

Aus der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Werner Kremer
Biophysik

Kernresonanz-basierte Lipoproteinanalyse bei diabetischer Stoffwechsellage

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tina Kalbitzer

2022

Aus der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Werner Kremer
Biophysik

Kernresonanz-basierte Lipoproteinanalyse bei diabetischer Stoffwechsellage

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tina Kalbitzer

2022

Dekan: Prof. Dr. Ralph Witzgall

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner Kremer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram Gronwald

Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.23

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung.....	6
1 Einleitung.....	8
1.1 NMR-basierte Metabolomik	8
1.2 Grundlagen des Diabetes mellitus	9
1.3 Veränderungen im Fettstoffwechsel bei Diabetikern.....	10
1.3.1 Patienten mit metabolischem Syndrom zeigen ähnliche Veränderungen wie Diabetiker.....	10
1.3.2 Zunahme der Cholesterolsynthese und verringerte enterale Cholesterolaufnahme	11
1.3.3 Erhöhte Chylomikronkonzentrationen bei Diabetikern	11
1.3.4 Erhöhte Konzentration von VLDL-Partikeln.....	11
1.3.5 Veränderung der LDL-Partikel in Aufbau und Größe.....	12
1.3.6 Abnahme der Gesamtzahl der HDL-Partikel trotz Zunahme der Gesamtzahl kleiner HDL Partikel.....	12
1.4 Andere Studien über den Zusammenhang von mit NMR-Spektroskopie bestimmten Lipoproteinuntergruppen und Diabetes	13
1.5 Grundlagen der NMR-Spektroskopie.....	17
1.6 Zuordnung von Resonanzlinien	19
2 Material und Methoden	22
2.1 Studiendesign.....	22
2.2 Diagnostik von Glukosetoleranz und Diabetes	23
2.3 NMR Spektroskopie	24
2.3.1 NMR-Messungen	24
2.3.2 Primäre Datenauswertung	26
2.4 Statistische Auswertung	27
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Zuordnung der Signale im NMR-Spektrum.....	32
3.2 Berechnung des Zeitverlaufs aus Rückstellproben.....	41
3.3 Vergleich der aus den Rückstellproben berechneten Werte für den Zeitpunkt der Diagnosestellung mit den Nüchternwerten	44
3.4 Wichtung der Konzentration mit der Gesamtlipoproteinkonzentration.....	47
3.5 Vergleich der Nüchternblutproben von Gesunden mit Prädiabetikern und Diabetikern	47
3.6 Vergleich der Rückstellproben von Gesunden mit Prädiabetikern und Diabetikern mithilfe von statistischen Testverfahren	52

3.6.1	Vergleich der aus den zeitabhängigen Lipoproteinkonzentrationen berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests von Gesunden mit an Prädiabetes oder Diabetes Erkrankten	53
3.6.2	Vergleich der Steigungen der aus den Rückstellproben berechneten Geraden von Gesunden mit (Prä)diabetikern	59
3.6.3	Vergleich der aus den, mit der Gesamtlipoproteinkonzentration gewichteten, Lipoproteinkonzentrationen berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukose Toleranztests von Gesunden mit an Prädiabetes oder Diabetes Erkrankten	64
3.6.4	Vergleich der Steigungen der aus den mit der Gesamtlipoprotein gewichteten Rückstellproben berechneten Geraden von Gesunden mit (Prä)diabetikern	68
3.7	Grafische Betrachtung der Zeitverläufe der Rückstellproben	71
3.7.1	Häufigkeitsverteilung über die Anzahl der vorhandenen Proben über die vorhandenen Jahre.....	71
3.7.2	Grafische Betrachtung Verteilungskurven der Lipoproteinkonzentrationen über die letzten 10 Jahre	74
3.8	Korrelationen zwischen den Konzentrationsverhältnissen einzelner Lipoproteinsubklassen.....	81
3.8.1	Prozentuale Unterschiede der Quotienten und Produkte der Lipoproteinkonzentrationen zwischen Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern.....	81
3.8.2	Zeitabhängigkeit der kombinierten Lipoproteinkonzentrationen.....	86
4	Diskussion	91
4.1	Das untersuchte Patientenkollektiv.....	91
4.2	Unterschiede der Lipoproteinmuster im nüchternen und nicht nüchternen Zustand.....	93
4.3	Vergleich mit anderen Studien	95
4.4	Zeitabhängige Änderungen der Lipoproteinkonzentrationsverteilungen	99
4.5	Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen von möglicherweise korrelierten Konzentrationspaaren	101
5	Literaturverzeichnis.....	102
6	Danksagung	107
7	Lebenslauf	108
8	Anhang.....	109

Abkürzungsverzeichnis

Apo-B	Apolipoprotein B
Chylo /CM	Chylomikronen
CM Re	Chylomikronen Remnants
Cit	Citrat
FS	Fettsäure
Gln	Glutamin
HbA _{1c}	Glycated hemoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IFG	Impaired fasting glucose
IGT	Impaired glucose tolerance
Ile	Isoleucin
LDL	Low Density Lipoprotein
Leu	Leucin
LPL	Lipoproteinlipase
MESA	Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
MTP	Microsomal triglyceride transfer protein
oGTT	Oraler Glukosetoleranztest
T2D	Typ 2 Diabetes
Tyr	Tyrosin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Lipoproteinveränderungen im Blutplasma von Prädiabetikern und Diabetikern im Vergleich zu Gesunden mithilfe der hochauflösenden ^1H NMR Spektroskopie untersucht. Die NMR-Metabolomik von Körperflüssigkeiten ist eine neue Hochdurchsatzmethode zur zerstörungsfreien Analytik von Körperflüssigkeiten, die immer größere Bedeutung gewinnt. In der von der Bayerischen Forschungstiftung geförderten Studie wurden Blutproben von Blutspendern des Bayerischen Roten Kreuzes (BRK) analysiert. Die Probanden wurden nach Durchführung eines oralen Glukose Toleranztests (oGTT) in Gruppen eingeteilt: 323 waren gesund, 231 hatten einen erhöhten Nüchternglukosewert (IFG), 40 hatten eine gestörte Glukosetoleranz (IGT), 83 hatten sowohl eine erhöhte Nüchternglukose als auch eine gestörte Glukosetoleranz und bei 66 wurde neu ein Diabetes Typ 2 diagnostiziert. Von den Probanden wurden die Blutproben des oralen Glukosetoleranztests mit Nüchternglukose und 2h nach Glukosegabe, sowie über Jahre hinweg bei Blutspenden aufgehobene Blutproben untersucht. Im Schnitt lagen diese zurückgelegten Proben für 6 Jahre vor Durchführung des oralen Glukosetoleranztests vor. Bei Abnahme dieser Rückstellblutproben waren die Patienten nicht nüchtern. Mithilfe von NMR-Spektroskopie wurden die Konzentrationen von 15 verschiedenen Lipoproteinuntergruppen bestimmt. Insgesamt standen 32762 NMR Spektren zur Auswertung zur Verfügung.

Dabei zeigten Prädiabetiker und Diabetiker im Vergleich zu Gesunden charakteristische Unterschiede der Lipoproteinkonzentrationen. Nicht-nüchtern zeigte sich bei Diabetikern eine signifikante Erhöhung von VLDL A und B, Chylomikronen A und B, Chylomikronen Remnants und allen Chylomikronenfraktionen gemeinsam. LDL C war signifikant erniedrigt. Die LDL C Abnahme sowie die Zunahme von VLDL A, Chylomikronen Remnants und Chylomikronen A konnte auch bei allen Formen von Prädiabetes als signifikant beobachtet werden. Teilweise waren Lipoproteine auch nur bei einzelnen Prädiabetesgruppen verändert: VLDL B (einzig bei Probanden mit Kombination aus IFG und IGT signifikant erhöht), HDL C war nur bei der Gruppe mit IFG signifikant erniedrigt. Chylomikronen B waren bei allen Gruppen

außer bei der mit isolierter IGT signifikant erhöht und die Summe der Chylomikronen bei allen Gruppen außer bei Probanden mit isolierter IFG. Insgesamt waren im nicht nüchternen Zustand vor allem die größeren Lipoproteine Chylomikronen und VLDL, mit welchen die Fette vom Darm zur Leber und von dort weiter in den restlichen Körper transportiert werden, auffällig. Bei der nüchternen Gruppe waren insgesamt weniger Veränderungen sichtbar und diese vor allem bei kleineren Lipoproteinen wie HDL und LDL.

Die Ergebnisse wurden mit veröffentlichten Ergebnissen aus anderen Studien verglichen, in denen ebenfalls mit NMR-Spektroskopie bestimmte Lipoproteinkonzentrationen bei Diabetikern untersucht wurden. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Muster. Nur die kleineren LDL Partikel (LDL A und LDL B) waren hier signifikant erniedrigt, während die meisten anderen Forschungsgruppen eine signifikante Zunahme feststellten. Die Chylomikronenkonzentrationen bei Diabetikern wurden nur in einer einzigen anderen Studie (J. Wang et al., 2012) untersucht. Auch hier findet man einen signifikanten Anstieg bei Diabetikern.

Zudem wurden aus den verschiedenen Lipoproteinuntergruppen miteinander Quotienten und Verhältnisse gebildet. Aus diesen wurden dann wieder die prozentualen Unterschiede von Prädiabetikern im Vergleich zu Gesunden berechnet. Insbesondere bei Verhältnissen und Produkten, welche VLDL oder Chylomikronen enthielten, waren die Unterschiede der zugehörigen Verteilungen nochmal größer als beim Vergleich der einzelnen Lipoproteinuntergruppen.

Um die Entwicklung der Lipoproteine in den Jahren vor der Diagnosestellung des Diabetes darzustellen, wurde mithilfe der zurückgelegten Blutproben Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen für zehn, acht, sechs, vier, zwei sowie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung berechnet und graphisch dargestellt.

Zudem wurde mithilfe von Literaturrecherche und zusätzlich aufgenommenen 2D-Spektren in den ^1H NMR Spektren menschlichen Serums die Signale zahlreicher kleinerer Metaboliten zugeordnet.

1 Einleitung

1.1 NMR-basierte Metabolomik

Metabolomik bezeichnet die Forschung an dem Metabolom in Bezug auf Konzentration von Metaboliten, Struktur und Stoffwechselwege. (Fan, Lane, & Higashi, 2012) Sie findet ihre Anwendung in der Diagnostik von Krankheiten, beim Überwachen von medizinischen Behandlungen, wie z.B. Medikamenteneinnahme, bei der Analyse biochemischer Vorgänge und ihre Veränderung durch Mutationen, Alter, Ernährung und Life Style. (Markley et al., 2017) Die beiden häufigsten Methoden, die dabei zum Einsatz kommen, sind Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR Spektroskopie). Beide bieten ihre eigenen Vorteile und können auch kombiniert zum Einsatz kommen. Die Massenspektrometrie ist viel sensitiver und es wurden bereits Signale von mehr Metaboliten zugeordnet als in den NMR-Spektren nachweisbar sind. Bei der NMR Spektroskopie werden vor allem kleine Metaboliten bestimmt, die schmale Peaks verursachen, hingegen sind für die Massenspektrometrie auch größere Metaboliten kein Problem. Dafür lassen sich mithilfe der NMR Spektrometrie viel genauer die Konzentrationen der Stoffe bestimmen. Die Genauigkeit der Konzentrationsmessung bleibt dabei über 6 Größenordnungen erhalten, also bis in den μmol Bereich. Dadurch werden Verdünnungsreihen überflüssig und somit eine mögliche Fehlerquelle eliminiert. Weitere mögliche Fehlerquellen werden vermieden, indem die Probe für die NMR Messung nicht vorbearbeitet werden muss, sondern direkt gemessen werden kann. Das Besondere an der NMR Spektroskopie ist, dass man nicht nur das sieht, nach dem man sucht, sondern viele verschiedene Bestandteile sichtbar werden. Dadurch ist es möglich, das Zusammenspiel vieler verschiedener Biomarker zu untersuchen. So kann NMR zur Verbesserung personalisierter Krebstherapie (Palmas & Vogel), bei der Abschätzung des kardiovaskulären Risikos (Brindle et al., 2002) und sogar zur Vorhersage der Sterblichkeit innerhalb der nächsten Jahre verwendet werden. (Deelen et al., 2019) Es ist außerdem die einzige Methode, mit der im Plasma schnell und mit großer Genauigkeit die Konzentration der Lipoproteinuntergruppen bestimmt werden kann.

1.2 Grundlagen des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine Glukosestoffwechselstörung mit chronisch erhöhten Blutzuckerwerten. Grund dafür kann eine gestörte Insulinsekretion, eine gestörte Insulinwirkung oder beides sein. Beim Diabetes mellitus Typ I liegt ein absoluter Insulinmangel vor, beim Diabetes mellitus Typ II dagegen ein Missverhältnis zwischen der Insulinsekretion und der Wirkung des Insulins, es handelt sich also um einen relativen Insulinmangel. (Baenkler, Goldschmidt, & Hahn, 2015) Aktuell sind in Deutschland 7,5 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, wobei 95% an Diabetes mellitus Typ II leiden. Zusätzlich ist von einer Dunkelziffer von mindestens zwei Millionen Menschen auszugehen, weil Diabetes mellitus, vor allem Typ II oft aufgrund unspezifischer oder fehlender Symptome nicht diagnostiziert wird. (Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes Hilfe, 2019) Jedoch kann Diabetes Typ II, unzureichend behandelt, verschiedene negative Folgen für die Betroffenen haben: Chronische Schädigung der großen Gefäße kann Herzinfarkte, Schlaganfälle und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) verursachen. Schädigung der kleinen Gefäße führen zu Komplikationen an Augen, Nieren und Nerven in Form einer diabetischen Retinopathie, diabetischen Glomerulopathie oder einer diabetischen Polyneuropathie. (Baenkler et al., 2015) Diagnostiziert werden kann Diabetes über folgende Kriterien: Wird der Glukosespiegel unabhängig von Tageszeit und vorrausgegangen Mahlzeiten gemessen, gilt eine Glukosekonzentration von 200 mg/dL im venösen Plasma in Verbindung mit klassischen Symptomen wie Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust als für eine Diagnosestellung ausreichend. Ansonsten wird Diabetes mellitus meist über eine Bestimmung der Nüchternglukose diagnostiziert. Dabei liegt ab 126 mg/dL ein Diabetes mellitus vor. Beträgt der Nüchternwert zwischen 100 mg/dL und 125 mg/dL, liegt eine gestörte Nüchternglukose vor, und es wird ein oraler Glukosetoleranztest zur weiteren Abklärung empfohlen. Auch der HbA_{1c} Wert kann zur Diagnosestellung herangezogen werden. HbA_{1c} entsteht, wenn Glukose irreversibel an Hämoglobin A gebunden wird. Da das HbA_{1c} erst aus dem Blut entfernt wird, wenn die Erythrozyten abgebaut werden, korreliert die Menge an HbA_{1c}

mit der mittleren Blutglukosekonzentration der letzten 8 bis 10 Wochen. Ein HbA_{1c} Wert von über 6,5% spricht für einen Diabetes mellitus, Werte zwischen 5,7% bis 6,5% sprechen für eine gestörte Glukosetoleranz. (Baenkler et al., 2015) Es gibt verschiedene Risikofaktoren für die Entwicklung eines Diabetes. Dazu gehören Ernährungsgewohnheiten, Übergewicht, fehlende Bewegung und Stress.

