruck durch einen im Boden der Säule befindlichen Filter geschickt. Optisch stellte sich die Probe nach dieser Behandlung als deutlich klarer dar.

Die anschließende Messung zeigte jedoch keine signifikante Entfernung von Störsubstanzen.

3.1.1.3 Verwenden von Triton

Die ersten Chromatogramme zeigten, dass das chiro- Inositol oft im Rauschen unterging und sich besonders bei den Erythrozytenisolat- Proben der quantitativen Bestimmung entzog. Unter der Vorstellung, die Inositole seien gebunden an die Membran der Erythrozyten, wurde zusätzlich zur Zerstörung der Membran durch Ultraschallbehandlung ausprobiert, ob Triton als Lösungsvermittler zwischen organischer Materie und wässriger Phase in der Lage ist, einen größeren Anteil an chiro- Inositol aus den Membranen herauszulösen. Also wurde eine 1%- ige Triton- NaCl 0,9%- Lösung hergestellt und den Proben hinzugegeben. Die anschließenden Messungen konnten diese Vermutung allerdings nicht bestätigen.

3.1.2 Derivatisierung

3.1.2.1 Trimethylsilyl (TMS)- Derivat

Unter Verwendung eines Pyridin- BSTFA- Gemisches erfolgt die Umsetzung der Inositole zu dem Hexa- Trimethylsilyl- Derivat. Bei der Analyse von verschiedenen Inositolen im menschlichen Urin konnte diese Methode erfolgreich durchgeführt werden (90). Bei der Analyse von Plasma- und Erythrozytenisolat- Proben zeigte sich jedoch in den durchgeführten Messungen, dass mit diesen Derivaten keine ausreichende Trennung erreicht werden konnte, sodass diese Art der Derivatisierung verlassen werden musste.

3.1.2.2 Acetat- Derivat

Unter Verwendung eines Pyridin- Acetanhydrid- Gemisches erfolgte die Umsetzung der Inositole zu dem Hexa- Acetat- Derivat. Die erhofften Ziele, Trennung von verschiedenen Inositolen und Störsubstanzen sowie eindeutige Darstellung und Wiederfindung von Inositol- Isomeren, ließen sich mit dieser Art der Derivatisierung zuverlässig erreichen.

3.1.3 Chromatographie

Teil der Methode zur Untersuchung der Inositole im Urin war die Verwendung der Chromatographiesäule Rtx 200 der Firma Restek, Bad Soden. Sie weist eine Länge von 60 m, einen Durchmesser von 0,25 mm und eine Filmstärke von 0,25 µm auf. Der Säulenfilm besteht aus Trifluoropropyl- methyl- polysiloxan. Diese Säule auf die Methode zur Untersuchung der Inositole im Erythrozytenisolat und Plasma zu übertragen, war jedoch nicht möglich, wie sich in den Analysen zeigte. Eine hinreichende Trennung der Iso- Inositole von in dem jeweiligen Medium vorhandenen Störsubstanzen war ebenso wenig möglich wie eine saubere Darstellung der Inositole selbst. Daher wurde diese Chromatographiesäule nicht verwendet. Anstatt dessen wurde eine Versuchsreihe mit der Säule Rtx 1701 der Firma Restek begonnen. Diese ist mit 30 m Länge deutlich kürzer und besteht aus einer Mischung von Cyanpropylphenol (14%) und Dimethylpolysiloxan (86%). Durch die veränderten Untersuchungsbedingungen war eine saubere Trennung der Inositol- Isomere von den Störsubstanzen und eine deutliche Darstellung der Inositole selbst erreichbar.

3.1.4 Verwenden unterschiedlicher Parameter zur Datenakquisition bei Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die anfänglichen Schwierigkeiten, die in mangelnder Trennung der Inositole von Störsubstanzen und unzureichender Darstellung im Chromatogramm bestanden, konnten durch eine feine Einstellung der Parameter zur Datenakquisition überwunden werden. Die hierzu dienlichen Parameter wie Temperaturprogramm, Trägergas, Vordruck und flow des Trägergases bei der Gaschromatographie sowie die zeitliche Berücksichtigung der jeweiligen Ionen in der Massenspektrometrie konnten derart variiert werden, dass die Anforderungen an Trennung und Wiederfindbarkeit der Analyten erfüllt werden konnten.

3.1.5 Identifikation und Quantifizierung

3.1.5.1 Identifikation der nachzuweisenden Substanzen

Aus einem aus dem Routinelabor des UKT stammenden Pool von Vollblutproben (n= 10) wurden 4 Proben nach der entwickelten Vorschrift aufgearbeitet. Eine Probe wurde unbehandelt gemessen, den anderen wurde vor der Messung eine bestimmte Menge der jeweiligen Reinsubstanz zugegeben. Diese als „spiking“ bezeichnete Zugabe diente dazu, den für die jeweilige Substanz vermuteten Peak im Chromatogramm deutlich hervorzuheben und damit eine eindeutige Zuordnung von Retentionszeit zu Substanz zu ermöglichen.

3.1.5.2 Definieren der Qualifierionen für den Internen Standard sowie für chiro- und myo- Inositol

Eine Plasma- Probe aus einem Pool von n= 10 Proben aus dem Routinebetrieb des Zentrallabors des UKT wurde nach der Vorschrift aufgearbeitet und mit den Reinsubstanzen chiro- und myo- Inositol versetzt. Es erfolgte eine Analyse mittels GC- MS im Full scan- modus. Das bedeutet, dass ein Chromatogramm erzeugt wurde, das das gesamte Spektrum der in der Probe enthaltenen Massen darstellte. Zur Identifizierung des Internen Standards diente ein Ion mit der Massenzahl 140, zur Quantifizierung wurde ein Ion mit der Massenzahl 85 verwendet. Entscheidend für den Nachweis des Internen Standards war neben der charakteristischen Retentionszeit, dass die AUC des Ions mit der Masse 85 prozentual wesentlich größer sein musste als die AUC des Ions mit der Massenzahl 140. Zum Nachweis der Inositolmoleküle wurden die Ionen mit den Massenzahlen 115, 126, 168 und 217 festgelegt. Auch hier war ein festes Muster der Massenverteilung zu fordern. Für das chiro- Inositol galt eine aufsteigende Reihenfolge: die AUC des Ions der Massenzahl 115 mußte prozentual am geringsten sein, gefolgt von der AUC des Ions mit der Massenzahl 126 und der AUC des Ions mit der Massenzahl 168. Bei der Massenverteilung des myo-Inositols ergab sich eine V- förmige Aufteilung. Die AUC des Ions mit der Massenzahl 115 überragte prozentual die AUC des Ions mit der Massenzahl 126, die AUC des Ions mit der Massenzahl 168 jedoch überragte prozentual auch diejenige des Ions mit der Massenzahl 115. Besonders das Ion mit der Massenzahl 217 stellte sich im weiteren Verlauf als für die Abgrenzung zwischen Inositol- und Störsubstanz- Peak als erforderlich heraus. Charakteristisch für die Inositolmoleküle war hierbei das Fehlen eines integrierbaren Peaks für das Ion mit der Massenzahl 217, während ein deutlicher Peak für andere Substanzen in direkter Nachbarschaft zum Inositol- Peak nachweisbar war. Diese Möglichkeit zur Abgrenzung von anderen Substanzen spiegelt sich auch im abgebildeten Spektrum der jeweiligen Substanz wider.

Charakteristisch ist dabei allenfalls ein Vorhandensein des Ions mit der Massenzahl 217 in sehr geringem Ausmaß.

Tabelle 4: Repräsentative Massenzahlen

| Substanz | Ion 1 | Ion 2 | Ion 3 | Ion 4 |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Interner Standard | 85 | 140 | | |
| chiro- Inositol | 115 | 126 | 168 | 217 |
| myo- Inositol | 115 | 126 | 168 | 217 |

3.1.5.3 Quantifizierung der Inositolmoleküle

Aus den Vorversuchen ergab sich ein charakteristisches Muster von Retentionszeiten für jede der nachzuweisenden Substanzen, das die folgenden Graphiken erläutern sollen.

Die Retentionszeit bei den Erythrozytenisolat- Proben für den Internen Standard betrug 12 min., für das chiro- Inositol 29,2 min. und für das myo- Inositol 32,8 min.. Bei den Plasma- Proben betrug die Retentionszeit für den Internen Standard 12 min., für das chiro- Inositol 30,8 min. und für das myo- Inositol 32,6 min..

Die folgenden Graphiken zeigen beispielhaft Chromatogramme von Erythrozytenisolat- und Plasma- Proben sowie die dazu gehörigen Spektren.