1.3 Veränderungen im Fettstoffwechsel bei Diabetikern

Tabelle 1.3.1 listet die typischen Fettstoffwechseleränderungen bei Diabetes mellitus Typ-2 auf.

Tabelle 1.3.1 charakteristische Änderung des Lipoproteinmetabolismus^a

Key changes in lipoprotein metabolism in type 2 diabetes			
Lipoprotein	Quantitative changes	Qualitative changes	Kinetic/metabolic changes
Chylomicron	<ul style="list-style-type: none"> • Increased plasma concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Very few data (decreased ApoE content in diabetic rabbits) 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased production • Decreased catabolism
VLDL	<ul style="list-style-type: none"> • Increased plasma concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Greater proportion of larger particles (VLDL₁) • Increased palmitic acid-containing species and diacylglycerol, reduced sphingomyelin • Glycation 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased production • Decreased catabolism
LDL	<ul style="list-style-type: none"> • No change or slightly increased plasma concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Greater proportion of small, dense particles (triacylglycerol enrichment) • Increased LDL oxidation • Increased palmitic acid-containing species and diacylglycerol, reduced sphingomyelin • Glycation 	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased catabolism
HDL	<ul style="list-style-type: none"> • Decreased plasma concentration 	<ul style="list-style-type: none"> • Triacylglycerol enrichment • Reduced phospholipids, ApoE and ApoM • Glycation 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased catabolism

^aÜbersicht über die Veränderungen des Lipoproteinstoffwechsels bei Typ 2 Diabetikern, übernommen aus Vergès (2015).

Wenn im Folgenden von Diabetikern gesprochen wird, sind dabei immer an Diabetes mellitus Typ II erkrankte Personen gemeint. Typische Veränderungen sind in Tabelle 1.3.1 zusammengefasst.

1.3.1 Patienten mit metabolischem Syndrom zeigen ähnliche Veränderungen wie Diabetiker

Viele für Diabetiker typische Veränderungen im Lipidstoffwechsel bestehen schon vor Beginn der Erkrankung als Teil des metabolischen Syndroms, wie Ansammlung von triacylglycerolhaltigen Lipoproteinen, also VLDL und Chylomikronen, verringerte Konzentration von HDL Cholesterol, erhöhte Remnant Lipoproteine, erhöhtes

Apolipoprotein B (Apo-B), erhöhte Konzentration von LDL-Partikeln und kleinen HDL-Partikeln. All diese Abweichungen sind Atherosklerose fördernd. (Grundy, Brewer, Cleeman, Smith, & Lenfant, 2004)

1.3.2 Zunahme der Cholesterolsynthese und verringerte enterale Cholesterolaufnahme

Diabetiker nehmen weniger Cholesterol über die Verdauung auf, dafür synthetisieren sie allerdings mehr. Diese Veränderungen sind nicht allein durch einen erhöhten BMI zu erklären. (Simonen, Gylling, & Miettinen, 2002)

1.3.3 Erhöhte Chylomikronkonzentrationen bei Diabetikern

Diabetiker haben durch eine erhöhte Produktion und einen verlangsamten Abbau erhöhte Chylomikronenwerte. (Vergès, 2015) So ist bei Diabetikern nach Nahrungsaufnahme eine erhöhte Konzentration von apoB-48 nachweisbar, (Hogue et al., 2007) welches im Darm synthetisiert wird und in Chylomikronen und Remnants enthalten ist. Aber auch nüchtern haben Diabetiker erhöhte apoB-48 Spiegel. (Curtin et al., 1996) Dazu passt, dass Diabetiker eine erhöhte Expression von Mikrosomalem Triglycerid-Transferprotein (MTP) im Darm haben, welches dort dafür da ist, den Transport und Einbau von Lipiden in Chylomikronen zu katalysieren. (Phillips, Mullan, Owens, & Tomkin, 2006) Ein Grund für den verlangsamten Abbau könnte die verringerte Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) sein, ein Enzym, welches zu der Spaltung von Triacylglyceriden in Lipoproteinen dient und somit für den Abbau von Chylomikronen und VLDL mitverantwortlich ist. (Taskinen, Nikkilä, Kuusi, & Harmo, 1982)

1.3.4 Erhöhte Konzentration von VLDL-Partikel

Diabetiker haben erhöhte VLDL-Werte (Ginsberg, 1987), selbst bei übergewichtigen, bereits Insulin resistenten, aber noch nicht an Diabetes Erkrankten finden sich erhöhte VLDL-Werte. (Pont, Duvillard, Florentin, Gambert, & Vergès, 2002 Oct 01) Dabei ist vor allem die Produktion von großen VLDL-Partikeln gesteigert (Malmstrom et al., 1997 Apr) Dabei produziert die Leber vor allem deshalb mehr VLDL, weil mehr Fettsäuren aus dem viszeralen Fettgewebe angeschwemmt werden. Die Ursache für diesen Abbau von Fettsäuren ist die gesteigerte Aktivität der Hormonsensitiven Lipase. (Häring & Artunc, 2011) Die Hormonsensitive Lipase wird normalerweise durch Insulin gehemmt (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2016), bei

Diabetikern sind die Zellen jedoch zunehmend insulinresistent. Außerdem ist bei Diabetikern die Aktivität der Lipoproteinlipase erniedrigt, weil normalerweise deren Aktivität durch Insulin gesteigert wird. Dadurch werden VLDL und auch Chylomikronen langsamer abgebaut. (Häring & Artunc, 2011)

1.3.5 Veränderung der LDL-Partikel in Aufbau und Größe

Bei an Diabetes Typ 2 Erkrankten ist das LDL-Cholesterol unverändert oder leicht erhöht gegenüber gesunden Personen. (J. Wang et al., 2012) (Vergès, 2005 Nov) Allerdings wird LDL langsamer abgebaut, (Duvillard et al., 2000 Aug) wodurch LDL-Partikel länger im Plasma verbleiben, was eine Ursache für verstärkte Lipidablagerung in den Gefäßwänden sein könnte. Auch in seinem Aufbau ist LDL bei Diabetikern verändert: Durch die erhöhten Blutzuckerspiegel wird Apo-B100 der LDL-Partikel glykiert. (Rabbani et al., 2010 Apr) Glykiertes LDL wiederum hat eine niedrigere Affinität für LDL-Rezeptoren (Steinbrecher & Witztum, 1984) und wird leichter von Makrophagen aufgenommen, (Makita, Tanaka, Nakano, Nakajima, & Numano, 1999) die dann zu Schaumzellen werden und sich häufig in atherosklerotischen Plaques befinden. Außerdem sind LDL-Partikel bei Diabetikern häufiger oxidiert. (Rabbani et al., 2010 Apr) Dabei werden unter anderem Fettsäuren, Lipidderivate und Proteine oxidiert. (Parthasarathy, Raghavamenon, Garelnabi, & Santanam, 2010). Wie glykiertes LDL hat auch oxidiertes LDL eine verringerte Affinität zu LDL-Rezeptoren und wird vermehrt von Makrophagen aufgenommen, was ebenfalls zu Schaumzellen führt. (Kita et al., 2001)

Diabetiker besitzen mehr kleines triacylglycerolreiches LDL. (Feingold, Grunfeld, Pang, Doerrler, & Krauss, 1992) Kleines LDL ist ein Risikofaktor für Gefäßerkrankungen. (Vakkilainen et al., 2003)

Außerdem enthält Diabetiker LDL weniger Sphingomyelin und mehr Palmitinsäure und Diacylglycerol. (Stählman et al., 2012)

1.3.6 Abnahme der Gesamtzahl der HDL-Partikel trotz Zunahme der Gesamtzahl kleiner HDL Partikel

Diabetiker haben niedrigeres HDL-Cholesterol und ApoA-1 (Vergès, 2015). Dabei sind die kleineren HDL-Partikel erhöht, allerdings sind die größeren HDL-Partikel so stark erniedrigt, dass sie insgesamt weniger HDL-Partikel haben (Garvey et al., 2003) Grund dafür ist der verstärkte Abbau von HDL bei Diabetikern (Duvillard, Pont, Florentin, Gambert, & Vergès, 2000) Dieser verstärkte Abbau wird mit erhöhter

Produktion von großen VLDL und erniedrigtem Abbau von großen VLDL in Verbindung gebracht. (Vergès et al., 2014) Wie auch andere Lipoproteine wird HDL glyciert. Große HDL-Partikel enthalten bei Diabetikern weniger Phospholipide, was mit zunehmender Verhärtung der Arterien im Zusammenhang steht. (Gordon et al., 2013) Außerdem enthält großes HDL von Diabetikern weniger ApoE, was auch Artherosklerose verstärken kann, weil normalerweise ApoE-reiches HDL LDL davon abhält, an die Gefäßwand zu binden. Vermutet wird, dass HDL über das ApoE mit den Proteoglykanen der Intima lösliche Komplexe bildet, welche einen gewissen Schutz vor LDL-Proteoglykan-Aggregaten bieten. (Umaerus, Rosengren, Fagerberg, Hurt-Camejo, & Camejo, 2012)

1.4 Andere Studien über den Zusammenhang von mit NMR-Spektroskopie bestimmten Lipoproteinuntergruppen und Diabetes

27,909 gesunde Frauen nahmen an der Women's Health Study teil und gaben eine Blutprobe ab, die mit NMR vermessen wurde. (Mora et al., 2010) Durch Nachbefragungen wurde evaluiert, welche Frauen in dem Nachverfolgungszeitraum von durchschnittlich 13 Jahren Diabetes entwickelten (n=1687), es handelt sich also um eine prospektive Studie. Ausgeschlossen wurden alle Frauen, die anamnestisch angaben, an Diabetes mellitus erkrankt zu sein, oder die einen HbA1c Wert von 6.5% oder mehr hatten. Die Datenanalyse wurde dann noch ein zweites Mal unter Ausschluss aller Probanden, deren HbA1c Wert mindestens 6.0% betrug, durchgeführt. Ein HbA1c-Wert von mindestens 6.5% ist ein Diagnosekriterium für Diabetes, Werte zwischen 5.7% und 6.5% sprechen tendenziell für eine Störung der Glukosetoleranz, allerdings wird im klinischen Alltag bei Werten zwischen 5.7% und 6.5% nochmal die Nüchtern glukose bestimmt oder ein oGTT durchgeführt, um sicher zwischen Nicht-Diabetikern, Prädiabetes und Diabetes unterscheiden zu können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es durch diese Maßnahmen vermutlich gelungen ist, einen Teil der Prädiabetiker herauszufiltern. Sie konnten Veränderungen bei vielen verschiedenen Lipoproteinen nachweisen. Eine Erhöhung der Konzentration sowohl an kleinen LDL-Partikeln als auch an geringerer LDL-Größe waren positiv mit dem späteren Auftreten von Diabetes korreliert. Bezüglich HDL hatten zukünftige Diabetiker weniger HDL-Cholesterol. Außerdem war die mit NMR-Spektroskopie gemessene HDL-Gesamtkonzentration bei zukünftigen Diabetikern geringer, was auf eine Abnahme an großen HDL-Partikeln zurückzuführen war. Allerdings war die Konzentration an kleinen HDL-Partikeln bei

Probanden, bei denen später Diabetes nachgewiesen wurde, erhöht. Eine verringerte HDL-Größe war auch ein Risikofaktor für Diabetes. Erhöhte Triglyzeridkonzentration war mit einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit korreliert. Große VLDL-Partikel korrelierten stärker mit Diabetes als kleine VLDL-Partikel, die durchschnittliche VLDL-Größe war allerdings weniger stark mit dem Auftreten von Diabetes korreliert als die Größe der HDL- oder LDL-Partikel. Außerdem wurde auch überprüft, ob es einen Unterschied macht, ob die Probanden bei der Blutabnahme nüchtern waren. Generell waren die Unterschiede der Lipoproteinmessungen zwischen nüchternen und nicht nüchternen nicht beziehungsweise nur grenzwertig signifikant, allerdings war eine Erhöhung der großen VLDL-Partikel, bei nicht nüchternen Probanden stärker mit Diabetes korreliert als die aus Blut von nüchternen Probanden gewonnenen VLDL-Werte.

Eine ähnliche Studie wurde auch im Rahmen der Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) durchgeführt. (Festa et al., 2005) Dabei wurde von 830 Patienten Blut abgenommen, das Plasma wurde mithilfe von NMR-Spektroskopie untersucht. 130 dieser Probanden entwickelten in einer durchschnittlichen Nachuntersuchungszeit von 5,2 Jahren einen Diabetes mellitus. Beim Vergleich zwischen den Prädiabetikern und denen, die gesund bleiben würden, fiel wieder auf, dass eine Zunahme der Größe der VLDL-Partikel und eine Zunahme der großen VLDL-Partikel mit einem erhöhten Risiko für Diabetes korreliert sind. Außerdem waren eine Zunahme der LDL Konzentration insgesamt und eine Zunahme an kleinem LDL ein Risikofaktor für Diabetes. Zukünftige Diabetiker hatten weniger großes HDL und mehr kleines HDL. Die durchschnittliche Größe von sowohl VLDL als auch HDL und LDL war signifikant unterschiedlich. Nach Anpassung des Modells war nur noch die VLDL-Größe und die Konzentration von kleinen HDL, unabhängig von Taillenumfang, Triglyceriden und HDL-Cholesterol, signifikant unterschiedlich.

Im Rahmen der Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) wurde auch der Zusammenhang von Lipoproteinen, Insulinresistenz und Diabetes untersucht: So wurde ein Lipoprotein-Insulinresistenz-Index (LP-IR) aufgestellt. (Shalurova, Connelly, Garvey, & Otvos) Bei 4972 nicht an Diabetes erkrankten Probanden wurden mithilfe des HOMA-IR die Insulinresistenz aus Nüchternblutglukose und Nüchterninsulin bestimmt. (HOMA steht für homeostatic model assessment und IR für Insulinresistenz.) Die mit NMR bestimmten Risikofaktoren VLDL-Größe,

Konzentration von großen VLDL-Partikeln, geringere Größe der LDL-Partikel, mehr kleine LDL-Partikel, geringere HDL-Größe und weniger großes HDL wurden unterschiedlich stark gewichtet und so der LP-IR berechnet. Dieser Index wurde anhand eines anderen Probandenkollektivs einer Studie der Medical University of South Carolina überprüft, bei der die Insulinresistenz mithilfe von Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamps, also durch Insulin- und Glucoseinfusionen bestimmt wurde. (Garvey et al., 2003) Der Index korrelierte mit den beiden Insulinresistenzbestimmungsmethoden. Mit dem Probandenkollektiv von MESA wurde auch prospektiv der Zusammenhang zwischen Lipoproteinen und dem Auftreten von Diabetes untersucht. 5314 nicht an Diabetes oder kardiovaskulär vorerkrankten Erwachsene nahmen an der Studie teil, von denen 656 innerhalb durchschnittlich 7,7 Jahren Diabetes entwickelten. (Mackey et al., 2015) Dabei waren bei den Probanden, die später einen Diabetes mellitus entwickelten, der Lipoprotein-Insulinresistenz-Index, Triglyceride, kleine HDL-Partikel, gesamte und kleine LDL-Partikel, große und mittlere VLDL-Partikel und die durchschnittliche VLDL Größe erhöht. Erniedrigt waren HDL-Cholesterin, gesamte, große und mittlere HDL-Partikel, mittlere HDL Größe und mittlere LDL Größe. Nach Anpassung an mögliche Risikofaktoren wie BMI, Geschlecht, Alter waren LP-IR, erhöhte Konzentration an großen VLDL-Partikeln, erhöhtes kleines LDL, weniger großes HDL, größere durchschnittliche VLDL Größe, kleinere durchschnittliche HDL- und LDL-Größe, HDL-Cholesterin, Triglyceride, Triglyceride zu HDL-Cholesterin, und HOMA-IR mit Diabetes assoziiert.

Eine weitere prospektive Untersuchung zu Lipoproteinen und Diabetes Typ II wurde in der Melbourne Collaborative Cohort Study durchgeführt. (Hodge, Jenkins, English, O'Dea, & Giles, 2009 Jan) 59 von 813 zu Beginn der Studie nicht an Diabetes erkrankten entwickelten in den darauffolgenden Jahren einen Diabetes. Risikofaktoren für Diabetes waren die Zunahme von großen VLDL-Partikeln und eine geringere Größe der HDL-Partikel. Diese waren unabhängig von anderen nicht-Lipid Risikofaktoren, aber nicht von der Plasma-Triglyceridkonzentration. Außerdem wurde ein Faktor gefunden, der positiv mit dem Auftreten von Diabetes korreliert war. Charakterisiert wurde dieser Faktor durch eine verringerte LDL- und HDL-Größe, eine Zunahme an großen, mittleren und gesamten VLDL-Partikeln, eine Zunahme an kleinen LDL-Partikeln und an den gesamten LDL-Partikeln, aber eine Abnahme an großen LDL-Partikeln. Außerdem eine Abnahme an großen HDL-Partikeln und eine

Zunahme an kleinen HDL-Partikeln. Wenngleich der Faktor mit Diabetes korreliert ist, konnte damit das Diabetesrisiko nicht besser abgeschätzt werden als mit der Verwendung von Triglyceridkonzentrationen.

Im Rahmen einer etwas anders aufgebauten Studie ohne Nachbeobachtungszeit wurden 9399 männliche Finnen, basierend auf dem Ergebnis eines oralen Glukosetoleranztests, in Gruppen aufgeteilt. (J. Wang et al., 2012) 4345 hatten eine gestörte Nüchtern glukose, 312 eine gestörte Glukosetoleranz, bei 1058 war sowohl die Nüchtern glukose als auch die Glukosetoleranz auffällig, bei 650 wurde ein Diabetes neu diagnostiziert. Die Konzentration von den Chylomikronen/größtes VLDL, von sehr großen VLDL-Partikeln, großen VLDL-Partikeln, mittleren und kleinen VLDL-Partikeln war in allen Prädiabetes-Gruppen und bei Diabetikern auch nach Anpassung an Risikofaktoren wie Alter, BMI, familiäre Vorbelastung und körperliche Bewegung signifikant erhöht. Nach Anpassung des Modells an Gesamttriglyceride und HDL-Cholesterol, blieben alle VLDL-Gruppen außer der Gruppe der großen VLDL-Partikel signifikant erhöht. Außerdem waren bei Personen mit gestörter Nüchtern glukose, bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz und gestörter Nüchtern glukose und bei Diabetikern kleine LDL-Partikel erhöht, allerdings nicht mehr nach Anpassung an Triglyceride und HDL-Cholesterol. Erniedrigt war bei Personen mit gestörter Glukosetoleranz, bei Personen mit sowohl gestörter Nüchtern glukose als auch gestörter Glukosetoleranz und bei Diabetikern die Konzentration an großen HDL-Partikeln. Außerdem wurde die Korrelation zwischen Insulinsensitivität und Lipoproteinen untersucht. Größeres VLDL und kleine HDL Partikel waren negativ mit Insulinsensitivität korreliert, während sehr große und große HDL Partikel positiv mit Insulinsensitivität korreliert waren.

Eine weitere prospektive Studie war die Studie von Sokooti et al 2021. (Sokooti et al., 2021) Dabei wurden nur die HDL Partikel und ihr Zusammenhang mit Diabetes untersucht. In die Studie eingeschlossen wurden 4828 Teilnehmer Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease (PREVEND) Studie, die zu Beginn noch keinen Diabetes hatten. 265 von ihnen entwickelten während der Nachbeobachtungsphase (circa 7 Jahre) einen Diabetes. Die Probanden wurden in Niederlanden rekrutiert und hatten ein Alter von 28 bis 75 Jahren. Probanden wurden unter folgenden Bedingungen in die Gruppe der Prädiabetiker aufgenommen: Bei einem nüchtern gemessenen Glukosewert von mindestens 126 mg/dL, einem

spontan gemessenen Blutzuckerwert von mindestens 200 mg/dL, Mitteilung eines Probanden über eine ärztlich gestellte Diagnose eines Diabetes, oder wenn durch eine Apotheke eine Einnahme von Antidiabetika mitgeteilt wurde.

Es wurden nur HDL-Partikel untersucht. HDL-Partikel wurden nach Größe in 7 Gruppen von H1P (am kleinsten) zu H7P (am größten) eingeteilt: small HDL, 7.4 to 8.0 nm; medium HDL, 8.1 to 9.5 nm; large HDL, 9.6 to 13 nm; H1P: 7.4 nm; H2P: 7.8 nm; H3P: 8.7 nm; H4P: 9.5 nm; H5P: 10.3 nm; H6P: 10.8 nm; und H7P: 12.0 nm. H1P und H2P wurden zu kleinen HDL zusammengefasst, H3P und H4P zu mittleren HDL und H5P bis H7P zu großem HDL. Ohne Berücksichtigung anderer Parameter waren H1P und die Partikel H3P, H4P, H6P und H7P mit einem geringeren Risiko einen Diabetes zu entwickeln assoziiert, H2P mit einem höheren Risiko. Nach Anpassung von Covarianten (Alter, Geschlecht, Diabetes in der Familie, Alkoholkonsum, Rauchen, BMI, CRP, Bluthochdruck, Einnahme von Lipidsenkern, HOMA-IR (homeostatic model assessment of insulin resistance), LDL-Cholesterin und Triglyceriden) war H4P weiterhin invers und H2P mit einem erhöhten Risiko für Diabetes assoziiert. Außerdem waren bei nicht-übergewichtigen Probanden auch großes HDL und HP6 mit einem geringeren Diabetesrisiko assoziiert.

1.5 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

NMR-Spektroskopie beruht auf der magnetischen Kernresonanz. Dabei handelt es sich um die Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Moment von Atomkernen in einem statischen Magnetfeld und einem hochfrequenten magnetischen Wechselfeld. Im Folgenden werden zuerst einmal die der NMR-Spektroskopie zugrundeliegenden Prinzipien erklärt. Alle Kerne haben eine Spinquantenzahl (I). Diese kann entweder 0 oder ein Vielfaches von $\frac{1}{2}$ sein. Beträgt die Spinquantenzahl nicht 0, bedeutet das, dass diese Kerne einen Drehimpuls P besitzen. Das dadurch induzierte magnetische Moment μ_1 ist abhängig von dem Drehimpuls (P) des Kerns und des magnetogyrischen Verhältnis (γ).

$$\mu_1 = \gamma P \quad (1)$$

Das magnetogyrische Verhältnis ist je nach Kern unterschiedlich und ein Maß dafür, wie magnetisch eine bestimmte Art von Kernen ist, und wie gut sie sich mit NMR-Spektroskopie darstellen lassen. Leider hat das häufig in der organischen Chemie vorkommende Element ^{12}C die Spinquantenzahl $I=0$. Deshalb ist es in der NMR-Spektroskopie unsichtbar. Protonen haben hingegen die Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$, sind

deshalb für die NMR-Spektroskopie wichtig. Bringt man Kerne mit einer Spinquantenzahl ungleich 0 in ein statisches Magnetfeld, werden diese Kerne aufgrund ihres magnetischen Moments von dem äußeren Magnetfeld beeinflusst. Im Koordinatensystem zeigt dieses äußere Magnetfeld klassisch in Richtung der z-Achse, deshalb nennt man die Magnetisierung der Kerne parallel zum äußeren Magnetfeld z-Magnetisierung. Dabei können sie, in Abhängigkeit von ihrer Spinquantenzahl I , nur eine bestimmte Anzahl von Zuständen annehmen. Diese Anzahl von Zuständen beträgt $2I + 1$, also sind beispielsweise für Protonen, deren Spinquantenzahl $\frac{1}{2}$ ist, zwei Zustände, nämlich $+\frac{1}{2}$ und $-\frac{1}{2}$, möglich. Man kann sich dabei vorstellen, dass sich die z-Magnetisierung der Protonen im Magnetfeld entweder parallel (α) oder antiparallel (β) zu den Feldlinien ausrichten kann. Die parallele Ausrichtung ist dabei etwas weniger energiereich. Bringt man deshalb viele Kerne in ein Magnetfeld, werden sich im thermischen Gleichgewicht etwas mehr Kerne im weniger energiereichen Zustand befinden. Das Verhältnis der Anzahl von Kernen in der parallelen Ausrichtung (N_α) zu der Anzahl von Kernen im energiereichen Zustand (N_β) wird durch die Boltzmann Verteilung beschrieben:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (2)$$

ΔE bezeichnet dabei die Energiedifferenz $E_\beta - E_\alpha$ der beiden Zustände im Magnetfeld, T die absolute Temperatur und k_B ist die Boltzmann Konstante.

Wie ein sich drehender Kreisel im Schwerfeld der Erde präzediert, so präzedieren auch die sich drehenden Kerne im statischen Magnetfeld. Dieses Phänomen wird Larmor-Präzession genannt. Die Frequenz f der Larmor-Präzession ist interessant, weil sie gleichzeitig auch eine Resonanzfrequenz des Spins ist: Wird ein elektromagnetisches Wechselfeld mit der gleichen Frequenz eingestrahlt, dann kann der Kern durch Aufnahme dieser Energie in den energiereichen Spinzustand übergehen. Anschließend kann er wieder unter Abgabe dieser Energie in den energieärmeren Spinzustand zurückkehren. Dieser Vorgang nennt sich dann magnetische Kernresonanz (NMR). Die Energie ΔE , die im statischen Magnetfeld \mathbf{B}_0 nötig ist, um von einem Spinzustand mit niedriger Energie in den anderen mit hoher Energie überzugehen, ist:

$$\Delta E = hf = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (3)$$

h ist dabei das Planksche Wirkungsquantum.

Normalerweise sind Kerne von Elektronenhüllen umgeben. Diese schirmen das äußere Magnetfeld \mathbf{B}_0 etwas ab, sodass sich die Kerne eigentlich im effektiven Magnetfeld \mathbf{B}' befinden.

$$\mathbf{B}' = \mathbf{B}_0(1 - \sigma) \quad (4)$$

Dabei ist σ die Abschirmungskonstante. Dadurch verändert sich auch die Resonanzfrequenz f des Spins. Diese Verschiebung der Resonanzfrequenz nennt man chemische Verschiebung δ , weil sie von der chemischen Umgebung eines Kerns abhängt. Normalerweise gibt man sie nicht in Absolutwerten an, sondern relativ zu einer Standardsubstanz in parts per million (ppm). Die Standardsubstanz hat die Abschirmungskonstante σ_s und die Resonanzfrequenz f_s .

$$\delta = \sigma_s - \sigma = \frac{f - f_s}{f_s} \quad (5)$$

Betrachtet man ein aufgenommenes ^1H -NMR Spektrum, so sieht man, dass einige Resonanzlinien aufgespalten sind. Das liegt an der indirekten Spin-Spin-Kopplung. Dabei beeinflussen sich benachbarte Protonen eines Moleküls über ihre bindenden Elektronen, die auch einen Spin besitzen. Die Anzahl der Signale und die relative Intensität folgt der Binomialreihe. Koppelt beispielsweise ein Kern mit 2 weiteren, erkennt man ein Triplett, wobei das Signal in der Mitte doppelt so hoch ist wie die beiden äußeren Signale.

1.6 Zuordnung von Resonanzlinien

Um den Resonanzlinien eines Spektrums die Substanzen zuzuordnen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Weiß man in etwa, welche Stoffe zu erwarten sind und was ihre chemischen Verschiebungen sind, kann man die Resonanzlinien nach ihrer chemischen Verschiebung zuordnen.

Die sicherste Methode, um nachzuweisen, dass eine Resonanzlinie zu einem bestimmten Stoff gehört, ist das *Spiken*. Dabei gibt man den Stoff, von dem man vermutet, dass er zur Resonanzlinie gehört, zur Probe hinzu. Steigt die Intensität der Resonanzlinie, hat man die zugehörige Substanz richtig identifiziert.

Eine weitere Möglichkeit ist die Zuordnung mithilfe von 2D-Spektren. Bei der 1D-Spektroskopie wird das Signal als Funktion der Zeit t_2 registriert und anschließend durch Fourier-Transformation in eine Funktion der Frequenz umgewandelt. Bei der 2D-Spektroskopie wird das Signal als Funktion der Zeiten t_1 und t_2 registriert, sodass

nach Fourier-Transformation das Signal in Abhängigkeit von den Frequenzen f_1 und f_2 dargestellt werden kann. Das Experiment ist in 4 Phasen aufgebaut: Präparation, Evolution (t_1), Mischung und Detektion (t_2). In der Detektionsphase werden, wie bei einem 1D-Experiment, das Signal in Abhängigkeit der Zeit t_2 detektiert. In der Präparationsphase werden die Kerne meist durch einen 90° -Impuls transversalmagnetisiert. Die Dauer der Evolutionsphase wird während des Experiments variiert. Das Spinsystem kann sich dabei entwickeln, indem sich die Spins gegenseitig beeinflussen. Die Mischzeit bleibt während des Experiments konstant und es werden währenddessen weitere Pulse gegeben. Es mischen sich verschiedene Spinzustände. Typische Arten von 2D-Experimenten sind COSY und TOCSY. Beim COSY werden während der Präparationsphase und während der Mischungsphase jeweils ein 90° -Impuls eingestrahlt. So sieht man die Kopplungen von Kernen, die direkt nebeneinanderliegen. Beim TOCSY wird in der Mischungsphase eine Spin-Lock-Sequenz eingestrahlt, die aus mehreren einzelnen Pulsen besteht. Dadurch erkennt man nicht nur die Kopplung von Kernen die direkt nebeneinanderliegen, sondern auch die Kopplungen von Kernen, die einige Bindungen entfernt voneinander liegen. Allerdings lässt sich teilweise nicht sicher bestimmen, wie viele Bindungen zwischen den Kernen liegen. Die Abbildung 1.6.1 zeigt das Kopplungsmuster eines TOCSY Spektrums. Auf der Diagonale liegen die Signale der einzelnen Kerne, wie man sie auch in einem 1D-Spektrum sehen würde. Die anderen Punkte zeigen die Kreuzsignale zwischen den Kernen, wobei schwarz die Kreuzsignale direkt benachbarter Kerne sind und weiß die Kreuzsignale zwischen nicht direkt benachbarten Kernen sind.