Ergebnisse

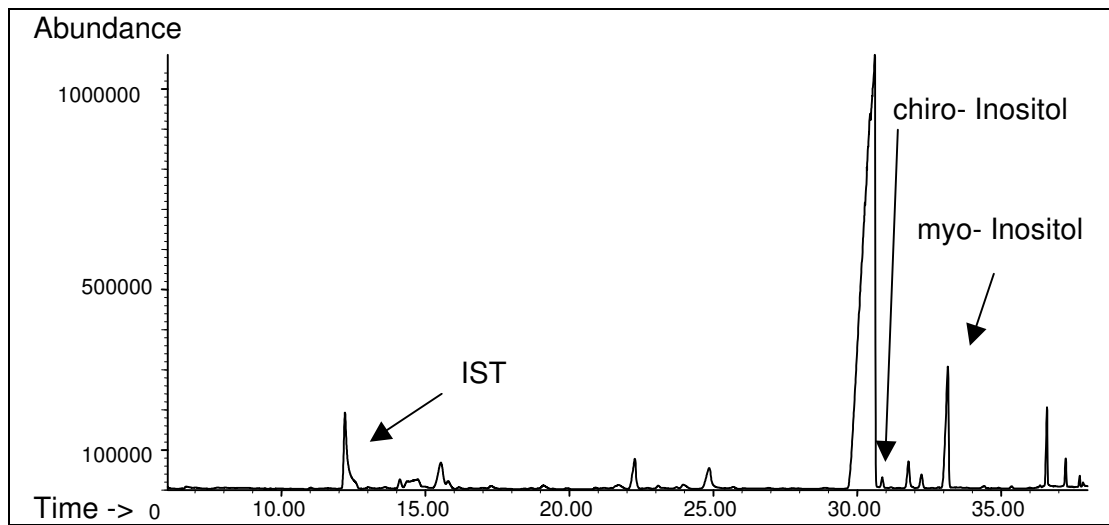


Abbildung 11: Beispielhaftes Chromatogramm einer Plasma- Probe

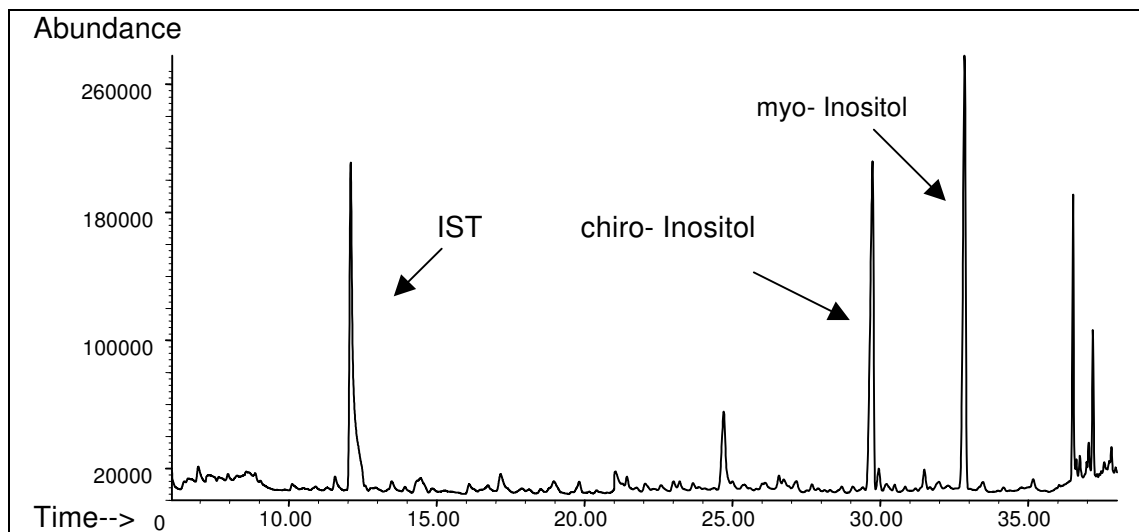


Abbildung 12: Beispielhaftes Chromatogramm einer Erythrozytenisolat- Probe

Ergebnisse

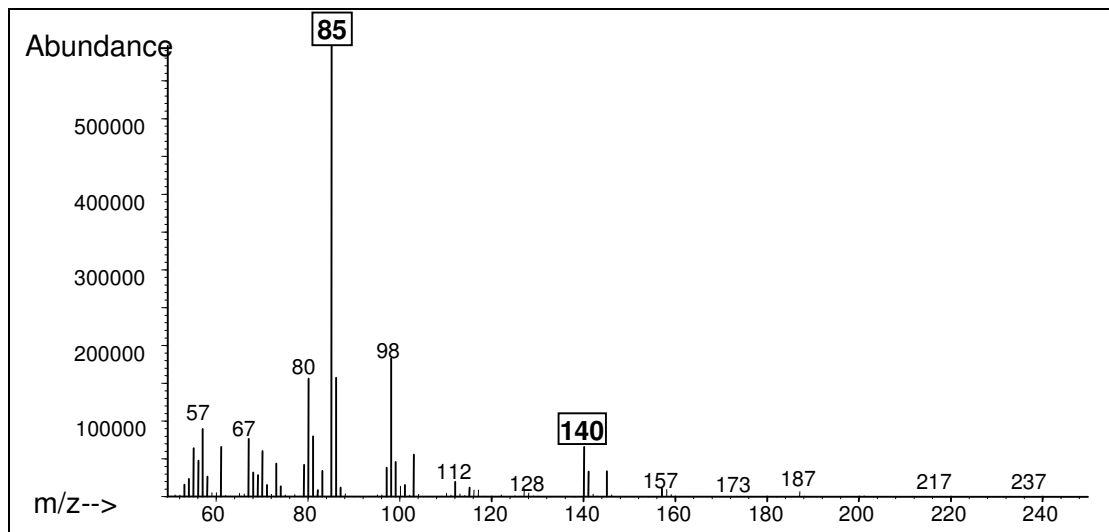


Abbildung 13 : Spektrum Interner Standard

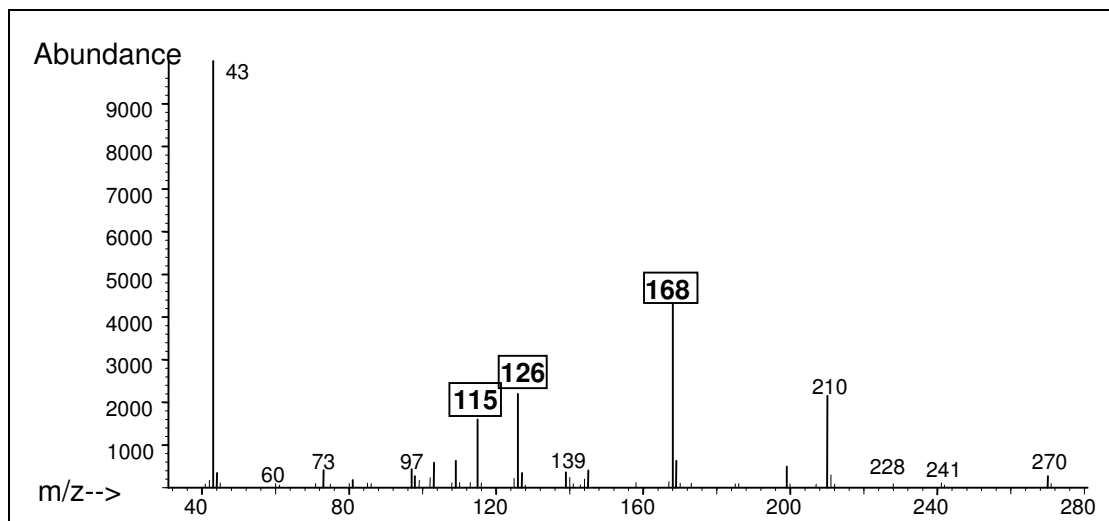


Abbildung 14 : Spektrum chiro- Inositol

Ergebnisse

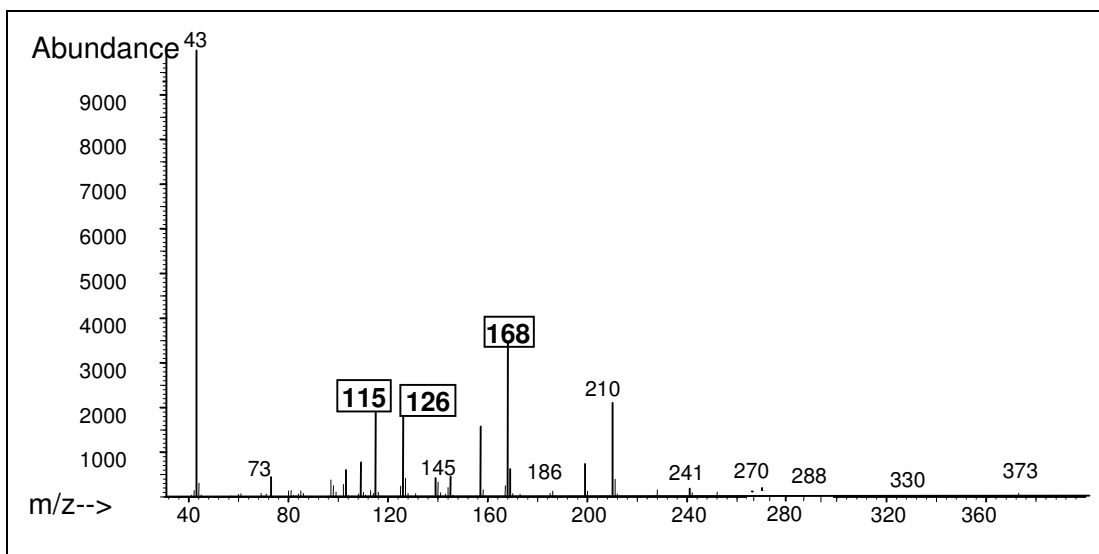


Abbildung 15 : Spektrum myo- Inositol

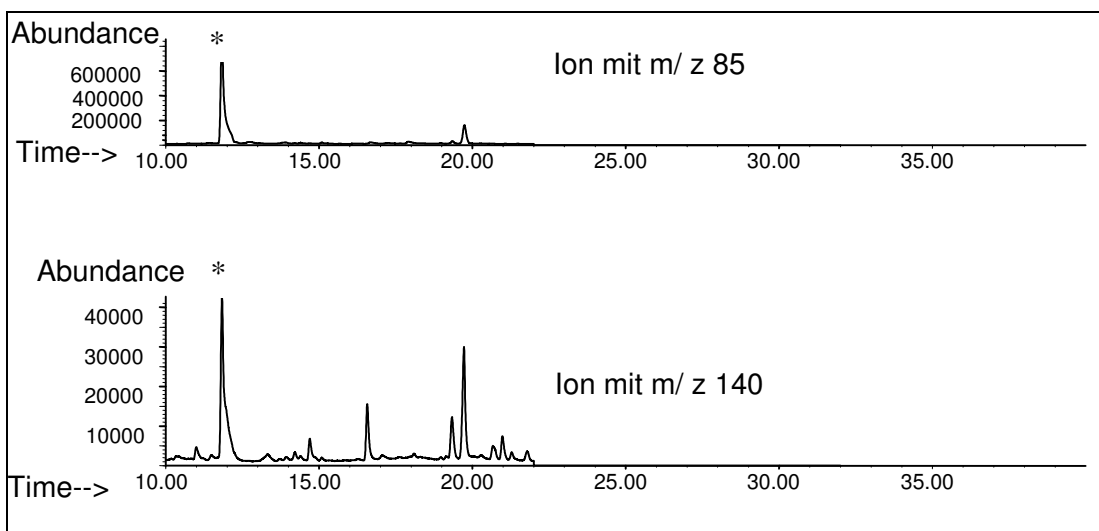


Abbildung 16 : Ionenchromatogramm Interner Standard mit charakteristischen Ionen im Plasma

Ergebnisse

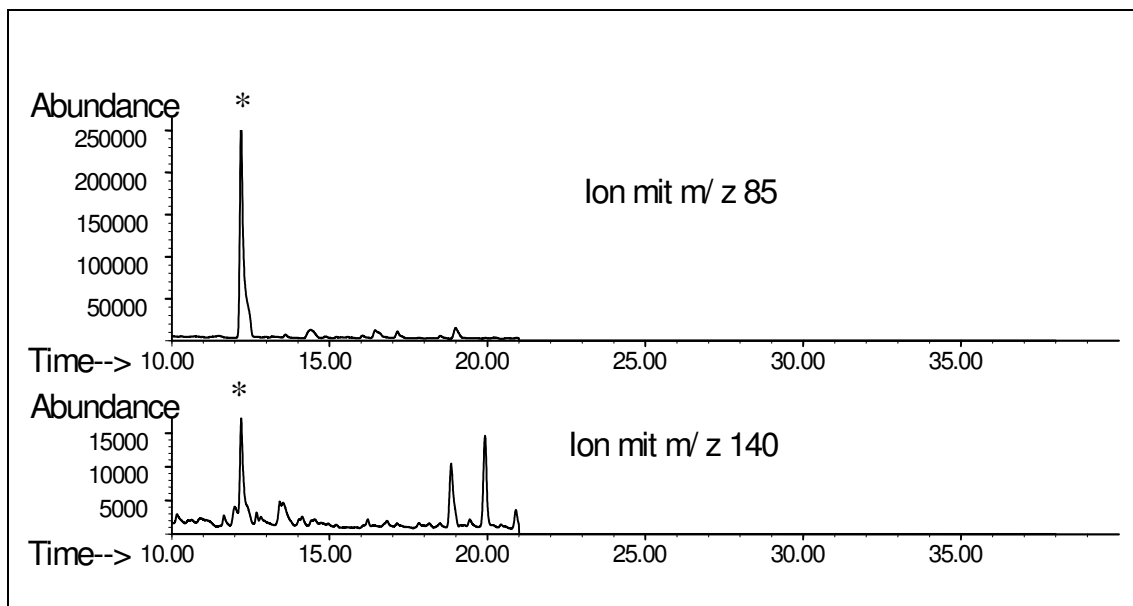


Abbildung 17 : Ionenchromatogramm Interner Standard mit charakteristischen Ionen im Erythrozytenisolat

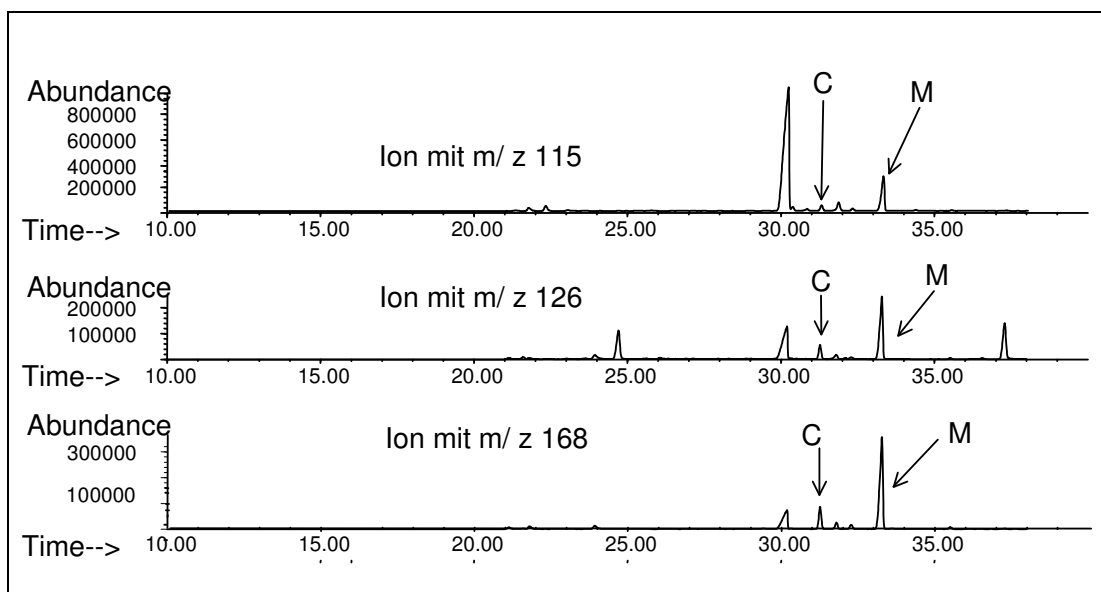


Abbildung 18 : Ionenchromatogramm chiro- und myo- Inositol mit charakteristischen Ionen im Plasma

Ergebnisse

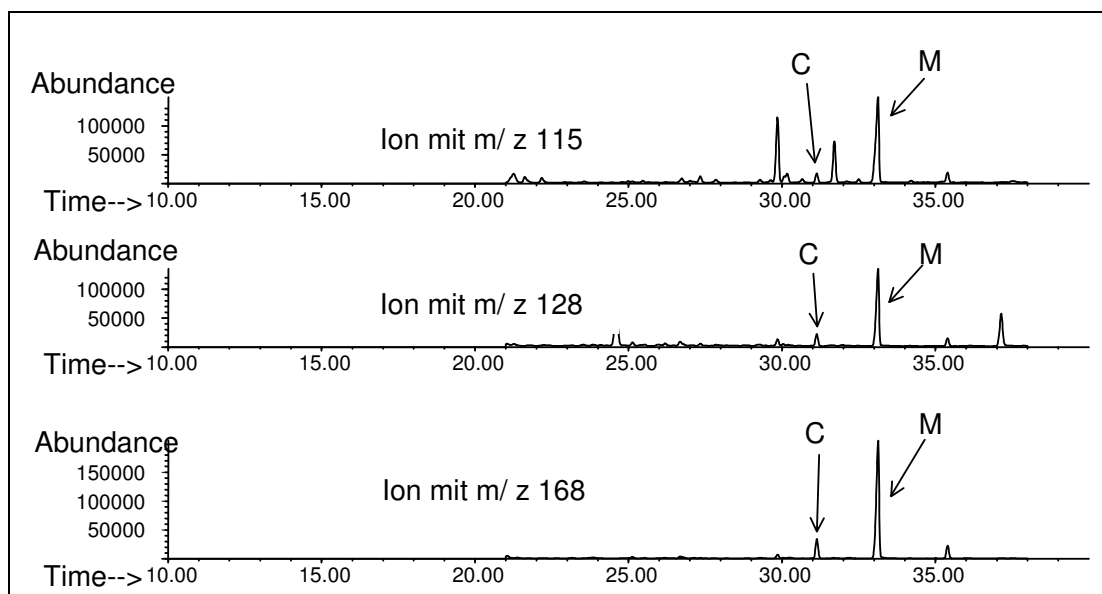


Abbildung 19 : Ionenchromatogramm chiro- und myo- Inositol mit charakteristischen Ionen im Erythrozytenisolat

Zur Quantifizierung der vorhandenen Substanzen wurde ein Quotient aus Peakfläche der Substanz zur Peakfläche der Internen Standardlösung mit bekannter Konzentration gebildet. Daraus ließ sich die Konzentration der Substanz selbst ableiten.