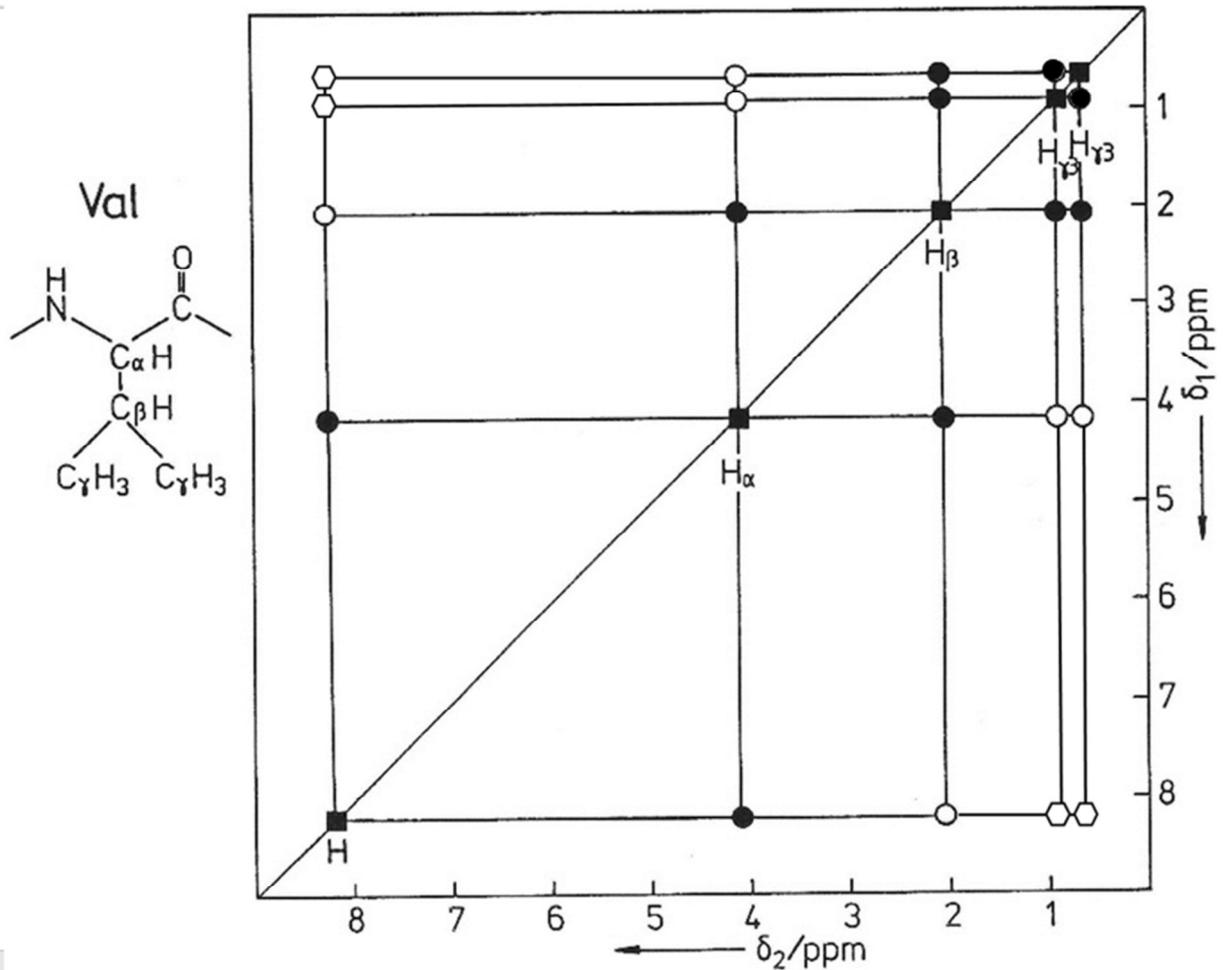


Abb 1.6.1 Schematische Darstellung eines Kopplungsmusters im TOCSY Spektrum eines Valinrestes. Dargestellt werden die zu erwarteten Diagonalpeaks ■, Kreuzsignale zwischen direkt benachbarten Kernen ●, Kreuzsignale zwischen zwei Bindungen voneinander entfernten Kernen ○ und Kreuzsignale zwischen mehr als zwei Bindungen voneinander entfernt liegenden Kernen ◇. Modifiziert nach Hausser und Kalbitzer (1998).

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die in dieser Arbeit ausgewerteten Daten entstanden im Rahmen des Forschungsprojektes „Testmethoden für die Diabetes Früherkennung“ des bayerischen Roten Kreuzes. Dieses Forschungsprojekt wurde durch die bayerische Forschungsstiftung gefördert. Projektpartner waren das Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, das Helmholtz Zentrum München, LipoFIT Analytic GmbH, Metanomics Health GmbH, TOPLAB GmbH, und die Universität Regensburg.

Um unter den Blutspendern an Diabetes oder Prädiabetes erkrankte Probanden für die Studie zu finden, wurde folgendermaßen vorgegangen. Durch das bayerische rote Kreuz wurden im Herbst 2008 an Blutspender ein sogenannter FindRisk Fragebogen verteilt (Bergmann et al., 2007). Dieser Fragebogen dient dazu, das Risiko innerhalb der nächsten 10 Jahre an Diabetes Typ 2 zu erkranken, anhand von Fragen zu Lebensstil, Ernährung, BMI und familiären Risikofaktoren, festzustellen. Bei den Teilnehmern, die aufgrund des Fragebogens ein erhöhtes Risiko aufwiesen, wurde anschließend der HbA1c Wert im Blut gemessen. Dabei handelt es sich um mit Glucose glykiertes Hämoglobin, das als Indikator für die Blutzuckerspiegel der letzten Wochen dienen kann. Bei den Blutspendern mit einem erhöhten HbA1c Wert wurde anschließend ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) durchgeführt, um eine eindeutige Diagnose stellen zu können. Zusätzlich wurde der orale Glukosetoleranztest noch bei einer Kontrollgruppe durchgeführt, damit für die Studie auch die Proben von gesunden Probanden zur Verfügung stehen.

Von den so ausgewählten Probanden wurden anschließend aus der BIOBANK der Blutspender die Rückstellproben der vergangenen Jahre herausgesucht. Die BIOBANK ist ein Proben und Datenarchiv, bei dem sich Blutspender registrieren können. Bei jeder Blutspende muss eine Blutprobe für eventuelle Nachuntersuchungen für mehrere Jahre eingefroren werden. Bei registrierten Spendern werden diese Proben auch nach dieser gesetzlichen Aufbewahrungsfrist weiterhin aufbewahrt und gemeinsam mit medizinischen Hintergrunddaten für Forschungsprojekte verwendet.

Als einer der Forschungspartner wurden die Rückstellproben und die Proben des oralen Glukosetoleranztest dann an die Lipofit GmbH und die Universität Regensburg

verschickt, mithilfe von NMR-Spektroskopie gemessen und die Konzentrationen der Lipoproteine bestimmt.

Die Tabelle 2.1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Daten der Studienteilnehmer. Dabei lag allerdings nicht bei allen Probanden genügend Probenmaterial für die Analyse der Rückstellproben vor oder es gab keine NMR-Nüchternprobe. Die genaue Anzahl an Probanden mit ausgewerteten Proben wird vor der jeweiligen Analyse nochmal dargestellt.

Tabelle 2.1.1 Übersicht der wichtigsten patientenspezifischen Daten der Studienteilnehmer

oGTT	All	Gesund	IFG ^c	IGT ^d	IFG+IGT ^e	T2D ^f
Gruppe	(n =618)	(n =259)	(n =202)	(n =26)	(n =69)	(n =61)
Male	390	142	135	18	46	49
Female	228	117	67	8	23	12
Age [years]	54.1 ± 9.0	52.5 ± 10.3	54.6 ± 7.9	57.2 ± 7.6	55.9 ± 8.0	56.0 ± 6.9
BMI [kg/m ²]	28.6 ± 4.1	27.9 ± 4.0	29.1 ± 3.7	29.4 ± 3.4	30.4 ± 4.3	30.2 ± 4.2
c (t=0) ^a [mg/dL]	103.4 ± 13.5	93.5 ± 4.2	106.7 ± 5.6	95.2 ± 3.9	110.1 ± 6.8	130.6 ± 18.2
c (t=120) ^b [mg/dL]	120.5 ± 44.5	100.6 ± 19.5	105.6 ± 21.4	155.3 ± 14.3	163.7 ± 16.9	207.4 ± 62.8

^aGlucosekonzentration beim oGTT zur Zeit t = 0. ^bGlucosekonzentration beim oGTT zur Zeit t = 120 min. ^cIFG: Gruppe der Probanden mit erhöhter Nüchternblutglukose (impaired fasting glucose); ^dIGT: Gruppe der Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (impaired glucose tolerance); ^eIFG+IGT: Gruppe der Probanden mit einer Kombination aus IFG und IGT; ^fT2D: Gruppe der Probanden mit neu diagnostizierten Diabetes Mellitus Typ II.

2.2 Diagnostik von Glukosetoleranz und Diabetes

Zur Diagnose des Diabetes wurde ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT) durchgeführt. Dazu wurde den nüchternen Probanden zu Beginn die erste Blutprobe abgenommen. Anschließend mussten die Probanden innerhalb von 5min 75g Glucose gelöst in 300ml Wasser trinken. Nach 120min wurde zum zweiten Mal Blut abgenommen. Aus dem venösen Plasma wurde dann die Glucosekonzentration

bestimmt. Daraufhin wurden die Probanden in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die Gruppe der gesunden, nicht an Diabetes erkrankten Probanden hatten sowohl unauffällige Nüchternwerte als auch unauffällige 2h Werte. Die Prädiabetiker wurden in drei Untergruppen aufgespalten: Eine Gruppe mit leicht erhöhter Nüchtern glukose, eine mit erhöhten 2h Wert und eine Gruppe, bei der beide Werte erhöht waren. Bei Diabetikern war mindestens einer der beiden Werte stark erhöht. Die Tabelle 2.2.1 zeigt die genauen Grenzwerte, die zur Einteilung in die Gruppen führten.

Tabelle 2.2.1 Definition der Gruppen der Diabetesstudie mithilfe des oGTT

		Nüchterglukose	Glukosewert nach 2h
Gruppe 1	Gesunde	Unter 100 mg/dL	Unter 140 mg/dL
Gruppe 2	Gestörte Nüchterglukose (IFG)	100 mg/dL bis 125 mg/dL	Unter 140 mg/dL
Gruppe 3	Gestörte Glukosetoleranz (IGT)	Unter 100 mg/dL	140 mg/dL bis 199 mg/dL
Gruppe 4	Gestörte Nüchterglukose und Glukosetoleranz (IFG+IGT)	100 mg/dL bis 125 mg/dL	140 mg/dL bis 199 mg/dL
Gruppe 5	Diabetes (T2D)	über 125 mg/dL und/oder erhöhter 2h-Wert	über 200 mg/dL und/oder erhöhte Nüchtern glukose

2.3 NMR Spektroskopie

Die meisten Proben wurden von Dr. Kristina Lobenhofer im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit gemessen. Für genauere Informationen bezüglich Probenherstellung und Messung sei deshalb auf ihre Arbeit (Lobenhofer, 2014) verwiesen.

2.3.1 NMR-Messungen

Die Proben wurden an einem 600MHz AVANCE II+ BRUKER NMR-Spektrometer mit TXI-Probenkopf und dem automatischen Probenwechsler Sample Jet von BRUKER gemessen. Zu Beginn und Ende jeder Messreihe wurde eine Referenzprobe

gemessen. Tabelle 2.3.1 gibt eine Übersicht über die Messbedingungen. Es wurde ein 1D-NOESY Spektrum und zwei gradienteneditierte Spektren aufgenommen.

Tabelle 2.3.1 Übersicht über die Messparameter der Proben, die von Dr. Lobenhofer während ihrer Dissertation gemessen wurden

Frequenz	600 MHz
Pulsprogramm	Noesyggpr1d
Temperatur	310 K
Vorsättigungszeit	4s
Mixing Zeit	0,01s
FID	32768
Spektrale Breite	20,022 ppm
Anregungspuls p1	90°
Repetitionszeit	5.4 s
Anzahl der Messungen	32
Dummy Messungen	4

Frequenz	600 MHz
Pulsprogramm	Ledbggpr2s1d
Temperatur	310 K
Vorsättigungszeit	4s
Mixing Zeit	0,01s
FID	32768
Spektrale Breite	20,022 ppm
Anregungspuls p1	90°
Echo-Zeit	3 ms
z-Magnetisierungszeit	5 ms
LED-Zeit	5 ms
Anzahl der Messungen	32
Dummy-Messungen	4
Repetitionszeit	2.17 s

Die Messungen, die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt wurden, wurden an einem 800 MHz Neo Avance Bruker NMR-Spektrometer und einem 600 MHz Neo Avance Bruker NMR Spektrometer, unter Verwendung eines 5 mm Cryoprobekopf (TCI), gemessen.

Tabelle 2.3.2 Messparameter der in dieser Arbeit aufgenommenen 1D Spektren

Frequenz	800 MHz
Pulsprogramm	Noesygppr1d
Temperatur	310 K
Vorsättigungszeit	4s
Anzahl der Datenpunkte	64k
Spektrale Breite	20,156 ppm
Anregungspuls p1	90°
Repetitionszeit	6.032s

Tabelle 2.3.3 Messparameter der in dieser Arbeit aufgenommenen 2D Spektren

Frequenz	800 MHz
Pulsprogramm	mlevphpr.2
Temperatur	310 K
Wartezeit	1.5s
Mixing Zeit	80ms
Anzahl der Datenpunkte	16k * 1k
Spektrale Breite	9.7631 ppm
Anzahl der Einzelmessungen	16
Repetitionszeit	2.55 s

2.3.2 Primäre Datenauswertung

Zur Bestimmung der Lipoproteinprofile wurde ein Patent der Firma NUMARES AG verwendet, bei dem die Größen der Partikel über die chemische Verschiebung im NMR Spektrum bestimmt werden. (DE 10 2004 026 903 B4, Verfahren zur Bestimmung von Lipoproteinen in Körperflüssigkeiten und Messanordnung dafür; AU2005250571, Process for the determination of lipoproteins in body fluids;

US7927878, Process for the determination of lipoproteins in body fluids) Tabelle 2.3.2 fasst die Aufteilung der Lipoproteine nach Größen zusammen. Die Primärauswertung der Messungen mithilfe der Software der NUMARES AG wurde von Kristina Lobenhofer vorgenommen.

Tabelle 2.3.2 Übersicht über die Größen, Dichte und Masse der verschiedenen Lipoproteinuntergruppen^a

Subspezies		Partikeldurchmesser Bereich [nm]	Mittlere Partikeldurchmesser [nm]	Mittlere Dichte in g/cm ³	Masse pro nmol in mg
Chylo. [B]	Große Chylomikronen	> 150	150,00	0,9600	59,86
Chylo. [A]	Kleine Chylomikronen	100 - 150	100,00	0,9800	17,74
Chylo. Rem	Chylomikronen Remnants	80 - 100	80,00	1,0000	9,08
VLDL [B]	Großes VLDL	60 - 80	65,00	1,0060	4,87
VLDL [A]	Kleines VLDL	40 - 60	45,00	1,0100	1,62
IDL	IDL	30 - 40	32,00	1,0150	0,58
LDL [E]	Sehr großes LDL	25 - 30	28,00	1,0190	0,39
LDL [D]	Großes LDL	22 - 25	24,50	1,0270	0,26
LDL [C]	Mittleres LDL	21 - 22	22,50	1,0350	0,20
LDL [B]	Kleines LDL	19 - 21	20,50	1,0450	0,15
LDL [A]	Sehr kleines LDL	16 - 19	17,50	1,0600	0,10
HDL [D]	Sehr großes HDL	13 - 16	14,50	1,0630	0,05
HDL [C]	Großes HDL	10 - 13	11,50	1,0900	0,03
HDL [B]	mittleres HDL	8,5 - 10	9,70	1,1200	0,02
HDL [A]	kleines HDL	7 - 8,5	7,30	1,2000	0,01

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programmpakete IBM SPSS Statistics Version 25.0 für Windows und R Version 3.6.1 (R Core Team, 2019) benutzt.

Folgende Statistische Testverfahren wurden angewendet:

Kolmogorov-Smirnov mit Korrektur nach Lilliefors wurde verwendet, um die Normalverteilungsannahme zu überprüfen. Die Nullhypothese des Kolmogorov-Smirnov Tests lautet, dass die Verteilungsfunktion eines kontinuierlichen Merkmals x nicht von der theoretisch erwarteten Funktion abweicht, in diesem Fall der Normalverteilung. Die Alternativhypothese lautet, dass diese Verteilungsfunktion von der erwarteten Verteilung θ_0 abweicht. Die Prüfgröße des Tests ist definiert als das Supremum aller Abweichungsbeträge zwischen der empirischen Verteilungsfunktion $F(x)$ und der Verteilungsfunktion, die man in der Nullhypothese erwarten würde.

$$D_{max} = \max_x |F(x) - \theta_0(x)| \quad (1)$$

Man zieht also die beiden Funktionen voneinander ab und berechnet, was die größte Differenz zwischen den beiden Funktionen ist. Die Nullhypothese muss abgelehnt werden, wenn D_{max} mindestens dem kritischen Wert D_{max}^{krit} entspricht oder drüber liegt. Der Test führt, wenn Populationsmittelwert und Populationsstandardabweichung nicht bekannt sind, mit der ursprünglichen Berechnung von D_{max}^{krit} nicht mehr zu robusten Ergebnissen, sondern wird zu konservativ. Deshalb wird die Korrektur nach Lilliefors angewandt, bei einem Signifikanzniveau von 5% wäre sie beispielsweise $D_{max}^{krit} = \frac{0,819}{\sqrt{n}}$. n ist dabei die Anzahl der Messwerte. (Eid, Gollwitzer, & Schmitt, 2015) Mit diesem Test wurden die Lipoproteinkonzentrationen von Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern zusammen auf Normalverteilung untersucht. Nach Ausreißern wurde mithilfe von Boxplots gesucht.

Der Levene Test wurde verwendet, um die Varianzgleichheit mehrerer Stichproben zu testen: Der Levene Test ist relativ robust gegenüber einer Verletzung der Normalverteiltheit. Bei diesem Test werden die Messwerte x_{mi} mit $i = 1, 2$ so transformiert, dass sie die absoluten Abweichungen von ihrem jeweiligen Stichprobenmittelwert darstellen: $y_{mi} = |x_{mi} - \bar{x}_i|$. Von diesen transformierten Werten berechnet man dann die Stichprobenmittelwerte (\bar{y}_i) und den Mittelwert der gesamten Werte (\bar{y}). Diese Werte werden benötigt, um die Prüfgröße w zu berechnen.

$$w = (n_1 + n_2 - 2) \times \frac{\sum_{i=1}^2 n_i \times (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^2 \sum_{m=1}^{n_i} (\bar{y}_{mi} - \bar{y}_i)^2} \quad (2)$$

Falls die beiden Stichproben stark asymmetrisch verteilt sind, können die Ausgangswerte anstatt mit dem Mittelwert auch mit dem Median transformiert werden. Das nennt sich dann Brown-Forsythe-Test. (Eid et al., 2015)

Der t -Test prüft mithilfe der Mittelwerte der beiden Stichproben, ob sich die Mittelwerte der Grundgesamtheiten, aus denen die Stichproben stammen, unterscheiden.

Dabei ist die Nullhypothese, dass zwei Stichprobenmittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 aus den beiden Populationen $\bar{\mu}_1$ und $\bar{\mu}_2$ stammen, deren Mittelwerte sich nicht unterscheiden, also

$$H_0: \bar{\mu}_1 - \bar{\mu}_2 = 0 \quad (3)$$

Würde man unter dieser Voraussetzung immer wieder Stichproben aus der Grundgesamtheit ziehen und die Differenz der Mittelwerte vergleichen, hätte man als Ergebnis die Zufallsvariabel $E = \bar{X}_1 - \bar{X}_2$, die immer um Null schwanken würde. Nimmt man an, dass E normalverteilt ist und dass keine Kovarianz zwischen den Stichproben vorliegt, wäre die Varianz von E dann

$$\text{Var}(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = \text{Var}(\bar{X}_1) + \text{Var}(\bar{X}_2). \quad (4)$$

Ersetzt man die Varianz mit der quadrierten Standardabweichung s ergibt sich

$$s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}^2 = s_{\bar{X}_1}^2 + s_{\bar{X}_2}^2. \quad (5)$$

Zusätzlich gilt der Zusammenhang zwischen der Standardabweichung des Mittelwerts einer Stichprobenkennverteilung, der Größe n einer Stichprobe und der Standardabweichung der Population s_x :

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s_x^2}{n}} \quad (6)$$

Also gilt

$$s_E = s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n} + \frac{s_2^2}{n}} \quad (7)$$

Weil die Standardabweichung der Population unbekannt ist, muss man sie schätzen, man verwendet dafür eine gepoolte innerhalb Varianz s^2

$$s^2 = \frac{s_1^2 \times (n_1 - 1) + s_2^2 \times (n_2 - 1)}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)} \quad (8)$$

Setzt man diese innerhalb Varianz in der vorherigen Gleichung s_1^2 und s_2^2 ein, erhält man für den Standardfehler s_E der Mittelwertdifferenz $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$:

$$s_E = s_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{s_{\text{inn}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{inn}}^2}{n_2}} \quad (9)$$

Die t -verteilte Prüfgröße ist:

$$T_E = T_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - E(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \quad (10)$$

Wenn die Nullhypothese gilt, ist der Erwartungswert der Mittelwertsdifferenz $E(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) = 0$, deshalb wird der t -Wert:

$$T_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}} \quad (11)$$

Voraussetzungen des t -Tests sind, dass die Werte sowohl innerhalb derselben als auch zwischen den Stichproben unabhängig voneinander sind. Außerdem sollte das Merkmal in beiden Grundgesamtheiten stetig und normalverteilt sein. Die Varianzen der beiden Grundgesamtheiten sollten dabei ebenfalls homogen sein. Bei Verletzungen der Normalverteilungsannahme kann man den t -Test trotzdem anwenden, vorausgesetzt die Stichproben sind groß genug, wobei es da besser ist, wenn die Stichproben zumindest symmetrisch oder gleichsinnig schief sind. In Falle der Varianzheterogenität sollte die Korrektur nach Welch durchgeführt werden. (Eid et al., 2015)

Der U-Test wurde verwendet, um zu prüfen ob sich die Mediane nicht parametrischer Daten signifikant unterscheiden. Die Nullhypothese bei diesem Test ist, dass die Mediane zweier Stichproben gleich sind. Um diese These zu überprüfen werden alle Werte der Größe nach geordnet und so jedem Wert eine Rangnummer zugeteilt. Für beide Stichproben werden jeweils aus diesen Rangnummern eine Rangsumme gebildet. Aus den Rangsummen r_s und den Größen der Stichproben n wird eine Prüfgröße U berechnet.

$u_1 = n_1 \times n_2 + \frac{n_1 \times (n_1 + 1)}{2} - r_{s_1}$ für die erste Stichprobe und $u_2 = n_1 \times n_2 + \frac{n_2 \times (n_2 + 1)}{2} - r_{s_2}$ für die zweite Stichprobe. Diese Prüfgröße berechnet in wie vielen Fällen die Rangplätze der betrachteten Stichprobe von Rangplätzen der anderen Stichprobe überschritten wird. Man nimmt an, dass U normalverteilt ist und wenn die Nullhypothese stimmt, ist der Erwartungswert dieser Prüfgröße $E(U)$

$$E(U) = \frac{n_1 \times n_2}{2} \quad (12)$$

Der Standardfehler s_u wird berechnet mit:

$$s_u = \sqrt{\frac{n_1 \times n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}} \quad (13)$$

Der u-Wert wird dann z-transformiert zu

$$z = \frac{u - E(U)}{s_u} \quad (14)$$

Voraussetzung ist Homoskedastizität, also eine Homogenität der Varianzen. Falls die Stichprobengrößen sich stark unterscheiden, wird der Test konservativer.

Kerndichteschätzer werden verwendet, um Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu glätten: während ein Histogramm aus Balken besteht, ist ein Kerndichteschätzer stetig. Dafür legt man unter jeden Punkt eine Kernfunktion, zum Beispiel einen Gaußkern. Anschließend werden an jedem Punkt die dort anfallenden Werte addiert. Die Summe wird durch die Anzahl der Kerne beziehungsweise der Messwerte geteilt. Dadurch wird die Fläche unter dem Kernschätzer 1. Je breiter die Bandbreite der Kerne gewählt ist, desto mehr überlappen sich die Kerne und desto gleichmäßiger wird der Kerndichteschätzer, eine schmalere Bandbreite führt zu einer sehr ungleichmäßigen Verteilung mit vielen Ausschlägen.

3 Ergebnisse

3.1 Zuordnung der Signale im NMR-Spektrum

Die verschiedenen Signale im 1D-Spektrum von EDTA-Plasma wurden mithilfe von bekannten chemischen Verschiebungen zugeordnet. Anschließend wurde die Zuordnung mithilfe eines 2D Spektrums überprüft. Für die Zuordnung der Peaks wurden vor allem Veröffentlichungen, sowie teilweise Dissertationsschriften verwendet. (Baumstark et al., 2019; Lobenhofer, 2014; Mickiewicz B.; Pehlke-Rimpf, 1993)

Die Abbildungen 3.1.1 bis 3.1.7 zeigen eine Zuordnung der Peaks über die verschiedenen ppm Bereiche eines Plasmaspektrums.

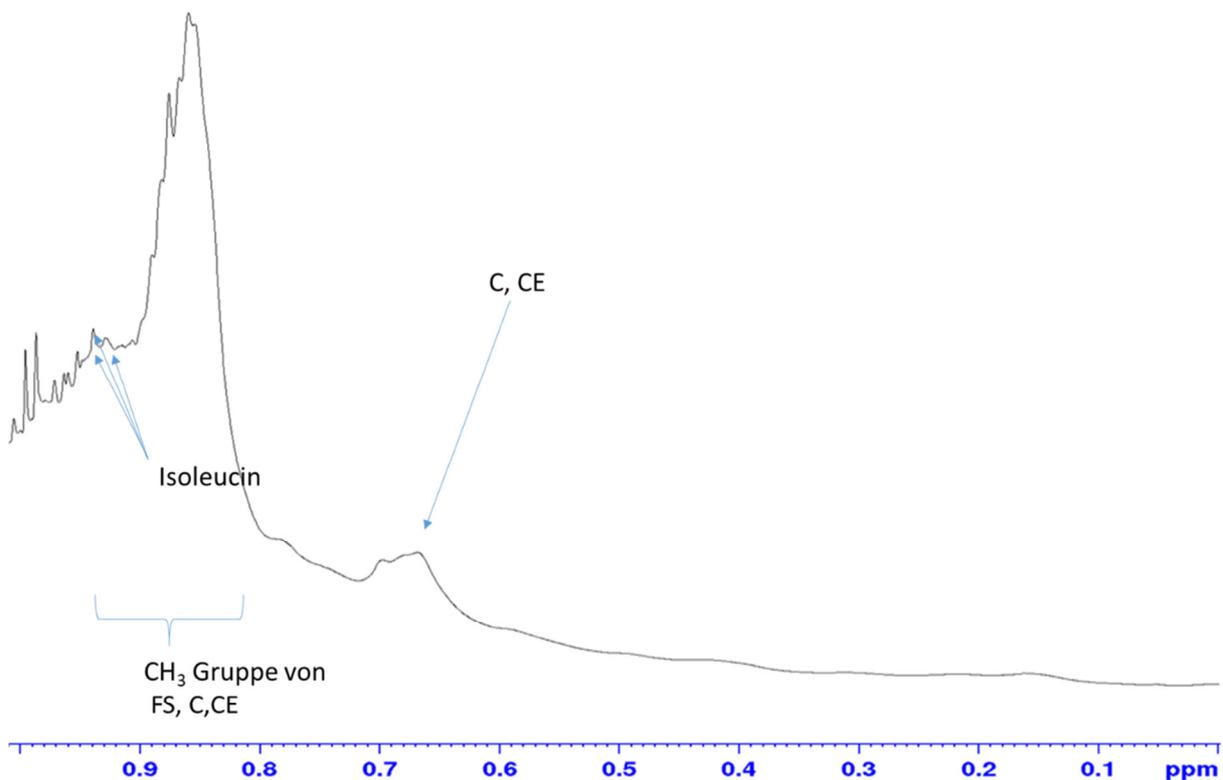


Abbildung 3.1.1. 1D Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 0 ppm bis 1 ppm. FS: Fettsäuren; C: Cholesterin; CE: Cholesterinester