3.1.6 Eichkurven

Wie bereits beschrieben, ließ sich anhand des Quotienten aus Peakfläche Inositol geteilt durch Peakfläche Interner Standard nach Subtraktion des Leerwertes eine Korrelation zwischen ansteigender Konzentration der Reinsubstanz und ansteigendem Anteil der Peakfläche des Inositols an der Peakfläche des Internen Standards berechnen und eine Regressionsgerade nach der Formel $y = m \cdot x$ erzeugen.

3.1.6.1 chiro- Inositol

Die Berechnung der Eichkurven ergab eine Steigung von $m= 0,0926$ mit einem Korrelationsfaktor von $r= 0,9972$. Die Grafik zeigt die Beziehung zwischen der Konzentration des chiro- Inositols und dem Quotienten aus Peakfläche (AUC) chiro- Inositol und Peakfläche (AUC) Interner Standard.

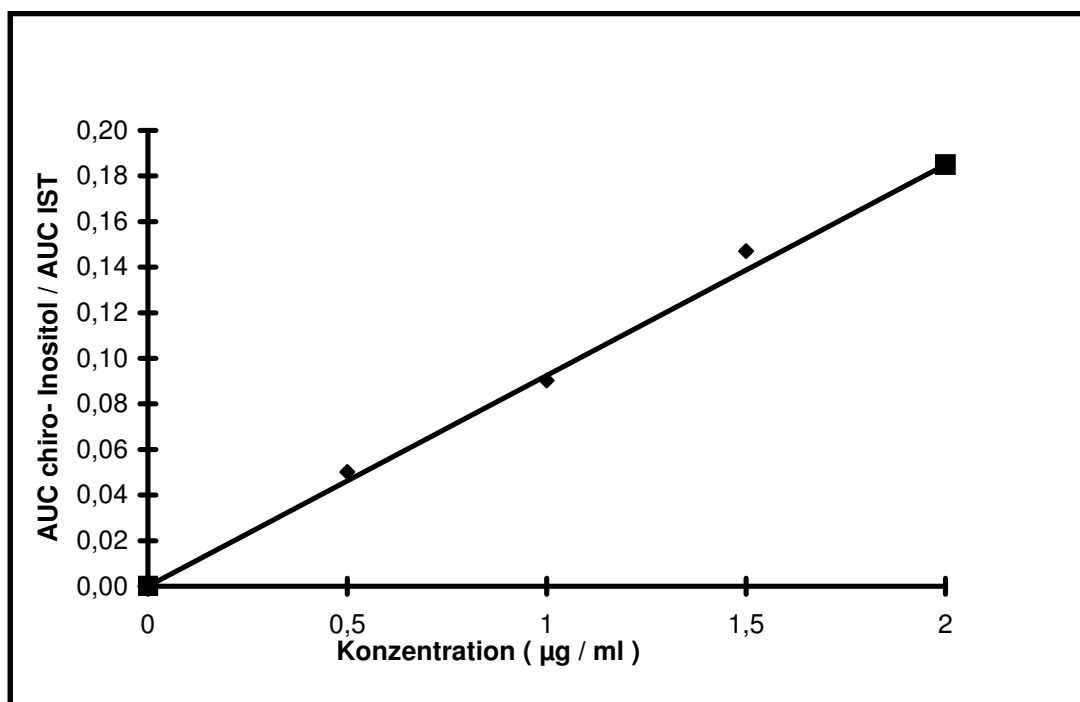


Abbildung 20: Eichgerade des chiro- Inositols

3.1.6.2 myo- Inositol

Die Berechnung der Eichkurven ergab eine Steigung von $m= 0,0588$ mit einem Korrelationsfaktor von $r= 0,9831$. Das folgende Diagramm zeigt die Beziehung zwischen der Konzentration des myo- Inositols und dem Quotienten aus der AUC des myo- Inositols und der AUC des Internen Standards.

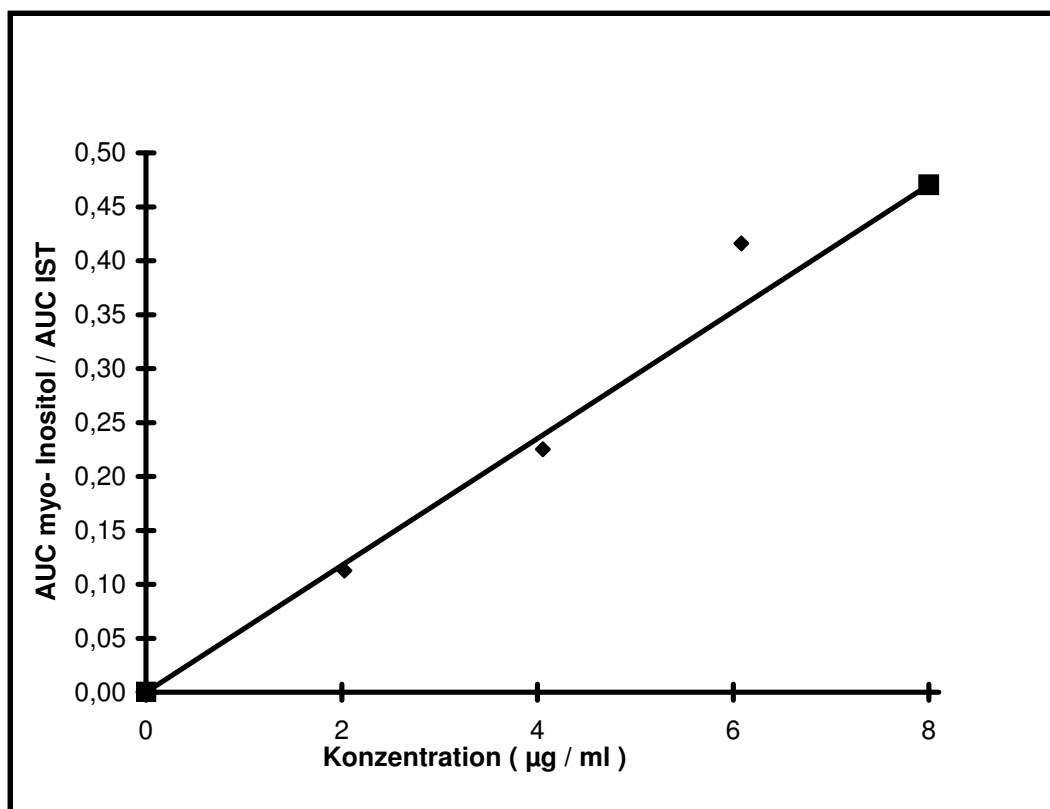


Abbildung 21: Eichgerade des myo- Inositols

3.1.7 Präzision in der Serie

Es ergab sich der folgende Variationskoeffizient innerhalb der einzelnen Proben aus dem oben beschriebenen Pool.

Bei der Auswertung der Plasmaproben wurde ein Variationskoeffizient für chiro- Inositol und myo- Inositol von jeweils 5 % gefunden bei einer mittleren Konzentration (\pm SEM) an chiro- Inositol von $6,79 \pm 0,35 \mu\text{g} / \text{ml}$ und an myo- Inositol von $215,81 \pm 10,88 \mu\text{g} / \text{ml}$. Die Analyse der Erythrozyten-isolatproben ergab nach Hk- Korrektur einen Variationskoeffizienten für chiro- Inositol und myo- Inositol von je 4 % bei einer mittleren Konzentration (\pm SEM) von $4,049 \pm 0,17 \mu\text{g} / \text{ml}$ an chiro- Inositol und von $249,10 \pm 11,14 \mu\text{g} / \text{ml}$ an myo- Inositol.

3.2 Klinische Studie

3.2.1 Konzentrationen an Inositol in Erythrozytenisolat und Plasma

Die statistische Auswertung der n=136 Erythrozytenproben und n= 133 Plasma- Proben erbrachte für die Erythrozytenproben eine mittlere Konzentration (\pm SEM) an chiro- Inositol von $0,131 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0,009$ und myo- Inositol von $8,489 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0,231$. Für das untersuchte Plasma wurde ein Konzentrations- Mittelwert (\pm SEM) an chiro- Inositol von $0,086 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0,011$ und an myo- Inositol von $6,386 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 0,169$ gefunden.

Vergleicht man in der vorliegenden Studie die Konzentrationen an chiro- Inositol in Erythrozytenisolat und Plasma, so zeigt sich eine signifikant höhere Konzentration im Erythrozytenisolat gegenüber dem Plasma ($p= 0,002$).

Auch die Konzentration an myo- Inositol im Erythrozytenisolat ist im Vergleich zur Plasma- Konzentration signifikant erhöht ($p < 0,001$).

Die folgenden Abbildungen zeigen die jeweiligen Mittelwerte mit der Standardabweichung.

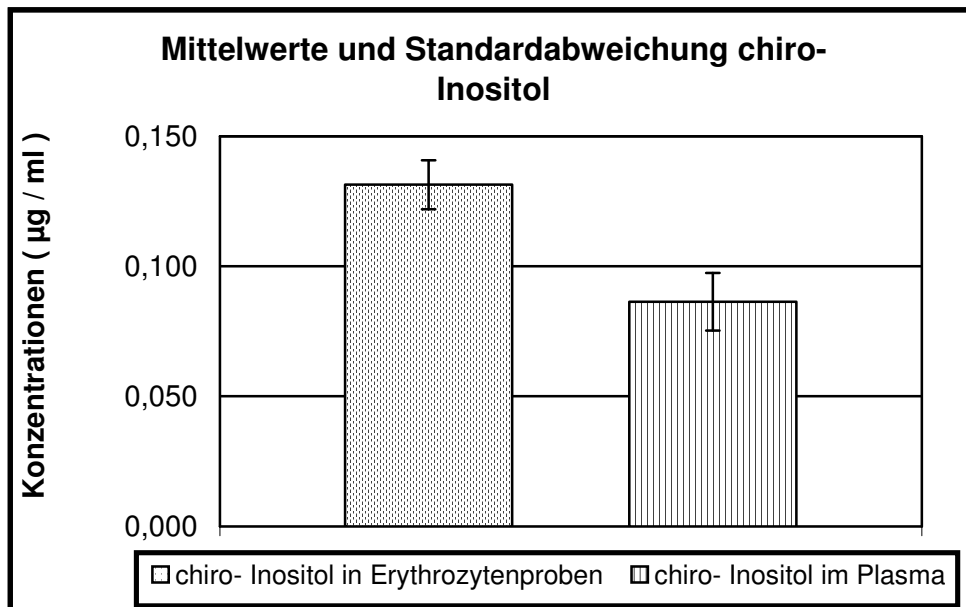


Abbildung 22: Vergleich der Konzentrationen von chiro- Inositol im Erythrozytenisolat und im Plasma

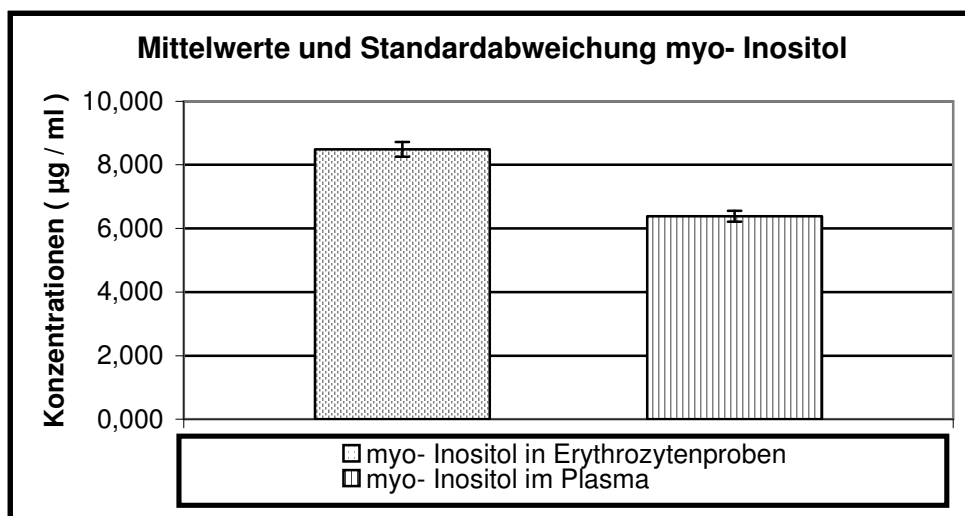


Abbildung 23: Vergleich der Konzentrationen von myo- Inositol im Erythrozytenisolat und im Plasma

3.2.2 Verhältnis myo- / chiro- Inositol

Bei der Auswertung der Verhältnisse von myo- zu chiro- Inositol in dem jeweiligen untersuchten Medium zeigte sich in den Erythrozytenproben ein Verhältnis von myo- zu chiro- Inositol von $106,417 \pm 6,348$ und im Plasma von $172,038 \pm 11,605$. Damit liegt ein signifikant niedrigeres myo- / chiro- Inositol- Verhältnis im Erythrozytenisolat als im Plasma vor ($p < 0,001$).