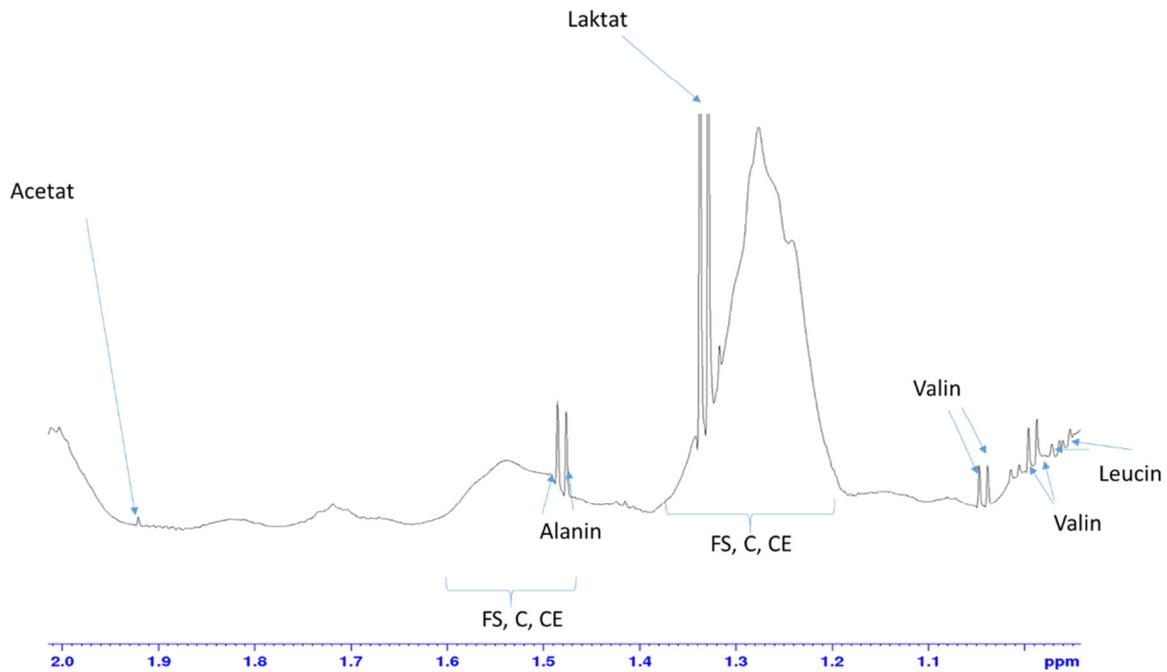


Abbildung 3.1.2. 1D Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 1 ppm bis 2 ppm. FS: Fettsäuren; C: Cholesterin; CE: Cholesterinester

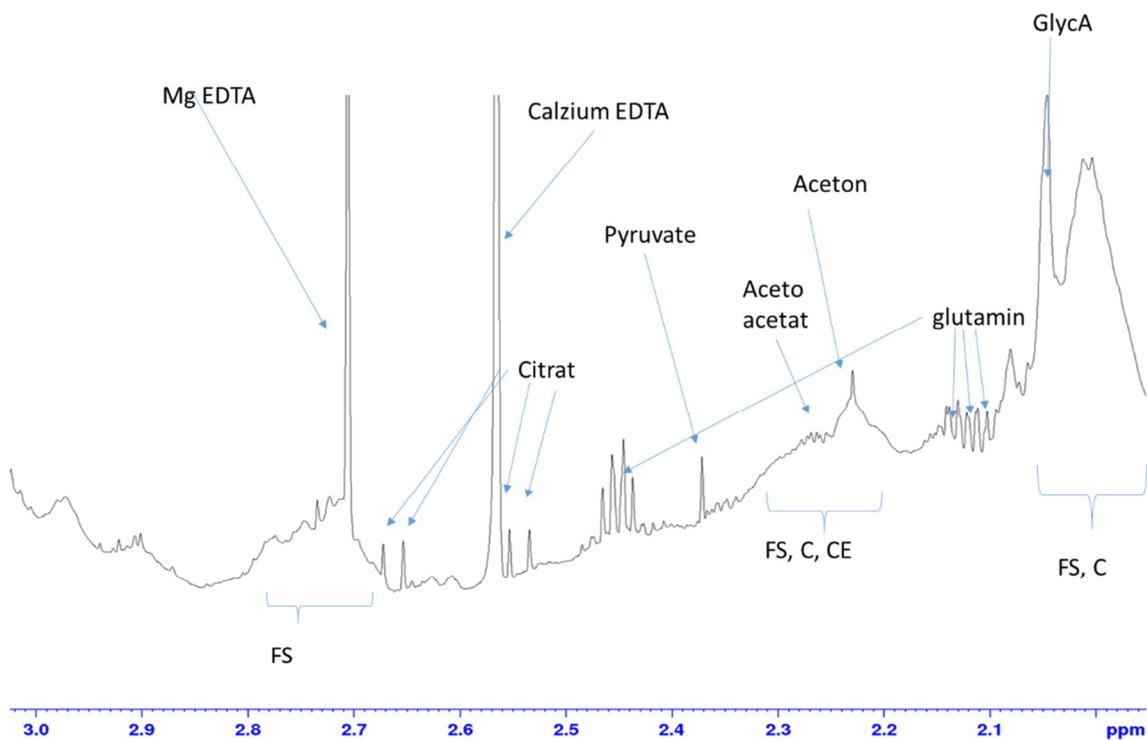


Abbildung 3.1.3. 1D Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 2 ppm bis 3 ppm. FS: Fettsäuren; C: Cholesterin; CE: Cholesterinester; GlycA: N-Acetyl-glucosamin-Gruppen von verschiedenen Akute-Phase-Proteinen (Otvos et al., 2015).

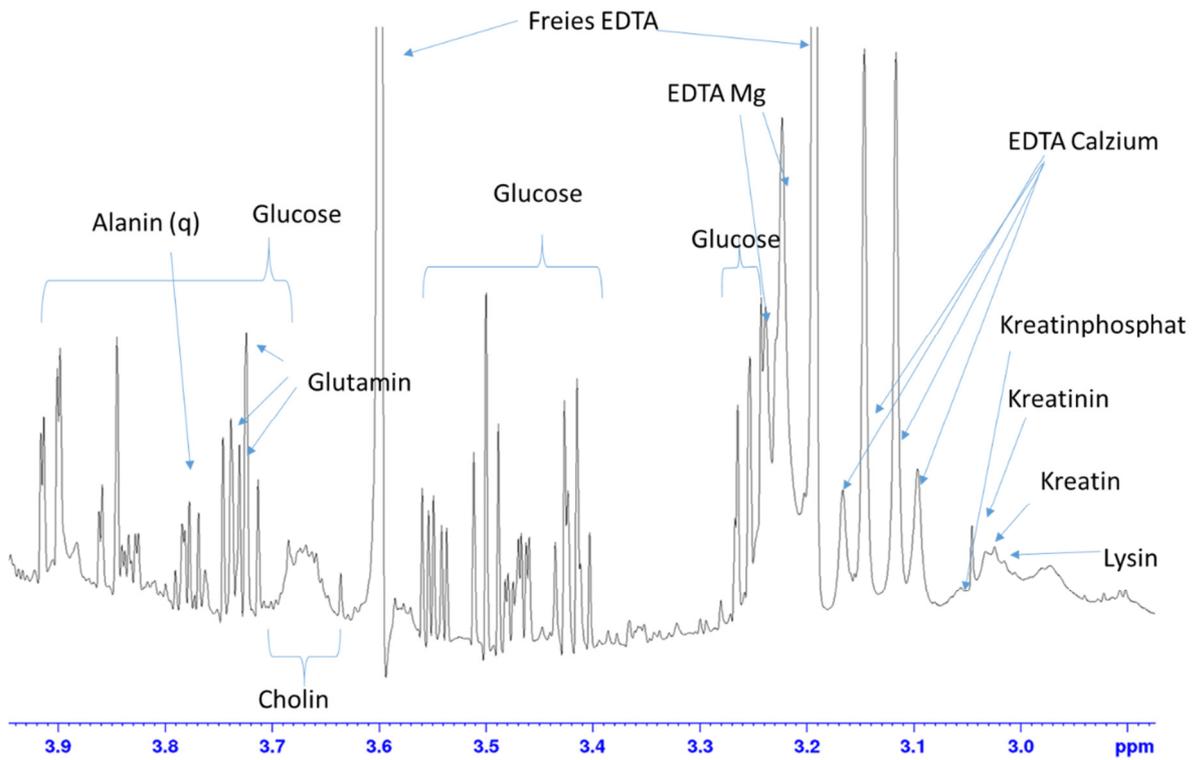


Abbildung 3.1.4. 1D-Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 3 ppm bis 4 ppm.

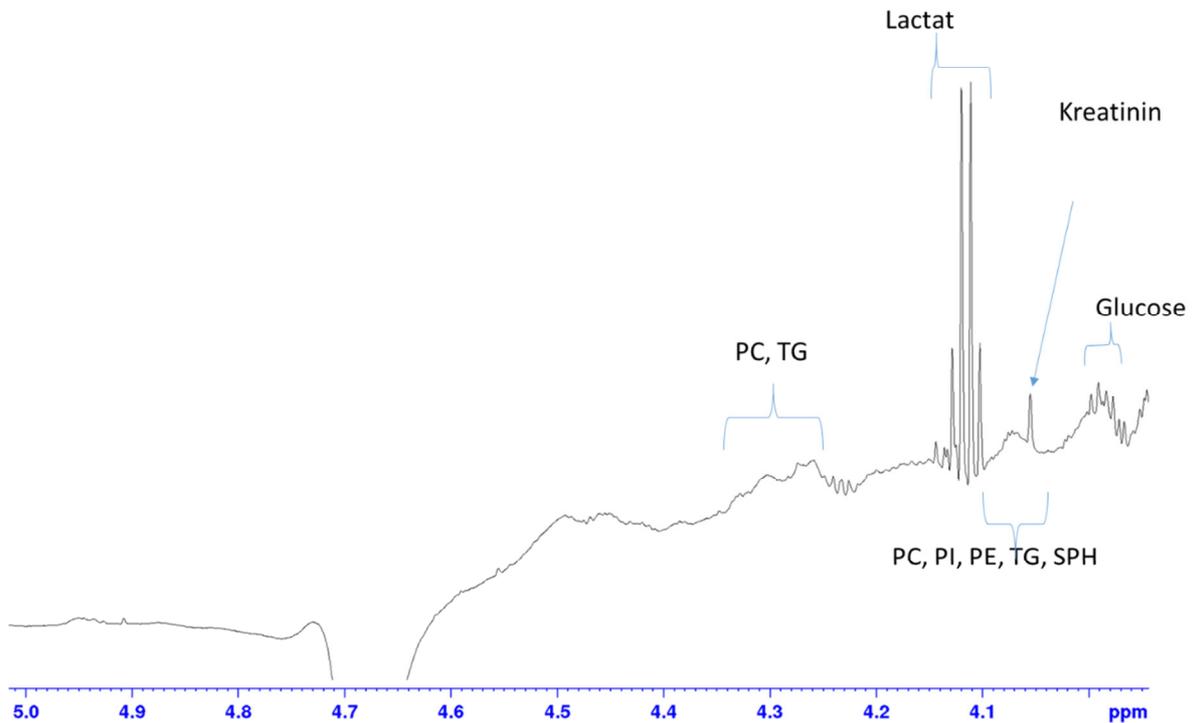


Abbildung 3.1.5. 1D Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 4 ppm bis 5 ppm. PC: Phosphatidylcholin; PI: Phosphatidylinositol; PE: Phosphatidylethanolamin; TG: Triglycerid; SPH: Sphingosin.

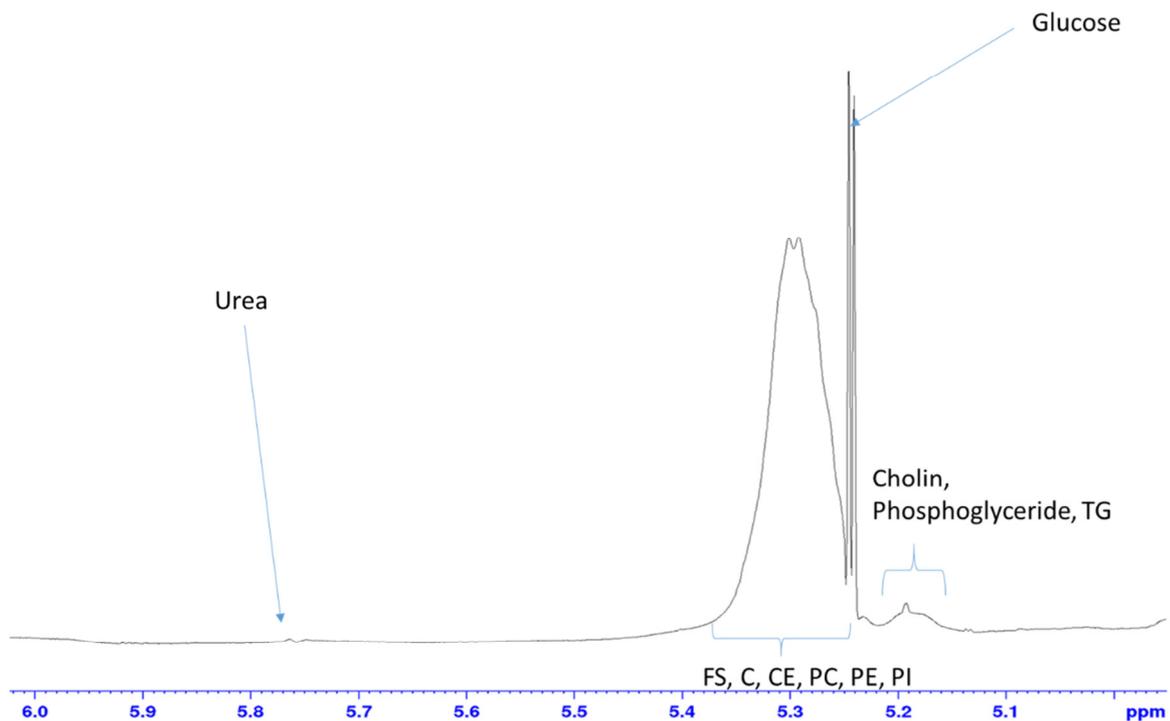


Abbildung 3.1.6. 1D-Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 5 ppm bis 6 ppm. PC: Phosphatidylcholin; PI: Phosphatidylinositol; PE: Phosphatidylethanolamin; TG: Triglycerid; C: Cholesterin; CE; Cholesterinester; FS: Fettsäure

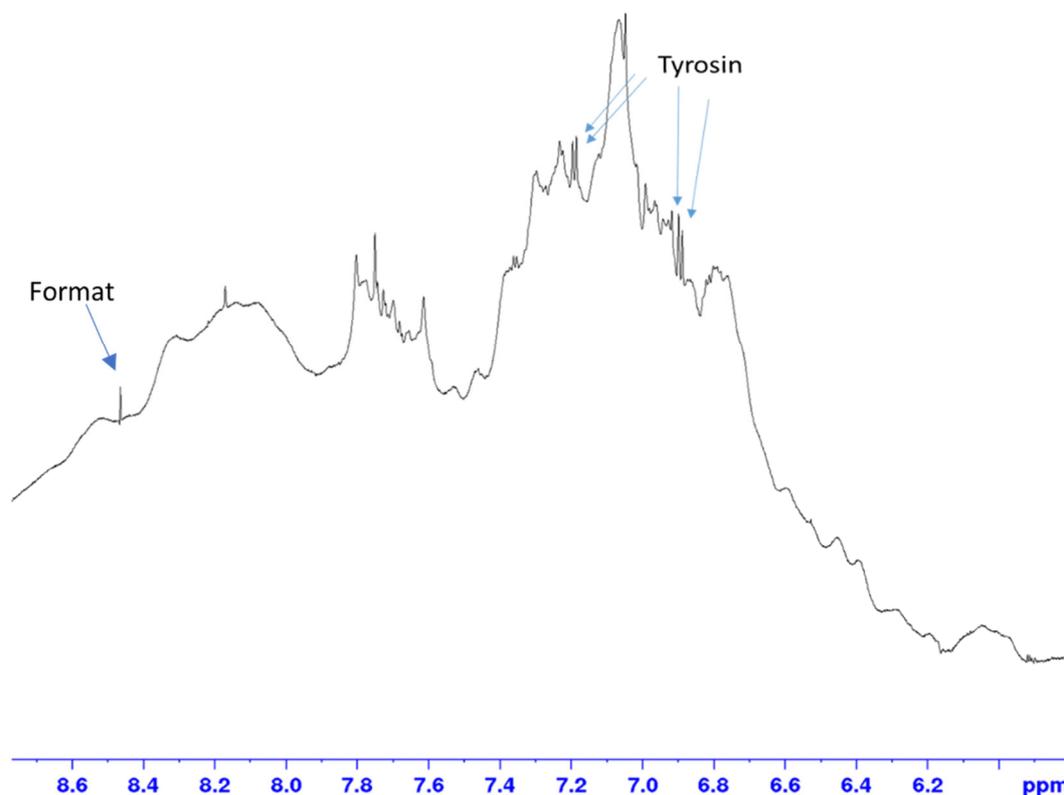


Abbildung 3.1.7. 1D-Spektrum einer EDTA-Plasma Probe von 6 ppm bis 8.75 ppm

Wenn möglich wurde die Richtigkeit der zugeordneten Peaks im 1D Spektrum mithilfe von 2D Spektren belegt. Abbildung 3.1.8 zeigt ein 2D Übersichtsspektrum über die Lipide und die, auf dieser Ebene sichtbaren, kleineren Metaboliten. Cholesterin und Cholesterinester konnten nicht sicher identifiziert werden, da die Kopplungssignale, an denen sie nicht von Fettsäuren überlagert werden, zu schwach sind.

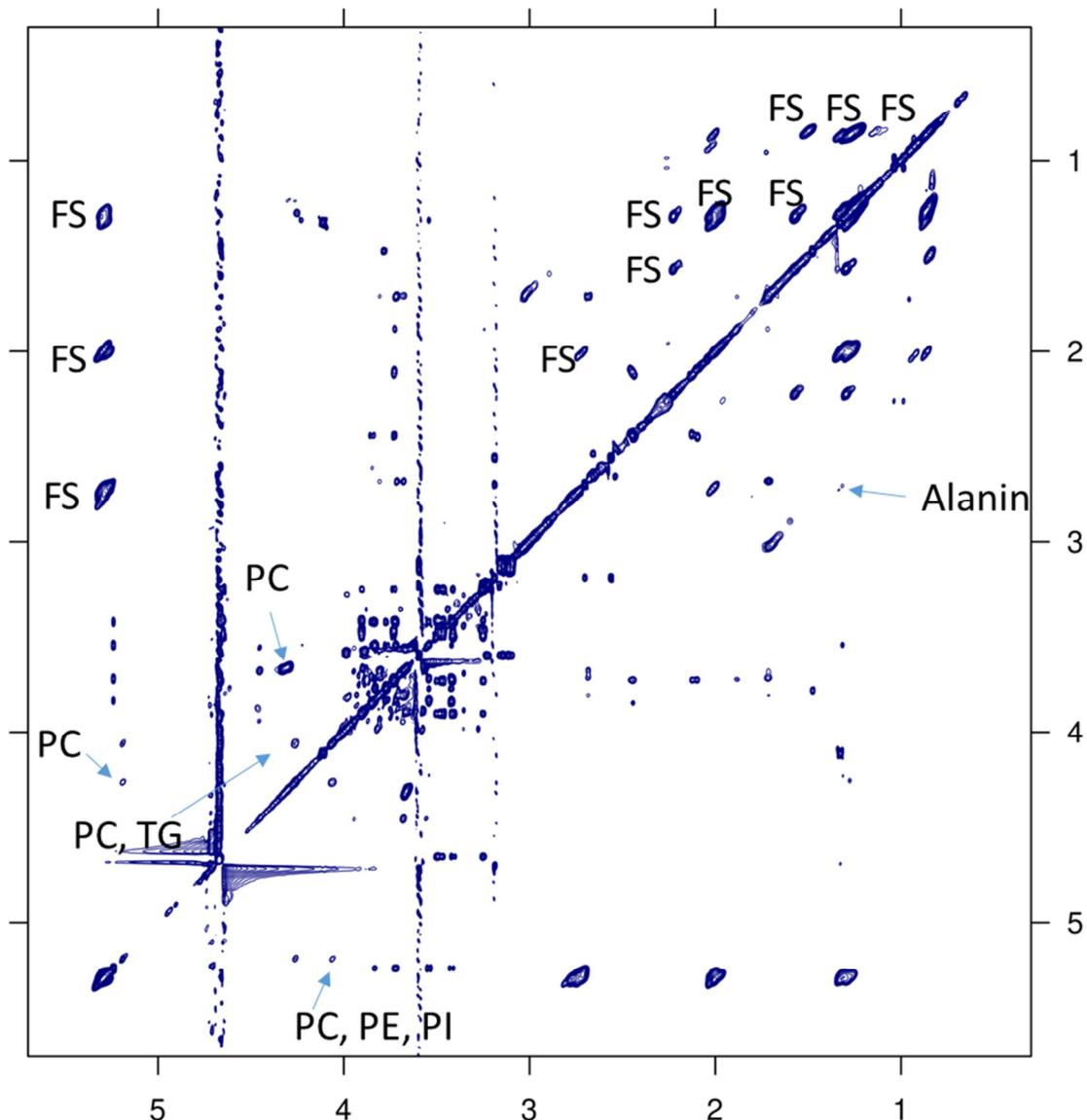


Abbildung 3.1.8 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. PC: Phosphatidylcholin; PI: Phosphatidylinositol; PE: Phosphatidylethanolamin; TG: Triglycerid; FS: Fettsäure

Abbildungen 3.8.9 bis 3.8.15 zeigen Ausschnitte des 2D Spektrums, um Signale, die auf dem Übersichtsspektrum nicht erkennbar sind, darzustellen.

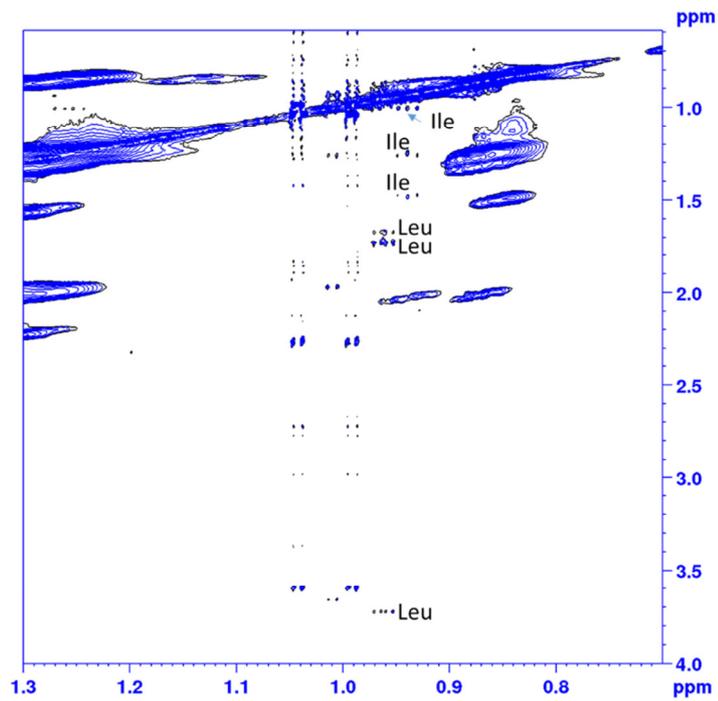


Abb 3.1.9 2D Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet sind Isoleucin (Ile) und Leucin (Leu)

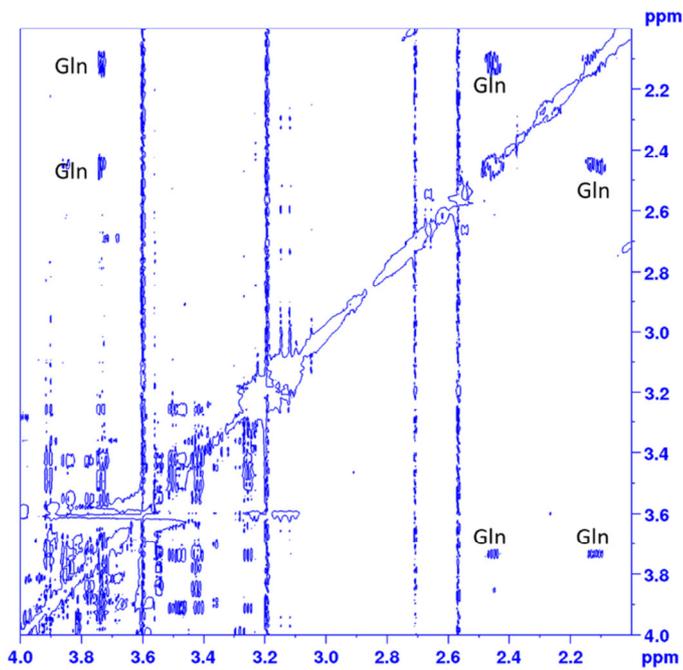


Abb 3.1.10 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet Glutamin (Gln)

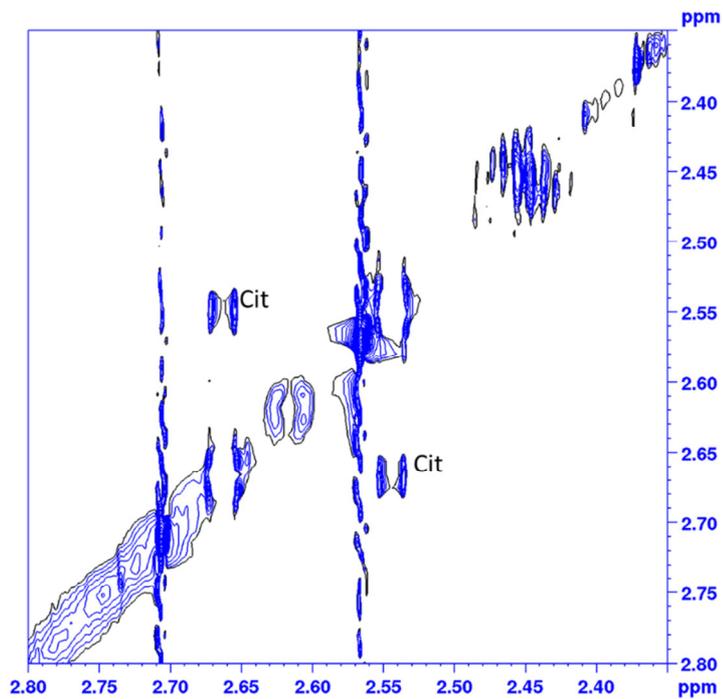


Abb 3.1.11. 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet ist Citrat (Cit)

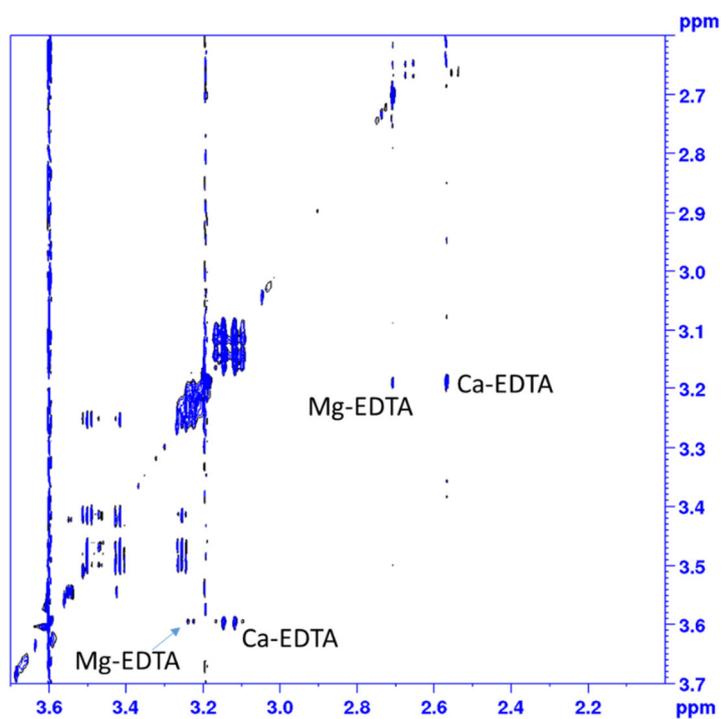


Abb 3.1.12. 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet sind Kalzium-EDTA und Magnesium-EDTA