Die folgende Abbildung verdeutlicht den Sachverhalt.

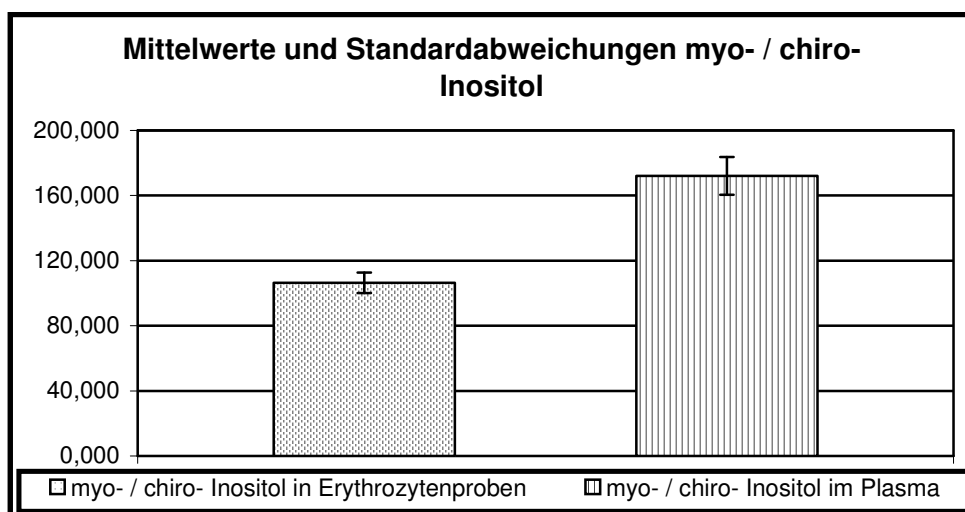


Abbildung 24: Verhältnisse zwischen myo- und chiro- Inositol im Erythrozytenisolat und Plasma

3.2.3 Streubreite

Die Ergebnisse der Messungen wiesen zum Teil eine erhebliche Streubreite auf. Für die Erythrozytenisolat- Proben wurden Werte von chiro- Inositol zwischen 0, 019 µg / ml und 0, 792 µg / ml sowie von myo- Inositol zwischen 2, 303 µg / ml und 24,596 µg / ml beobachtet. Bei den Plasma- Proben schwankten die Ergebnisse für chiro- Inositol zwischen 0, 037 µg / ml und 0, 622 µg / ml. Für myo- Inositol fanden sich Resultate zwischen 2, 729 µg / ml und 13, 835 µg / ml. Die nachfolgenden Tabellen stellen die Ergebnisse dar.

Tabelle 5: Streubreite der Plasma- Proben

| Plasma | chiro- Inositol | myo- Inositol |
|-------------------------|------------------------|----------------------|
| Maximalwert (µg / ml) | 0,622 | 13,835 |
| Minimalwert (µg / ml) | 0,037 | 2,729 |

Tabelle 6: Steubreite der Erythrozytenisolat- Proben

| Erythrozytenisolat | chiro- Inositol | myo- Inositol |
|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Maximalwert (µg / ml) | 0,792 | 24,596 |
| Minimalwert (µg / ml) | 0,019 | 2,303 |

4 Diskussion

4.1 Methodik

Seit den 70er Jahren ist bekannt, dass die Gaschromatographie mit anschließender Massenspektrometrie geeignet ist, Polyole qualitativ und quantitativ in unterschiedlichen Medien nachzuweisen. Verschiedene Arbeitsgruppen haben das belegen können (85-87). Hierbei wurden unterschiedliche Methoden bezüglich der Probenaufarbeitung, der Derivatisierung und der zur Messung verwendeten Geräte – insbesondere unterschiedliche Chromatographiesäulen – sowie deren Betriebs-Einstellungen verwendet (88, 89).

Als Ausgangspunkt zur Analyse der Inositol- Isomere stand eine innerhalb unserer Arbeitsgruppe von Frau Greuer- Walenta etablierte Methode zur Untersuchung von Polyolen in Urin- Proben zur Verfügung (90). Diese wurde in den Punkten Probenaufarbeitung, Derivatisierung und Chromatographie derart abgewandelt, dass die Analyten isoliert und möglichst viele der vorliegenden Störsubstanzen eliminiert werden konnten, um so eine eindeutige Zuordnung der Substanzen zu Retentionszeiten und eine ausreichende Trennung von den Störsubstanzen zu erreichen.

Weiteres fine tuning bei der Akquisition der Daten durch Veränderungen des Temperatur- Programmes und der betrachteten Ionen war erforderlich, um die postulierten Ansprüche an Wiederfindbarkeit, Eindeutigkeit und Trennung von Störsubstanzen erfüllen zu können.

4.2 Klinische Studie

Zunächst ist zu bemerken, dass bisher nur eine geringe Anzahl von Arbeiten vorliegt, die sich mit dem Inositol- Nachweis in Plasma beschäftigt haben. Die Datenlage ist also nicht besonders üppig. Bis dato sind von anderen Arbeitsgruppen keine Messungen von Inositolen in Erythrozytenisolat vorgenommen worden.

4.2.1 myo- und chiro- Inositol bei Diabetikern

Im Vergleich mit einer innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchung von myo- und chiro- Inositol bei Diabetikern (91) zeigten sich in der vorliegenden Arbeit deutlich niedrigere Konzentrationen sowohl an myo- als auch an chiro- Inositol als bei Diabetikern, unabhängig davon, ob eine Messung im Plasma oder im Erythrozytenisolat erfolgte.

Die Verhältnisse zwischen myo- und chiro- Inositol sind etwa gleich beim eigenen untersuchten Kollektiv wie bei den durch die eigene Arbeitsgruppe untersuchten Diabetikern (91).

4.2.2 chiro- Inositol

Bisher sind keine Untersuchungen von chiro- Inositol in isoliertem Erythrozytenisolat von anderen Arbeitsgruppen publiziert worden. Daher ist eine Diskussion mit fremden Ergebnissen nicht möglich, was sich in Zukunft jedoch ändern dürfte.

Auch zu chiro- Inositol- Analysen aus Plasma finden sich in der Literatur nur wenige Stellen zum Vergleich. In einer Studie von Ostlund et al. (92) werden chiro- Inositol- Konzentrationen im Plasma für gesunde Probanden, Typ 1- und Typ 2- Diabetiker ausgewiesen. Bei der Kontrollgruppe findet sich eine

mittlere Konzentration an chiro- Inositol von 131, 8 nM mit einer beachtlichen Streubreite von 2,6 bis 5625, entsprechend einer Konzentration von ca. 22 ng / ml. Diese liegt damit etwa 4,5 fach unterhalb der in der vorliegenden Studie gemessenen Werte.

4.2.3 myo- Inositol

Bei einer von Hacibekiroglu et al. durchgeführten Studie wurden die Konzentrationen an myo- Inositol in Plasma, Erythrozyten und Thrombozyten von Typ 1- (n= 24) und Typ 2- Diabetikern (n= 24) und einer gesunden Kontrollgruppe (n= 15) untersucht (93). Die Diabetiker wurden in zwei Gruppen unterteilt, eine mit und eine ohne Mikroangiopathie. Die Diabetiker wiesen in den Erythrozyten mit $23,3 \pm 19,8 \mu\text{mol} / \text{l}$ etwa doppelt so hohe Konzentrationen wie die Kontrollgruppe mit $12,2 \pm 5,2 \mu\text{mol} / \text{l}$ auf. Der Mittelwert für die Kontrolle deckt sich ungefähr mit dem in der vorliegenden Studie ($8,489 \pm 0,231 \mu\text{g} / \text{ml}$). Der Gehalt an myo- Inositol für Plasma lag bei den Diabetikern mit $46,5 \pm 39,8 \mu\text{mol} / \text{l}$ etwa doppelt so hoch wie bei der Kontrolle ($17,4 \mu\text{mol} / \text{l} \pm 3,7$) und ist damit signifikant höher. Dabei entspricht für die Kontrollgruppe die Konzentration etwa 1 / 2 der in der vorliegenden Arbeit gemessenen. Die Höhe der gemessenen Werte korreliert in dieser Untersuchung mit den Hb A1c- Werten sowie dem Vorhandensein von Komplikationen und der Dauer der Diabetes- Erkrankung.

In einer Untersuchung von Servo (94) wurde die Akkumulation von myo- Inositol in Plasma und Erythrozyten bei Diabetikern mit regelrechter Nierenfunktion (n=51), bei Patienten ohne Diabetes, aber mit Nierenversagen (n=16) und bei gesunden Probanden (n=37) gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Plasma- Konzentration von myo- Inositol bei den Diabetikern höher war als bei den Kontrollen, was – so wurde postuliert – von einer reduzierten Filtrationsleistung der Niere herrührt. Auch in den Erythrozyten der Diabetiker wurden erhöhte Konzentrationen an myo- Inositol gefunden. Erklärt wurde dieses als Resultat einer Retention von Inositol im

Erythrozyten unter einem transient vorherrschenden abnormalen Anstieg der Plasma- Konzentration von myo- Inositol.

Bei einer Studie von Popp- Snijders C et al. (95) ergab sich keine statistisch fassbare Differenz zwischen den Messergebnissen einer Diabetiker- Gruppe ($43,2 \pm 2,9$ nmol / ml) und einer Kontrollgruppe ($40,5 \pm 1,9$ nmol / ml).

4.2.4 Verhältnisse zwischen myo- und chiro- Inositol

Außerhalb unserer Arbeitsgruppe ist bisher das Verhältnis zwischen myo- und chiro- Inositol weder im Erythrozytenisolat noch im Plasma publiziert worden. Daher lassen sich auch hier keine Vergleiche anstellen.

Interessanterweise wurde aber beispielsweise von Lerner (96) das myo- / chiro- Inositol- Verhältnis im Urin als sensitiver Index für eine vorliegende Insulin- Resistenz postuliert. Ob dem Inositol- Verhältnis im Plasma oder Erythrozytenisolat eine ähnliche Funktion zugesprochen werden kann, wäre interessant, in nachfolgenden Untersuchungen zu überprüfen.

4.3 Bedeutung der Inositole als Mediatoren der Insulinwirkung bei Diabetes mellitus

Bezüglich der bei Diabetes mellitus Typ 2 vorliegenden Insulinresistenz der peripheren Gewebe ist die physiologische Bedeutung der Inositole bisher nur partiell aufgeklärt.

I. Asplin et al. (97) haben in einer Untersuchung von unterschiedlichen Geweben auf chiro- und myo- Inositol- haltige Insulin- Mediatoren gezeigt, dass es zu einer um bis zu 50 % verringerten biologischen Aktivität von chiro- Inositol- haltigen Mediatoren bei Typ 2- Diabetikern im Vergleich zu einer Kontroll- Population kommt. Untersucht wurden hierbei Proben aus Urin, Hämodialysat und Muskelgewebe.

Andere unter Hyperglykämie durchgeführte Versuche von mehreren Arbeitsgruppen konnten darstellen, dass es zu einer Depletion von myo-Inositol in verschiedenen durch diabetische Spätkomplikationen bedrohten Geweben wie peripheren Nerven (98, 99), Pigmentepithel der Retina (100), Retina allgemein (101) und glomerulären Mesangiumzellen der Niere (76) kommt.

Für die Insulin- Mediatoren, die myo- und chiro- Inositol beinhalten, konnte gezeigt werden, dass sie den Glukose- Einbau in Glykogen fördern und den Plasma- Spiegel von Glukose bei STZ- diabetischen Ratten senken (71). Der D- chiro- Inositol enthaltende Insulin- Mediator ist in der Lage, sowohl die Glycerol- 3- Phosphat- Acyltransferase in Adipocyten von Goto- Kakizaki (GK)- Ratten (73) als auch durch allosterische Aktivierung der Protein- Phosphatase 2 C die Glykogen- Synthase zu aktivieren (74).

Von entscheidender Bedeutung für das Verständnis der biologischen Effekte der Inositole war die Beobachtung, dass eine verminderte Ausscheidung von chiro- Inositol im Urin eine enge Korrelation mit dem Vorliegen einer – für den Diabetes mellitus Typ 2 typischen – Insulin- Resistenz der peripheren Gewebe aufweist (85). Diese Beobachtung konnte von mehreren Arbeiten in der Folge bestätigt werden (86, 87).

4.4 Streubreite

Die nicht geringe Streubreite der Messergebnisse kann möglicherweise durch folgende Mechanismen erklärt werden.

Bei den Teilnehmern der Studie ist nicht bekannt, was für Nahrungsmittel sie in welchem Umfang zu sich genommen haben vor der Blutentnahme. Nach einer Studie von Clements RS Jr et al. (45) gibt es erhebliche Unterschiede in der Inositol- Konzentration zwischen verschiedenen Nahrungsmitteln und ihren Darreichungsformen. Da die Teilnehmer keiner einheitlichen Diät unterworfen waren, lässt sich die exogene Inositol- Beladung nicht eindeutig definieren und rekonstruieren, was eine Streuung der Messergebnisse

Diskussion

hervorgerufen haben dürfte. Hinzu kommt eine weitere Unwägbarkeit, dadurch dass aufgrund einer interindividuell verschiedenen Bioverfügbarkeit der exogenen Inositole die Inositol- Blutspiegel schwanken.

Auch wie es um die Nierenfunktion der Probanden bestellt ist, ist nicht dokumentiert oder berücksichtigt worden. Laut einer Studie von Servo zeigt die Konzentration von myo- Inositol im Plasma eine deutliche Korrelation mit dem Plasma- Kreatinin- Wert, der als Basis- Parameter zur Beurteilung der Nierenfunktion herangezogen wird (102).

Auch die Tatsache, dass die Aufnahme von myo- Inositol in die Zelle durch Glukose kompetitiv gehemmt wird (76), könnte bei den unterschiedlich gemessenen Konzentrationen eine Rolle spielen. Es ist nämlich nicht bekannt, ob die Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern waren oder nicht.

Weiterhin ungeklärt ist, ob es nach der Blutentnahme durch die Lagerung der Proben zu ausschlaggebenden Änderungen des Inositol- Gehaltes in den Proben gekommen ist.

Diese Punkte könnten eventuell im Sinne einer Verringerung der Streubreite in folgenden Studien berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, eine gaschromatographische massen-spektrometrische Methode zur quantitativen Analyse der Isomere myo- und chiro- Inositol aus Erythrozytenisolat und Plasma zu entwickeln. Die Aufarbeitung der Proben und deren Derivatisierung wurden dergestalt optimiert, dass sie einfach, kostengünstig und in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden konnten. Die anschließende Messung mit GC / MS wurde so etabliert, dass eine gute Sensitivität und Spezifität erreicht werden konnten. Nach dem Aufarbeiten einer Probe gemäß der im Anhang I dargestellten Vorschrift wurde sie in ein GC- vial pipettiert und unter dem oben beschriebenen Temperaturprogramm und der Chromatographiesäule gemessen.

Zur Quantifizierung der Inositole dienten die Ionen mit den Massenzahlen 115, 126 und 168, die aufgrund der zuvor erhaltenen Spektren ausgewählt wurden. Zur Abgrenzung gegen Störsubstanzen wie z. B. Glukose und andere Zuckeralkohole und damit zur eindeutigen Identifikation der Inositole wurde das Ion mit der Massenzahl 217 herangezogen, das bei Glukose und anderen Zuckeralkoholen im Gegensatz zu den Inositolen einen deutlich höheren Peak aufwies. Bei der Auswertung der Erythrozytenproben war zu beachten, dass die errechneten AUC der Inositol- Isomere nach der oben genannten Formel Hämatokrit- korrigiert in die Berechnung mit einbezogen werden mussten. Zur Identifikation und Quantifizierung des Internen Standards wurden die Ionen mit den Massenzahlen 85 und 140 benutzt. Jeder Messreihe wurde ein Set von n= 5 Proben mit definiertem Gehalt an Inositol und IST vorangestellt, um eine Kalibrierung durchzuführen. Die Eichkurven zeigten gute Korrelationen für myo- Inositol von $r= 0,9831$ und für chiro- Inositol von $r= 0,9972$. Zur Validierung der Ergebnisse wurde eine Serie von je 10 Erythrozyten- und Plasma- Proben aus einem Pool von 10 beliebigen Vollblutproben aus der Routine des Zentrallabors des

Zusammenfassung

Universitätsklinikums Tübingen gemäß der Vorschrift aufgearbeitet. Für die Plasma- Proben stellte sich ein Variationskoeffizient für chiro- Inositol und myo- Inositol von 5 % dar. Die Analyse der Erythrozytenisolatproben ergab nach Hk- Korrektur einen Variationskoeffizienten für chiro- Inositol und myo- Inositol von 4 %.

Als klinische Anwendung erfolgte der Einsatz dieser Methode im Rahmen der TÜFF- Studie. Dabei wurden $n= 133$ Plasma- und $n= 136$ Erythrozytenisolat- Proben von erstgradig Verwandten von an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Personen auf ihren Gehalt an myo- und chiro- Inositol untersucht. Die durchschnittliche Konzentration an myo- Inositol im Erythrozytenisolat liegt mit $8,49 \pm 0,23 \mu\text{g} / \text{ml}$ signifikant höher als diejenige im Plasma mit $6,39 \pm 0,17 \mu\text{g} / \text{ml}$ ($p < 0,001$). Der mittlere Gehalt an chiro- Inositol im Erythrozytenisolat belief sich auf $0,131 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$. Im Plasma war die Konzentration an chiro- Inositol hoch signifikant geringer bei durchschnittlich $0,086 \pm 0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$ ($p= 0,002$). Die Auswertung der Verhältnisse von myo- zu chiro- Inositol hat ein im Erythrozytenisolat mit $106,4 \pm 6,4$ signifikant niedrigeres Verhältnis als das im Plasma mit $172,0 \pm 11,6$ gezeigt ($p < 0,001$). In der Literatur finden sich Untersuchungen mit diskrepanten Ergebnissen. Es wurden höhere, etwa gleich hohe und niedrigere Konzentrationen an Inositolen in Erythrozyten und Plasma gefunden. Untersuchungen von chiro- Inositol in isolierten Erythrozyten sind bisher von anderen Arbeitsgruppen nicht publiziert worden. Die Höhe der erhaltenen Werte korreliert in anderen Untersuchungen mit den Hb A1c- Werten sowie dem Vorhandensein von Komplikationen und der Dauer der Diabetes- Erkrankung. Auch ein Zusammenhang zwischen Inositol- Konzentration und Nierenfunktion lässt sich nachweisen. Ob man anhand des Inositol- Verhältnisses im Plasma oder Erythrozytenisolat eine Aussage über eine eventuell vorliegende Insulin- Resistenz treffen kann, wie von einer anderen Arbeitsgruppe für Urin- Proben postuliert, ist mit der vorliegenden Studie nicht zu beantworten. Die vorliegende Arbeit führt eine Reihe von vorherigen Arbeiten zur Untersuchung von Inositol in verschiedenen Medien fort. Dabei wurde zum ersten Mal eine Methode entwickelt, die gleichsam eine Untersuchung von

Zusammenfassung

myo- und chiro- Inositol in intrazellulären (Erythrozytenisolat) und extrazellulären (Plasma) Medien ermöglicht. Zusammen mit den bekannten Methoden lässt sich nun simultan eine umfassende Untersuchung verschiedener Inositol- Isomere in Urin, Plasma und Erythrozytenisolat bei unterschiedlichen Kollektiven realisieren.

Die genaue Funktion und der Metabolismus der Inositole ist weiterhin noch nicht vollständig geklärt. Die hier durchgeführte Arbeit bietet jedoch ein gutes Instrument zu deren qualitativen und quantitativen Analyse.

Literaturverzeichnis

1. **Deutsche Diabetes Gesellschaft** 2001 Leitlinien. www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de
2. **Michaelis D, Jutzi E** 1991 Epidemiologie des Diabetes mellitus in der Bevölkerung der ehemaligen DDR: Alters- und geschlechtsspezifische Inzidenz- und Prävalenzrends im Zeitraum von 1960-1987. *Z klin Med* 46:59-65
3. **Hauner L, von Ferber L, Köster I** 1992 Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. Sekundäranalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK- Versicherter der Stadt Dortmund. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 117:645-650
4. **Thefeld W** 2000 Prävalenz des Diabetes mellitus in der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands. *Gesundheitswesen* 61:85-89
5. **Harris MI** 1993 Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* 16:642-652
6. **Palitzsch K-D, Nusser J, Arndt H, et al.** 1999 Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt- eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diabetes und Stoffwechsel* 8:189-200
7. **Alberti KG, PZ Z** 1998 Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a who consultation. *Diabet Med* 15:539-553
8. **EDPG** 1999 A desktop guide Type 2 diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group 1999. *Diabet Med* 16:716-730
9. **Harris MI, Eastman RC, Cowie CC, Flegal KM, Eberhardt MS** 1997 Comparison of diabetes diagnostic categories in the U.S. population according to the 1997 American Diabetes Association and 1980- 1985 WHO diagnostic criteria. *Diabetes Care* 20:1859-1862
10. **DECODE sg** 1998 Will new diagnostic criteria for diabetes mellitus change phenotype of patients with diabetes? reanalysis of european epidemiological data. *British Medical Journal* 317:371-375
11. **Unwin W, Alberti KG, Bhopal R, Harland J, Watson W, White M** 1998 Comparison of the current WHO and new ADA criteria for the diagnosis of diabetes mellitus in three ethnic groups in the UK. *Diabet Med* 15:554-557
12. **Köhler C, Temelkova-Kurktschiev T, Schaper F, Fucker K, Hanefeld M** 1999 Prävalenz von neuentdecktem Typ 2 Diabetes, gestörter Glukosetoleranz und gestörter Nüchtern-glukose in einer Risikopopulation. Daten der RIAD- Studie nach Anwendung neuer Diagnosekriterien für Diabetes. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 124:1057-1061

13. **Michaelis D, Jutzi E, Vogt L** 1993 Epidemiology of insulin- treated diabetes mellitus in the East- German population: differences in long-term trends between incidence and prevalence rates. *Diabete Metab* 19:110-115
14. **Hoffmeister H, Mensink GB, Stolzenberg H, Hoeltz J, Kreuter H, Laaser U** 1996 Reduction of coronary heart disease risk factors in the German cardiovascular prevention study. *Prevention Medicine* 25:135-145
15. **Hauner H** 1998 Occurrence of diabetes mellitus in Germany. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 123:777-782
16. **Michaelis D, Jutzi E, Albrecht G** 1987 Prevalence and incidence trends of non- insulindependent diabetes mellitus (NIDDM) in the population of the GDR. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 47:301-310
17. **Neu A, Kehrner M, Hub R, Ranke MB** 1997 Incidence of IDDM in German children aged 0- 14 years. A 6- year population- based study (1987- 1993). *Diabetes Care* 20:530-553
18. **Neu A, Willasch A, Eehalt S, Kehrner M, Hub R, Ranke MB** 1999 Inzidenz bei deutschen und ausländischen Kindern in Baden- Württemberg. *Diabetes und Stoffwechsel* 1:65
19. **Rosenbauer J, Icks A, Giani G** 1998 Typ 1- Diabetes bei Kindern und Jugendlichen- prospektive Inzidenzstudie in der Region Düsseldorf. *Kinderärztliche Praxis* 1:15-25
20. **Rosenbauer J, Herzig P, von Kries R, Neu A, Giani G** 1999 Temporal, seasonal and geographical incidence patterns of type 1 diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia* 42:1055-1059
21. **CDC** 2003 National Diabetes Fact sheet. Center of Disease Control. www.cdc.com
22. **ECDCDM** 1997 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183- 1197
23. **Johnson DD, Palumbo PJ, Chu CP** 1980 Diabetic ketoacidosis on a community- based population. *Mayo Clin Proc* 55:83-88
24. **Martin S, Kolb H** 1998 Pathogenese und Immuntherapie des Diabetes mellitus Typ 1. *Diabetes und Stoffwechsel* 7:17-24
25. **Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA** 1981 Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20:87-93
26. **Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD** 1987 Concordance for type 2 (non- insulin- dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 30:763-768
27. **Cederholm J, Wibell L** 1985 Evaluation of insulin release and relative peripheral resistance with use of the oral glucose tolerance test: a study in subjects with normoglycaemia, glucose intolerance and non- insulin- dependent diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 45:741-751

28. **Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, et al.** 1989 Early metabolic defects in persons at increased risk for non- insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 321:337-343
29. **Lindstrom T, Arnqvist HJ, Ludvigsson J, von Schenck HH** 1992 C-peptide profiles in patients with non- insulin- dependent diabetes mellitus before and during insulin treatment. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126:477-483
30. **Martin BC, Warram JH, Krolewski AS, Bergman RN, Soeldner JS, Kahn CR** 1992 Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25- year follow- up study. *Lancet* 340:925-929
31. **Polonsky KS, Sturis J, Bell GI** 1996 Seminars in Medicine of the Beth Isreal Hospital, Boston. Non- insulin- dependent diabetes mellitus- a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance. *N Engl J Med* 334:777-783
32. **Lillioja S, Mott DM, Spraul M, et al.** 1993 Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non- insulin- dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329:1988-1992
33. **Rett K, Wicklmayr M, Standl E** 1994 The metabolic syndrome. Pathological causes, diagnosis, therapy. *Wien Klin Wochenschr* 106:750-757
34. **Zhang Y, Wat N, Stratton IM, et al.** 1996 UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS- 1 and beta 3- adrenergic receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study. *Diabetologia* 39:1505-1511
35. **Banerji MA, Lebovitz HE** 1989 Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM. *Diabetes* 38:784-792
36. **Carvey VJ, Walters EE, Colditz GA, et al.** 1997 Body fat distribution and risk of non- insulin- dependent diabetes mellitus in women. The Nurses` Health Study. *Am J Epidemiol* 145:614-619
37. **De Fronzo R, Ferrannini E** 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-194
38. **Kissebah A** 1982 Upper Body Obesity: Abnormalities in the metabolic profile and the androgenic / estrogenic balance. 359-374
39. **Morris RD, Rimm DL, Hartz AJ, Kalkhoff RK, Rimm AA** 1989 Obesity and heredity in the etiology of non- insulin- dependent diabetes mellitus in 32.662 adult white women. *Am J Epidemiol* 130:112-121
40. **Reaven G** 1993 Role of insulin resistance in human disease (syndrome x): an expanded definition. *Annu Rev Med* 44:121-131
41. **Standl E** 1995 Hyperinsulinaemia and atherosclerosis. *Clin Invest Med* 18:261-266
42. **Holub BJ** 1986 Metabolism and function of myo- inositol and inositol phospholipids. *Annu Rev Nutr* 6:563- 597

43. **Dawson RMC** 1961 The distribution of free mesoinositol in mammalian tissues, including some observations on the lactating rat. *Biochemical Journal* 78:606-610
44. **www.healthy.net** 2004
45. **Clements RS Jr, Darnell B** 1980 Myo- inositol content of common foods: development of a high- myo- inositol diet. *Am J Clin Nutr* 33:1954- 1967
46. **Russo LM, Maranco CW, Hagee MM, et al.** 1995 Sodium-independent carrier- mediated inositol transport in cultured renal epithelial (LLC- PK 1) cells. *Biochem Biophys Acta* 1236:15- 22
47. **Sasaki T, Ogihara- Umeda I, Kojima S, Nishigoro H** 1991 Sequential enzymatic synthesis and biodistribution of radiolabelled inositol. *Appl Radiat Isot* 42:97- 101
48. **Prpic V, Blackmore PF, Exton JH** 1982 Myo- inositol uptake and metabolism in isolated rat liver cells. *J Biol Chem* 257:11315- 11322
49. **Spector R** 1988 Myo- inositol transport through the blood- brain barrier. *Neurochem Res* 13:785- 787
50. **Ostlund RE jr, Seemayer R, Gupta S, Kimmel R, Ostlund EL, Sherman WR** 1996 A stereospecific myo- inositol / D- chiro- inositol transport in Hep G 2 liver cells. Identification with [3- 3 H] inositol. *J Biol Chem* 271:1073- 1078
51. **Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM** 1993 *Principles of Biochemistry*, 2 ed, Palgrave Macmillan Verlag, New York
52. **Koolman J, Röhm KH** 1994 *Taschenatlas der Biochemie*. Thieme Verlag, New York
53. **Clements RS Jr, Diethelm AG** 1979 The metabolism of myo- inositol by the human kidney. *J Lab Clin Med* 93:210- 219
54. **Howard CF Jr, Anderson L** 1967 Metabolism of myo- inositol in animals. II. Complete catabolism of myo- inositol- 14 C by rat kidney slices. *Arch Biochem Biophys* 118:332- 339
55. **Löffler G, Petrides PE** 1997 *Biochemie und Pathobiochemie*, 5 ed. Springer- Verlag, Berlin
56. **Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR** 1982 Insulin stimulates the phosphorylation of the 95.000- dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185- 187
57. **Chou CK, Dull TJ, Rusell DS** 1987 Human insulin receptors mutated at the ATP- bindung sitelack protein kinase activity and fail to mediate postreceptor effects of insulin. *J Biol Chem* 262:1842- 1847
58. **Saltiel AR, Cuatrecasas P** 1986 Insulin stimulates the generation from hepatic plasma membranes of modulators derived from an inositol glycolipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5793- 5797
59. **Larner J, Cheng K, Schwartz C** 1982 A proteolytic mechanism for the action of insulin via oligopeptide mediator formation. *Fed Proc* 41:2724- 2729
60. **Low MG, Saltiel AR** 1988 Structural and functional roles of glycosyl- phosphatidylinositol in membranes. *Science* 239:268- 275

61. **Mato JM, Kelly KL, Abler A** 1987 Partial structure of an insulin-sensitive glycopospholipid. *Biochem Biophys Res Commun* 146:764-770
62. **Alemay S, Mato JM, Stralfors P** 1987 Phospho- dephospho- control of insulin is mimicked by a phospho- oligosaccharide in adipocytes. *Nature* 330:77- 79
63. **Futerman AH, Low MG, Ackermann KE** 1985 Identification of covalently bound inositol in the hydrophobic membrane- anchoring domain of torpedo acetylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 129:312- 317
64. **Low MG, Futerman AH, Ackermann KE** 1987 Removal of covalently bound inositol from Torpedo acetylcholinesterase and mammalian alkaline phosphatases by deamination with nitrous acid: Evidence for a common membrane- anchoring structure. *Biochem J* 241:615- 619
65. **Larner J, Huang LC, Schwartz CRW** 1988 Rat liver insulin mediator which stimulates pyruvate dehydrogenase phosphatase contains galactosamine and D- chiro- inositol. *Biochem Biophys Res Commun* 151:1416- 1426
66. **Larner J, Huang LC, Tang G** 1988 Insulin mediators: Structure and formation. 1988 Cold Spring Harb Symp Quant Biol 53:965-971
67. **Larner J, Galasko G, Cheng K** 1979 Generation by insulin of a chemical mediator that controls protein phosphorylation and dephosphorylation. *Science* 206:1408- 1410
68. **Jarett L, Seals JR** 1979 Pyruvate dehydrogenase activation in adipocyte mitochondria by an insulin- generated mediator from muscle. *Science* 206:1407- 1408
69. **Larner J, Huang LC, Suzuki S** 1989 Insulin mediators and the control of pyruvate dehydrogenase complex. *Ann NY Acad Sci* 573:297- 305
70. **Saltiel AR** 1987 Insulin generates an enzyme modulator from hepatic plasma membranes: Regulation of adenosine 3',5'- monophosphate phosphodiesterase, pyruvate dehydrogenase and adenylatcyclase. *Endocrinology* 120:967- 972
71. **Huang LC, Fonteles MC, Houston DB** 1993 Chiroinositol deficiency and insulin resistance. III. Acute glycogenic and hypoglycemic effects of two inositol phosphoglycan insulin mediators in normal and streptozotocin- diabetic rats in vivo. *Endocrinology* 132:652- 657
72. **Ortmeyer HK** 1996 Dietary myoinositol results in lower urine glucose and in lower postprandial plasma glucose in obese insulin resistant rhesus monkeys. *Obes Res* 4:569- 575
73. **Farese RV, Standaert ML, Yamada K** 1994 Insulin- induced activation of glycerol- 3- phosphate acyltransferase by a chiro- inositol- containing insulin mediator is defective in adipocytes of insulin- resistant, type II diabetic, Goto- Kakizaki rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 91

74. **Abe S, Huang LC, Larner J** 1996 Dephosphorylation of PDH by phosphoprotein phosphatases and its allosteric regulation by inositol glycans. In: Patel M, Roche T, Harris R (eds) Alpha- keto acid dehydrogenase complexes. Bernhauser Verlag A.G., Boston
75. **Ortmeyer HK, Larner J, Hansen BC** 1995 Effects of D- chiroinositol added to a meal on plasma glucose and insulin in hyperinsulinemic rhesus monkeys. *Obes Res* 3:605- 608
76. **Haneda M, Kikkawa R, Arimura T, et al.** 1990 Glucose inhibits myo- inositol uptake and reduces myo- inositol conten in cultured rat glomerular mesangial cells. *Metabolism* 39:40- 45
77. **Cohen RA, MacGregor LC, Spokes KC** 1990 Effect of myo- inositol on renal Na-K-ATPase in experimental diabetes. *Metabolism* 39:1026- 1032
78. **Kim J, Kyriazi H, Greene DA** 1991 Normalization of Na-K-ATPase activity in isolated membrane fraction from sciatic nerves of streptozocin- induce diabetic rats by dietary myo- inositol supplementation in vivo or protein kinase C agonists in vitro. *Diabetes* 40:558- 567
79. **Colodny L, Hoffman RL** 1998 Inositol? Clinical applications for exogeneous use. *Altern Med Rev* 3:432- 447
80. **Levine J** 1997 Controlled trials of inositol in psychiatry. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:147- 155
81. **Vucenik I, Podczasy JJ** 1999 Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP 6). *Anticancer Res* 19:3689- 3693
82. **Lord JM, Flight IH, Norman JR** 2003 Insulin- sensitizing drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D- chiro- inositol) for polycystic ovary syndrom. *Cochrane Database Syst Rev* 3
83. **Laboureau- Soares Barbosa S, Rodien P, Rohmer V** 2002 Polycystic ovary syndrome: treatment with insulin- sensitizing agents. *Ann Endocrinol* 63:31- 35
84. **Bloomgarden ZT, Futterweit W, Poretsky L** 2001 Use of insulin- sensitizing agents in patients with polycystic ovary syndrome. *Endocr Pract* 7:279- 286
85. **Kennington AS, Hill CR, Craig J, et al.** 1990 Low urinary chiro- inositol excretion in non- insulin- dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 323:373- 378
86. **Suzuki S, Kawasaki H, Satoh Y, et al.** 1994 Urinary chiro- inositol is an index marker of insulin sensitivity in Japanese type II diabetes. *Diabetes Care* 17:1465- 1468
87. **Ortmeyer HK, Bodkin NL, Lilley K, Larner J, Hansen BC** 1993 Chrioinositol deficiency and insulin resistance. I. Urinary excretion rate of chiroinositol is directly associated with insulin resistance in spontaneously diabetic rhesus monkeys. *Endocrinology* 132:640- 645

88. **Andersen JR, Larsen E, Harbo H, Bertelsen B, Christensen JE, Gregersen G** 1982 Gas chromatographic mass spectrometric determination of myo- inositol in humans utilizing a deuterated internal standard. *Biomed Mass Spectrom.* 9:135-140
89. **Shen SC, Zhang XH** 2000 Determination of inositol by chromatography. *Se Pu* 18:265-266
90. **Greuer-Walenta BKE** 2002 Quantifizierung von myo- und chiro-Inositol im Urin von Typ 2 Diabetikern und Kontrollpersonen Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Innere Medizin IV. Medizinische Fakultät der Eberhard- Karls- Universität, Tübingen
91. **Pflumm JE** 2003 Identifizierung und Quantifizierung der Inositole Myo- und Chiro- Inositol in Plasma und Erythrozyten von Typ II Diabetikern und einem Probanden- Kollektiv Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik, Abteilung Inneren Medizin IV. Eberhard- Karls- Universität, Tübingen
92. **Ostlund EL Jr, McGill JB, Herskowitz I, Kipnis DM, Santiago JV, Sherman WR** 1993 D- chiro- inositol metabolism in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9988- 9992
93. **Hacibekiroglu M, Akcay T** 1994 The role of plasma, erythrocyte and platelet myo- inositol levels in the development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Res* 25:173- 179
94. **Servo C** 1977 Accumulation of myoinositol in plasma and red cells of diabetic patients. *Acta Med Scand* 201:59- 62
95. **Popp- Snijders C, Lomecky- Janousek MZ, Schouten JA, vander Veen EA** 1984 myo- Inositol and sorbitol in erythrocytes from diabetic patients before and after sorbinil treatment. *Diabetologia* 27:514- 516
96. **Larner J, Craig JW** 1996 Urinary myo- inositol- to- chiro- inositol ratios and insulin resistance. *Diabetes Care* 19:76- 78
97. **Asplin I, Galasko G, Larner J** 1993 chiro- Inositol deficiency and insulin resistance: A comparison of the chiro- inositol- and the myo- inositol- containing insulin mediators isolated from urine, hemodialysate, and muscle of control and type II diabetic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5924- 5928
98. **Greene DA, Jesus PVD, Winegrad AI** 1975 Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J Clin Invest* 55:1326- 1336
99. **Mayhew JA, Gillon KRW, Hawrhorne JN** 1983 free and lipid inositol, sorbitol and sugars in sciatic nerve obtained post- mortem from diabetic patients and control subjects. *Diabetologia* 24:13- 15
100. **Del Monte MA, Rabbani R, Diaz TC, et al.** 1991 Sorbitol, myo- inositol, and rod outer segment phagocytosis in cultured hRPE cells exposed to glucose. In vitro model of myo- inositol depletion hypothesis of diabetic complications. *Diabetes* 40:1335- 1345
101. **MacGregor LC, Rosecan LR, Laties AM, Matschinsky FM** 1986 Altered retinal metabolism in diabetes. I. Microanalysis of lipid, glucoes, sorbitol, and myo- inositol in the choroid and in the individual layers of the rabbit retina. *J Biol Chem* 261:4046- 4051

102. **Servo C, Pitkanen E** 1975 Variation in polyol levels in cerebrospinal fluid and serum in diabetic patients. *Diabetologia* 11:575- 580

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| °C: | Grad Celsius |
| µl: | Mikroliter |
| ATP: | Adenosintriphosphat |
| AUC: | Area Under the Curve |
| bzw.: | beziehungsweise |
| Ca ²⁺ : | Calcium |
| cAMP: | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CDP: | Cytidindiphosphat |
| CMP: | Cytidinmonophosphat |
| CO ₂ : | Kohlenstoffdioxid |
| DNA: | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA: | Äthylendiamintetraessigsäure |
| et al.: | et alii |
| eV: | Elektronenvolt |
| GC: | Gaschromatographie |
| H ⁺ : | Wasserstoff |
| H ₂ O: | Wasser |
| Hb: | Hämoglobin |
| HbA1c: | glykosylierte Hämoglobinfraktion |
| Hk: | Hämatokrit |
| IST: | Interner Standard |
| l: | Liter |
| m / z: | Masse pro Ladung |
| m: | Meter |
| M: | Mol |
| m ³ : | Kubikmeter |
| mbar: | Millibar |
| mg: | Milligramm |
| min: | Minute |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ml: | Milliliter |
| mm: | Millimeter |
| MODY: | Maturity Onset Diabetes in the Young |
| MS: | Massenspektrometrie |
| Msec: | Millisekunde |
| n: | Anzahl |
| Na ⁺ -/K ⁺ -ATPase: | Natrium- / Kalium- Adenosintriphosphatase |
| Na ⁺ : | Natrium |
| NaCl: | Natriumchlorid |
| NAD: | Nicotinamidadenindinucleotid |
| nM / ng: | Nanomol pro Nanogramm |
| P: | Phosphat |
| p: | Signifikanzkoeffizient |
| pH : | pondus Hydrogenii |
| PP: | Polypropylen |
| r: | Korrelationskoeffizient |
| STZ: | Streptozotocin |
| t: | Zeit |
| t _R : | Retentionszeit |
| TüFF: | Tübinger Familien Früherkennung |
| U / min: | Umdrehungen pro Minute |
| UKT: | Universitätsklinikum Tübingen |
| V: | Volt |

Anhang I: Aufarbeitungsvorschrift

Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurde die Proben zentrifugiert, das Plasma abgenommen und der „buffy coat“ verworfen. Die verbleibenden Erythrozyten wurden zweifach mit 0,9%iger NaCl- Lösung gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Erythrozyten 1:1 mit 0,9%iger NaCl- Lösung verdünnt. Nachfolgend wurden Erythrozytenzahl, Hämoglobin und Hämatokrit bestimmt. Je 1 ml des zu analysierenden Mediums wurde mit 100 µl Interner Standardlösung versetzt. Zur Deproteinisierung wurde 1 ml Isopropanol im Schuss hinzugefügt. Die Erythrozytenisolat- Proben wurden für 15 min einer Ultraschallbehandlung unterzogen und danach erneut zentrifugiert. Bei den Plasma- Proben kam man ohne Ultraschall- Behandlung aus, eine Zentrifugation war jedoch auch hier erforderlich. Der Überstand wurde aufgefangen und für sechs Stunden lyophilisiert. Zur Derivatisierung wurden die Proben mit 200 µl Pyridin- / Acetanhydrid- Lösung versetzt und für eine Stunde inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde eine erneute Zentrifugation durchgeführt, bevor die Proben in GC- vials pipettiert und unter dem oben beschriebenen Temperaturprogramm und mit der Chromatographiesäule Restek Rtx 1701 der Messung zugeführt.

Anhang II: Ergebnisse

Erythrozytenisolat- Proben

Tabelle 7: Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis myo-/ chiro- Inositol |
|--------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 86 | 0,079 | 8,595 | 109,099 |
| 104 | 0,106 | 9,777 | 92,607 |
| 178 | 0,174 | 6,920 | 39,715 |
| 179 | 0,219 | 7,686 | 35,119 |
| 340 | 0,103 | 9,873 | 96,296 |
| 341 | 0,057 | 9,599 | 167,471 |
| 342 | 0,086 | 9,620 | 111,276 |
| 343 | 0,064 | 8,475 | 132,262 |
| 344 | 0,165 | 9,412 | 56,889 |
| 345 | 0,350 | 8,218 | 23,498 |
| 346 | 0,052 | 8,016 | 153,592 |
| 347 | 0,110 | 9,552 | 87,180 |
| 348 | 0,123 | 6,731 | 54,575 |
| 349 | 0,202 | 8,423 | 41,725 |
| 350 | 0,047 | 7,424 | 159,637 |
| 351 | 0,048 | 9,306 | 194,315 |
| 353 | 0,082 | 6,350 | 77,303 |
| 355 | 0,037 | 5,525 | 151,285 |
| 356 | 0,058 | 5,670 | 98,095 |
| 361 | 0,417 | 7,706 | 18,460 |
| 362 | 0,064 | 6,495 | 101,675 |
| 363 | 0,262 | 9,293 | 35,415 |
| 364 | 0,048 | 8,131 | 170,964 |
| 365 | 0,031 | 8,081 | 257,376 |
| 366 | 0,033 | 7,325 | 223,706 |
| 367 | 0,175 | 7,601 | 43,419 |
| 368 | 0,048 | 7,462 | 155,090 |

Anhang

Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis Myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 369 | 0,144 | 6,485 | 45,103 |
| 370 | 0,111 | 7,051 | 63,350 |
| 371 | 0,350 | 7,423 | 21,226 |
| 374 | 0,235 | 6,354 | 27,016 |
| 375 | 0,129 | 7,353 | 56,839 |
| 376 | 0,052 | 3,655 | 70,576 |
| 379 | 0,205 | 4,183 | 20,387 |
| 380 | 0,059 | 5,687 | 96,934 |
| 381 | 0,301 | 5,124 | 17,041 |
| 382 | 0,134 | 4,610 | 34,511 |
| 383 | 0,089 | 4,851 | 54,258 |
| 384 | 0,057 | 4,185 | 73,297 |
| 386 | 0,048 | 6,932 | 145,935 |
| 387 | 0,065 | 7,824 | 120,545 |
| 388 | 0,108 | 4,780 | 44,464 |
| 389 | 0,095 | 4,958 | 52,404 |
| 390 | 0,176 | 5,041 | 28,646 |
| 396 | 0,048 | 2,303 | 47,674 |
| 398 | 0,221 | 4,647 | 21,049 |
| 402 | 0,070 | 5,952 | 85,602 |
| 403 | 0,792 | 8,615 | 10,882 |
| 405 | 0,091 | 4,677 | 51,501 |
| 406 | 0,063 | 9,320 | 148,149 |
| 407 | 0,079 | 12,009 | 151,597 |
| 408 | 0,162 | 11,189 | 69,131 |
| 410 | 0,191 | 9,777 | 51,236 |

Anhang

Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis Myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 411 | 0,217 | 8,554 | 39,472 |
| 412 | 0,148 | 5,211 | 35,231 |
| 413 | 0,300 | 9,112 | 30,402 |
| 415 | 0,128 | 7,544 | 59,045 |
| 417 | 0,223 | 16,151 | 72,351 |
| 418 | 0,229 | 9,895 | 43,302 |
| 420 | 0,158 | 11,322 | 71,481 |
| 421 | 0,129 | 7,597 | 59,042 |
| 422 | 0,178 | 11,503 | 64,650 |
| 425 | 0,192 | 4,489 | 23,433 |
| 426 | 0,019 | 5,035 | 269,108 |
| 427 | 0,255 | 15,601 | 61,291 |
| 428 | 0,086 | 10,578 | 123,159 |
| 429 | 0,087 | 8,035 | 92,016 |
| 430 | 0,031 | 9,134 | 294,020 |
| 431 | 0,130 | 10,124 | 77,839 |
| 432 | 0,332 | 8,113 | 24,445 |
| 433 | 0,169 | 10,509 | 62,068 |
| 441 | 0,040 | 8,204 | 205,600 |
| 442 | 0,163 | 10,406 | 63,892 |
| 446 | 0,093 | 9,498 | 102,377 |
| 447 | 0,054 | 9,293 | 172,802 |
| 469 | 0,335 | 10,403 | 31,100 |
| 476 | 0,034 | 6,550 | 192,610 |
| 479 | 0,129 | 7,580 | 58,657 |
| 480 | 0,182 | 10,281 | 56,353 |
| 483 | 0,052 | 10,121 | 192,969 |

Anhang

Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis Myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 484 | 0,088 | 10,660 | 121,214 |
| 487 | 0,115 | 7,520 | 65,455 |
| 488 | 0,182 | 7,790 | 42,832 |
| 489 | 0,052 | 10,880 | 209,325 |
| 490 | 0,094 | 8,510 | 90,716 |
| 492 | 0,152 | 8,686 | 57,186 |
| 493 | 0,159 | 12,236 | 76,798 |
| 494 | 0,063 | 8,371 | 132,566 |
| 495 | 0,198 | 9,155 | 46,322 |
| 496 | 0,051 | 11,832 | 230,280 |
| 497 | 0,241 | 12,685 | 52,717 |
| 500 | 0,171 | 11,427 | 66,658 |
| 501 | 0,067 | 9,002 | 134,625 |
| 502 | 0,044 | 9,310 | 210,292 |
| 503 | 0,321 | 9,085 | 28,284 |
| 504 | 0,399 | 8,024 | 20,122 |
| 505 | 0,046 | 8,842 | 191,048 |
| 506 | 0,054 | 10,270 | 191,432 |
| 507 | 0,107 | 9,351 | 87,723 |
| 508 | 0,024 | 7,453 | 305,369 |
| 509 | 0,046 | 8,112 | 175,036 |
| 510 | 0,049 | 9,367 | 192,919 |
| 511 | 0,039 | 7,388 | 189,040 |
| 514 | 0,039 | 8,944 | 227,109 |
| 515 | 0,035 | 8,774 | 249,431 |
| 516 | 0,160 | 6,120 | 38,135 |
| 517 | 0,215 | 7,895 | 36,689 |

Anhang

Tabelle 7: Fortsetzung Ergebnisse der Erythrozytenisolat- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis Myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 519 | 0,053 | 11,600 | 220,274 |
| 520 | 0,072 | 8,780 | 122,116 |
| 522 | 0,059 | 7,561 | 128,375 |
| 523 | 0,024 | 6,165 | 254,597 |
| 526 | 0,067 | 10,225 | 152,655 |
| 527 | 0,251 | 13,516 | 53,785 |
| 530 | 0,068 | 10,234 | 150,760 |
| 531 | 0,075 | 10,158 | 135,908 |
| 534 | 0,035 | 4,138 | 118,603 |
| 535 | 0,242 | 9,825 | 40,537 |
| 536 | 0,446 | 11,855 | 26,565 |
| 537 | 0,058 | 7,002 | 121,695 |
| 538 | 0,218 | 8,306 | 38,175 |
| 539 | 0,043 | 6,039 | 142,081 |
| 541 | 0,361 | 10,015 | 27,728 |
| 542 | 0,029 | 7,610 | 259,951 |
| 543 | 0,075 | 5,753 | 76,564 |
| 545 | 0,074 | 8,106 | 109,074 |
| 546 | 0,031 | 7,922 | 257,116 |
| 548 | 0,214 | 8,523 | 39,795 |
| 549 | 0,080 | 10,225 | 127,663 |
| 550 | 0,028 | 8,947 | 315,040 |
| 551 | 0,101 | 9,809 | 96,902 |
| 552 | 0,052 | 6,682 | 128,179 |
| 554 | 0,169 | 24,596 | 145,155 |
| 555 | 0,046 | 11,893 | 258,130 |
| 556 | 0,110 | 11,191 | 102,040 |
| 557 | 0,120 | 6,874 | 57,297 |
| 558 | 0,046 | 10,212 | 220,556 |

Plasma- Proben

Tabelle 8: Ergebnisse der Plasma- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis Myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 86 | 0,024 | 7,028 | 298,879 |
| 104 | 0,026 | 5,151 | 201,165 |
| 178 | 0,180 | 5,225 | 29,106 |
| 179 | 0,082 | 5,829 | 71,171 |
| 340 | 0,031 | 5,826 | 186,929 |
| 341 | 0,024 | 6,198 | 263,107 |
| 342 | 0,045 | 8,227 | 182,949 |
| 343 | 0,022 | 6,400 | 284,864 |
| 344 | 0,025 | 6,316 | 251,851 |
| 345 | 0,177 | 6,749 | 38,051 |
| 346 | 0,027 | 5,409 | 202,910 |
| 347 | 0,021 | 5,188 | 243,867 |
| 348 | 0,039 | 4,293 | 109,694 |
| 349 | 0,090 | 6,075 | 67,366 |
| 351 | 0,020 | 5,354 | 263,478 |
| 353 | 0,021 | 6,072 | 292,124 |
| 355 | 0,013 | 3,700 | 289,614 |
| 356 | 0,019 | 5,356 | 282,988 |
| 361 | 0,622 | 8,627 | 13,879 |
| 362 | 0,017 | 4,744 | 272,922 |
| 363 | 0,038 | 4,405 | 115,449 |
| 364 | 0,011 | 3,147 | 282,239 |
| 365 | 0,022 | 5,356 | 238,762 |
| 366 | 0,015 | 3,786 | 246,604 |
| 367 | 0,053 | 3,540 | 66,986 |
| 368 | 0,028 | 3,376 | 119,435 |

Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 369 | 0,014 | 4,011 | 277,739 |
| 370 | 0,531 | 4,989 | 9,388 |
| 371 | 0,261 | 5,352 | 20,483 |
| 374 | 0,054 | 2,785 | 52,030 |
| 375 | 0,039 | 6,308 | 163,801 |
| 376 | 0,016 | 3,150 | 199,024 |
| 379 | 0,194 | 3,260 | 16,809 |
| 380 | 0,025 | 3,255 | 132,246 |
| 381 | 0,030 | 3,862 | 129,906 |
| 382 | 0,049 | 3,107 | 63,522 |
| 383 | 0,025 | 3,595 | 146,578 |
| 384 | 0,010 | 3,096 | 295,586 |
| 386 | 0,012 | 3,677 | 313,044 |
| 387 | 0,037 | 6,497 | 175,638 |
| 388 | 0,013 | 3,129 | 244,682 |
| 389 | 0,014 | 3,664 | 265,324 |
| 390 | 0,018 | 2,811 | 159,102 |
| 396 | 0,064 | 3,017 | 46,801 |
| 398 | 0,014 | 2,656 | 189,405 |
| 399 | 0,028 | 6,172 | 220,185 |
| 402 | 0,056 | 3,191 | 56,993 |
| 403 | 0,167 | 7,554 | 45,192 |
| 405 | 0,042 | 6,257 | 148,157 |
| 406 | 0,043 | 11,228 | 260,090 |
| 407 | 0,071 | 6,408 | 90,136 |
| 408 | 0,054 | 8,007 | 148,505 |
| 410 | 0,080 | 6,893 | 86,114 |

Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 411 | 0,039 | 7,473 | 190,696 |
| 412 | 0,091 | 5,300 | 58,361 |
| 413 | 0,213 | 9,113 | 42,754 |
| 415 | 0,024 | 7,288 | 306,498 |
| 417 | 0,029 | 7,446 | 259,577 |
| 418 | 0,377 | 7,100 | 18,845 |
| 420 | 0,042 | 8,639 | 203,719 |
| 421 | 0,039 | 8,129 | 208,664 |
| 422 | 0,028 | 7,257 | 257,282 |
| 425 | 0,379 | 9,469 | 25,007 |
| 426 | 0,044 | 7,517 | 171,433 |
| 427 | 0,086 | 7,854 | 91,579 |
| 428 | 0,008 | 9,355 | 1246,233 |
| 429 | 0,026 | 8,439 | 319,758 |
| 430 | 0,096 | 8,880 | 92,507 |
| 431 | 0,025 | 8,086 | 323,702 |
| 432 | 0,276 | 7,284 | 26,366 |
| 433 | 0,059 | 10,183 | 173,116 |
| 441 | 0,015 | 6,127 | 401,127 |
| 442 | 0,104 | 8,127 | 78,201 |
| 446 | 0,102 | 7,195 | 70,693 |
| 447 | 0,040 | 7,864 | 198,322 |
| 469 | 0,055 | 7,435 | 135,928 |
| 476 | 0,033 | 9,104 | 275,942 |
| 479 | 0,055 | 6,737 | 123,201 |
| 480 | 0,050 | 8,324 | 167,641 |
| 483 | 0,035 | 7,300 | 207,795 |

Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis myo-/ chiro- Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|---|
| 484 | 0,033 | 5,225 | 160,508 |
| 487 | 0,070 | 5,725 | 82,038 |
| 488 | 0,025 | 4,912 | 192,723 |
| 489 | 0,041 | 9,805 | 237,903 |
| 490 | 0,054 | 6,833 | 125,959 |
| 492 | 0,092 | 7,718 | 83,455 |
| 493 | 0,129 | 8,008 | 62,308 |
| 494 | 0,018 | 5,542 | 301,337 |
| 495 | 0,324 | 13,835 | 42,715 |
| 497 | 0,542 | 8,437 | 15,563 |
| 500 | 0,039 | 7,867 | 200,185 |
| 501 | 0,047 | 6,483 | 136,875 |
| 502 | 0,026 | 8,037 | 303,469 |
| 503 | 0,074 | 7,801 | 105,194 |
| 504 | 0,105 | 6,014 | 57,405 |
| 505 | 0,041 | 5,205 | 127,610 |
| 506 | 0,029 | 6,987 | 243,798 |
| 507 | 0,045 | 7,418 | 163,570 |
| 508 | 0,024 | 6,651 | 279,155 |
| 509 | 0,024 | 6,252 | 261,439 |
| 510 | 0,028 | 6,568 | 237,169 |
| 511 | 0,031 | 6,170 | 201,654 |
| 514 | 0,033 | 8,307 | 249,489 |
| 515 | 0,034 | 8,237 | 239,800 |
| 516 | 0,035 | 5,274 | 149,752 |
| 517 | 0,612 | 6,267 | 10,240 |

Tabelle 8: Fortsetzung Ergebnisse der Plasma- Proben

| Probe: | chiro- Inositol (µg / ml) | myo- Inositol (µg / ml) | Verhältnis myo-/ chiro-Inositol |
|---------------|--|--------------------------------------|--|
| 519 | 0,025 | 6,447 | 256,284 |
| 520 | 0,051 | 7,283 | 142,260 |
| 522 | 0,032 | 8,728 | 269,515 |
| 526 | 0,085 | 8,536 | 99,939 |
| 527 | 0,039 | 6,492 | 165,330 |
| 530 | 0,039 | 7,424 | 192,564 |
| 531 | 0,035 | 6,591 | 189,853 |
| 534 | 0,065 | 7,223 | 110,699 |
| 535 | 0,046 | 7,920 | 172,776 |
| 536 | 0,587 | 7,357 | 12,539 |
| 537 | 0,101 | 4,645 | 46,110 |
| 538 | 0,046 | 6,327 | 137,941 |
| 539 | 0,185 | 5,264 | 28,494 |
| 541 | 0,140 | 6,175 | 44,114 |
| 542 | 0,034 | 6,178 | 184,206 |
| 543 | 0,021 | 4,970 | 233,299 |
| 545 | 0,022 | 7,007 | 321,324 |
| 546 | 0,017 | 6,512 | 381,805 |
| 548 | 0,029 | 5,521 | 192,606 |
| 549 | 0,060 | 8,814 | 146,352 |
| 550 | 0,038 | 6,397 | 168,885 |
| 551 | 0,413 | 9,279 | 22,483 |
| 552 | 0,031 | 6,700 | 217,534 |
| 554 | 0,171 | 5,847 | 34,224 |
| 555 | 0,046 | 2,729 | 59,959 |
| 557 | 0,515 | 6,998 | 13,597 |
| 558 | 0,037 | 8,006 | 217,291 |

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Dieter Luft in der Zeit von März 2000 bis Dezember 2006 in der Abteilung für Innere Medizin IV der Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dieter Luft für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen und anregenden Diskussionen sowie für die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Ich danke Herrn PD Dr. Dr. Hans Günther Wahl für seine Geduld mit mir und die zahlreich von mir in Anspruch genommenen Stunden der fruchtbaren Zusammenarbeit.

Ich danke Herrn Dipl. Ing. (FH) Josef G. Wöll für seine stets aufmunternden Worte und seine Gelassenheit im Angesicht gescheiterter Versuchsanordnungen.

Ich danke Frau Claudia Peterfi für die hilfreiche Unterstützung bei den Routinearbeiten im Labor.

Ich danke Herrn Roman Werner für seinen unermüdlichen zielgerichteten Einsatz in der Planung und Durchführung der Messungen.

Ich danke besonders meinen Eltern für ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der langen Ausbildung in der Medizin.

Ich danke ganz besonders meiner Frau Catharina für ihre liebevolle und gleichzeitig bestimmte Art, mich voranzutreiben.

Lebenslauf

von **Stefan Namislo**, geb. am 30.01.1976 in Ankum

Schulbildung:

| | |
|-------------|---|
| 1982 – 1986 | Katholische Grundschule Bersenbrück |
| 1986 – 1988 | Orientierungsstufe Dom Osnabrück |
| 1988 – 1995 | Gymnasium Ursulaschule Osnabrück |
| Mai 1995 | Abschluss der Schulbildung mit dem Abitur |

Zivildienst:

| | |
|---------------------------|--|
| August 1995 – August 1996 | in der orthopädischen und chirurgischen Pflege, Marienhospital, Ankum |
|---------------------------|--|

Universitätsausbildung:

| | |
|--------------------------|--|
| WS 1996 / 1997 – SS 1998 | Ernst – Moritz – Arndt – Universität Greifswald |
| September 1998 | Abschluss der vorklinischen Studien mit dem Physikum |
| WS 1998 / 1999 – SS 2003 | Eberhard – Karls – Universität Tübingen |
| März 1999 | Famulatur in der Chirurgischen Ambulanz des Marienhospitals Ankum |
| September 1999 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Famulatur in der Klinik für Innere Medizin A der Ernst – Moritz – Arndt – Universität Greifswald |
| März 2000 | Famulatur in der Ambulanz der Universitäts – Klinik für Augenheilkunde Innsbruck (Österreich) |
| März 2001 | Famulatur im Princess – Margaret – Rose – Hospital for Orthopaedics and Trauma in Edinburgh (Grossbritannien) |
| April 2002 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Lebenslauf

April 2002 – März 2003

Praktisches Jahr:

1. Teil in der Klinik für Orthopädie,
Chefarzt Prof. Dr. J. Gekeler,
Städtisches Krankenhaus Sindelfingen
2. Teil in der Chirurgie,
Chefarzt Dr. C. Klaiber,
Spital Aarberg (Schweiz)
3. Teil in der Medizinischen Klinik,
Chefarzt Prof. Dr. R. Joss,
Kantonsspital Luzern (Schweiz)

15. Mai 2003

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

AiP- Ausbildungsverhältnis / Weiterbildung als Assistent:

Oktober 2003- November 2004

Klinik für Unfall- und Wiederherstellungs- Chirurgie,
Chefarzt Dr. C. Hirthe,
Hans- Susemihl- Krankenhaus, Emden

Januar 2005- September 2005

Klinik für Orthopädie,
Chefarzt Prof. Dr. G. Godolias,
St. Anna Hospital, Herne

Oktober 2005- März 2007

Orthopädisch- Traumatologisches Zentrum,
Chefarzt PD Dr. U. Quint,
St. Marienhospital, Hamm

seit April 2007

Klinik für Orthopädie und Traumatologie,
Chefarzt Dr. F. Horst,
St. Josef- Stift, Sendenhorst