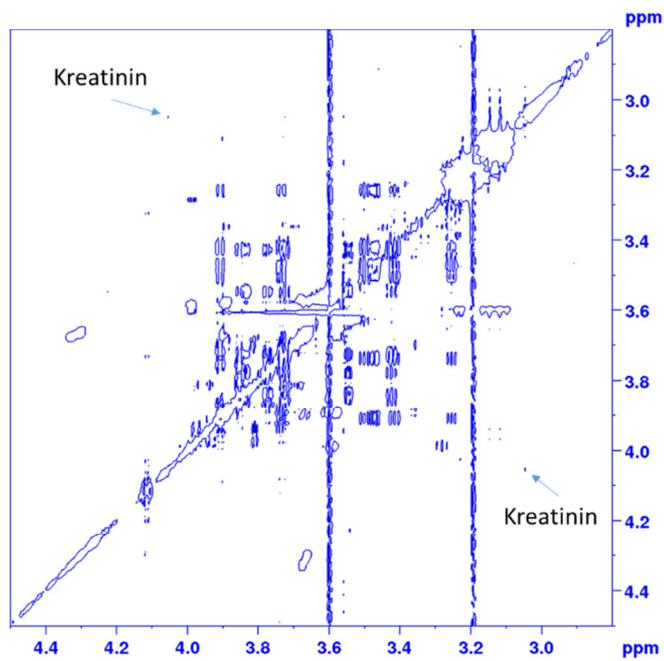


Abb 3.1.13. 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet ist Kreatinin

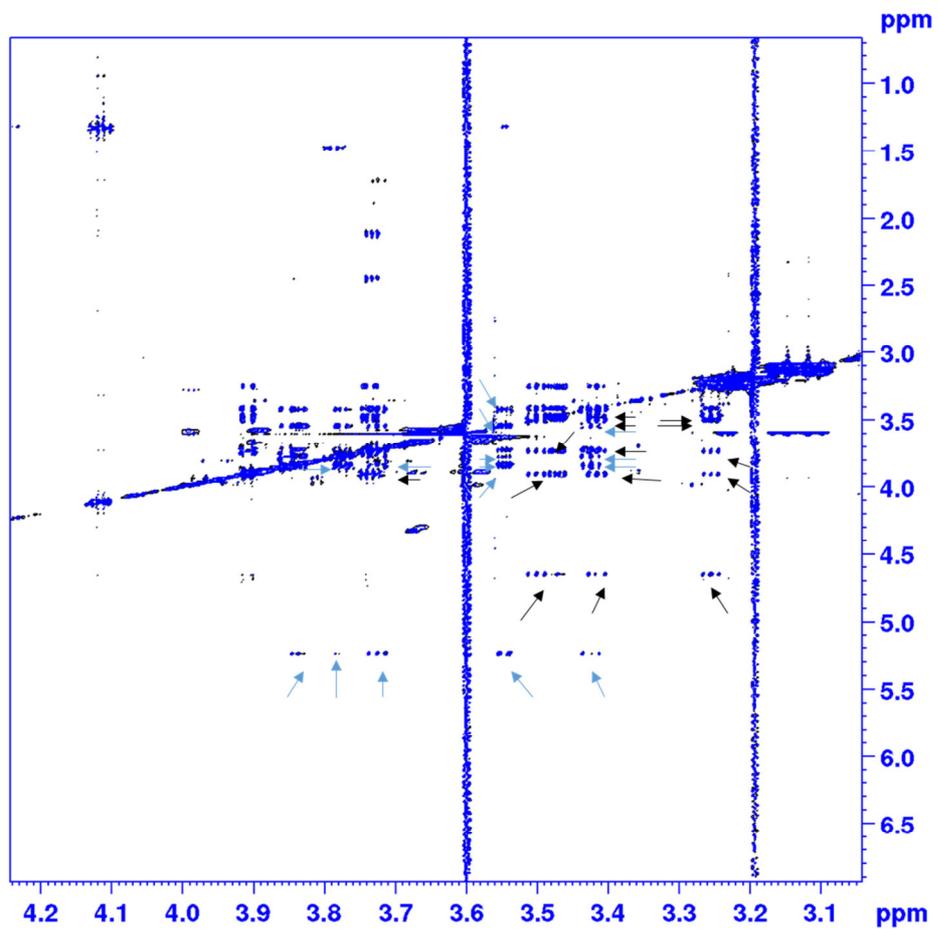


Abbildung 3.1.14. 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet sind alpha-D-Glucose (blaue Pfeile) und beta-D-Glucose (schwarze Pfeile). Wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit liegen die Signale nah beieinander.

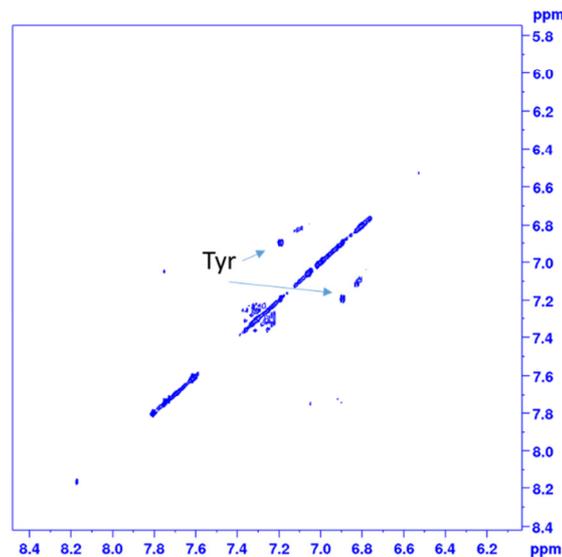


Abbildung 3.1.15. 2D-Spektrum von EDTA-Plasma. Eingezeichnet ist Tyrosin (Tyr)

3.2 Berechnung des Zeitverlaufs aus Rückstellproben

Die Probanden waren unterschiedlich häufig zu unterschiedlichen Zeitpunkten beim Blutspenden. Bei jeder Blutspende wurde eine Rückstellprobe in der BIOBANK der Blutspender aufbewahrt. Somit stand bei jedem Probanden eine unterschiedliche Anzahl an in den letzten Jahren erhaltenen Rückstellproben zur Verfügung. Die Lipoproteinkonzentrationen wurden nach der Zeit graphisch aufgetragen. Dabei fiel auf, dass sich die Verläufe fast immer gut mit einer Geraden fitten lassen. Von diesen Geraden wurde die Steigung und der Wert bei $t=0$ also zum Zeitpunkt des oGTT Test und somit zum Zeitpunkt der Diagnosestellung für die statistische Auswertung verwendet:

Die Steigung der Gerade ist dabei die relative Veränderung in den Jahren vor Diagnosestellung und kann so zeigen welche Veränderungen der Lipoproteinkonzentrationen bei Fortschreiten des Diabetes auftraten.

Indem der Wert der Gerade bei $t=0$ für die weitere statistische Auswertung verwendet wird, werden so alle Proben benutzt, damit der Wert weniger schwankt und unabhängiger von äußeren Faktoren ist, wie beispielsweise der letzten Mahlzeit oder der Tageszeit.

In den folgenden Abbildungen sieht man beispielhaft den Verlauf der Lipoproteinkonzentration über die Zeit eines Diabetikers. Dabei fällt auf, dass es zwar starke Schwankungen gibt, aber auch ein klarer linearer Trend erkennbar ist.

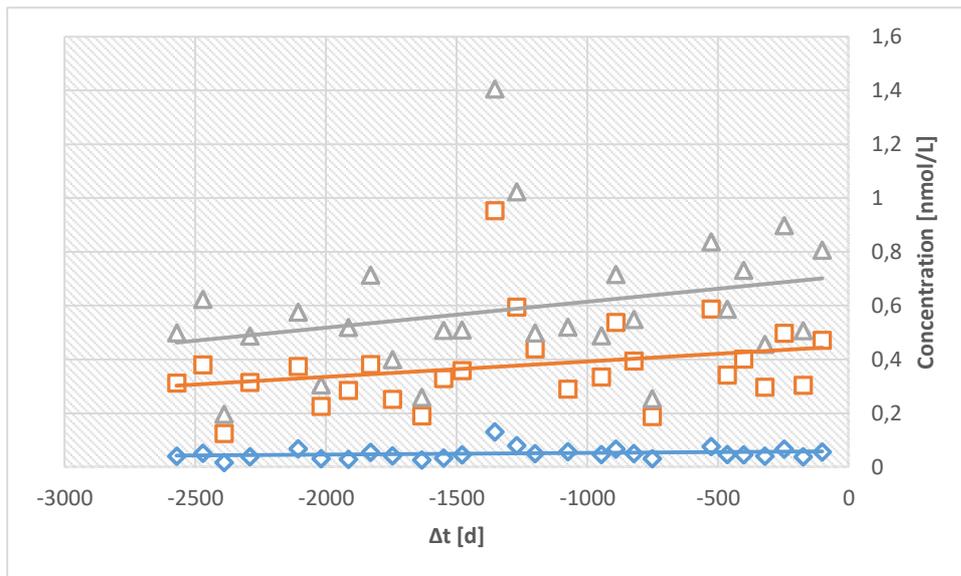


Abbildung 3.2.1. Konzentrationen von (◇) Chylo B, (□) Chylo A, (△) Chylo Remnants eines Diabetikers in nmol/L; Δt [d]: Zurückliegende Zeit seit Diagnosestellung (oGTT) in Tagen

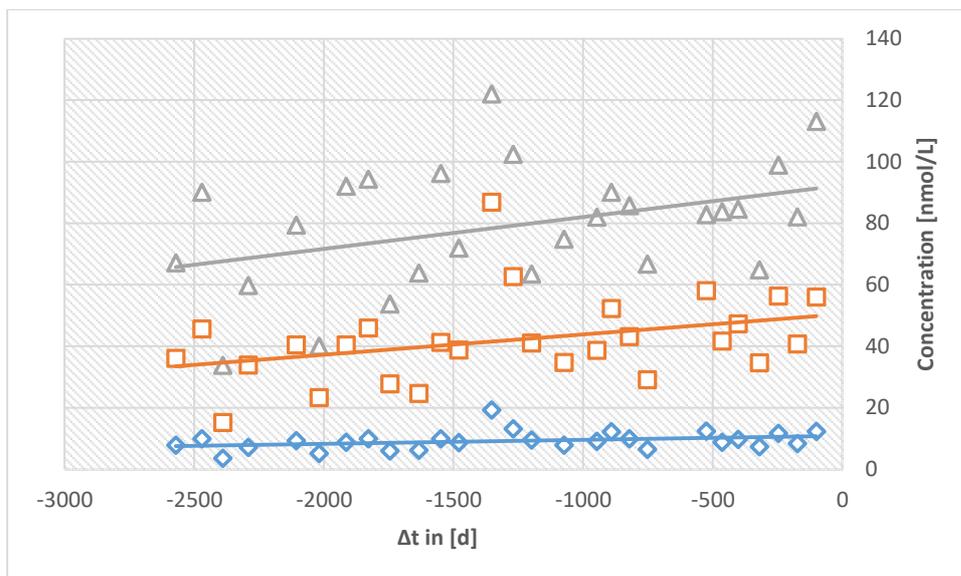


Abbildung 3.2.2. Konzentrationen von (◇) VLDL B, (□) VLDL A, (△) IDL eines Diabetikers in nmol/L; Δt [d]: Zurückliegende Zeit seit Diagnosestellung (oGTT) in Tagen

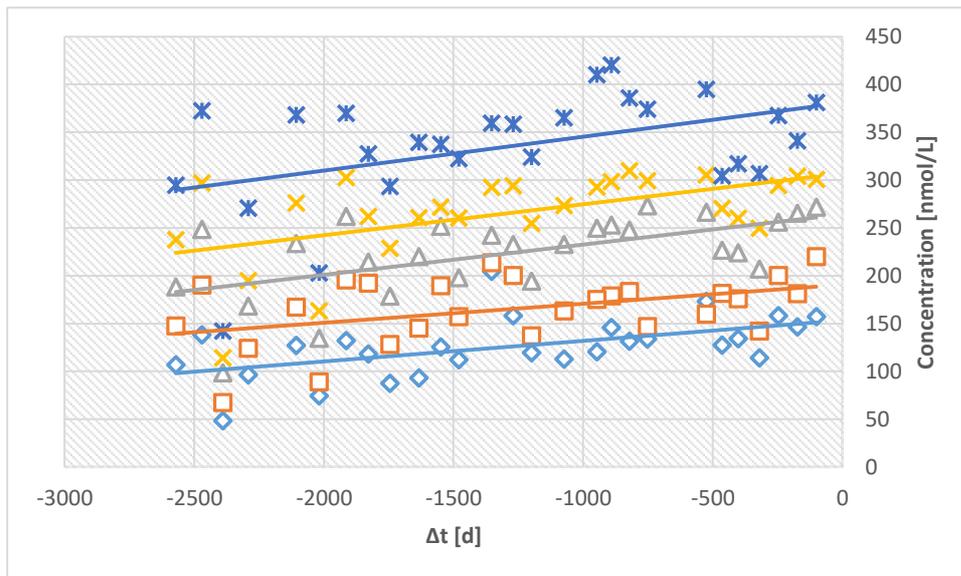


Abbildung 3.2.3. Konzentrationen von (\diamond) LDL E, (\square) LDL D, (\triangle) LDL C, (\times) LDL B, (\ast) LDL A eines Diabetikers in nmol/L; Δt [d]: Zurückliegende Zeit seit Diagnosestellung (oGTT) in Tagen

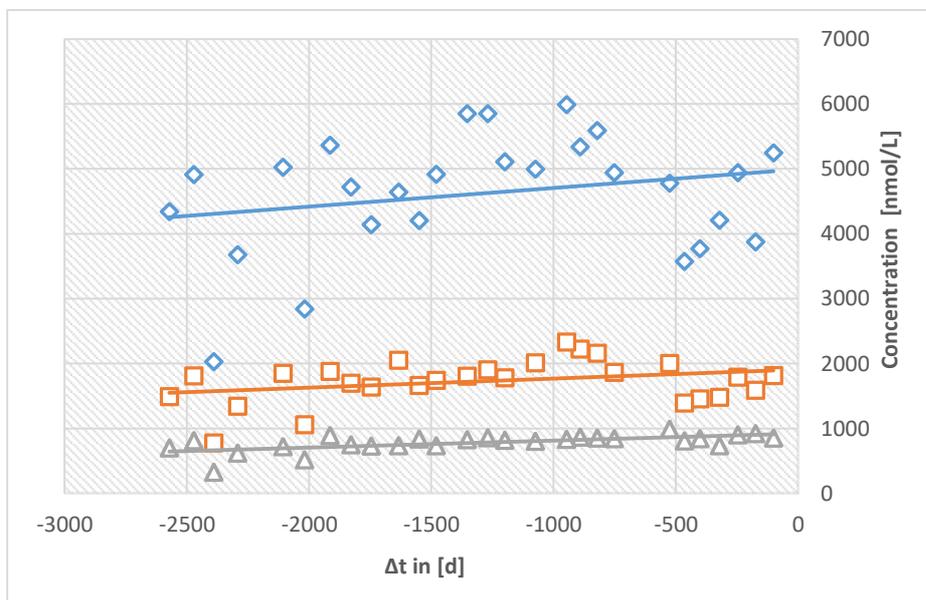


Abbildung 3.2.4. Konzentrationen von (\diamond) HDL B, (\square) HDL C, (\triangle) HDL D eines Diabetikers in nmol/L; Δt [d]: Zurückliegende Zeit seit Diagnosestellung (oGTT) in Tagen

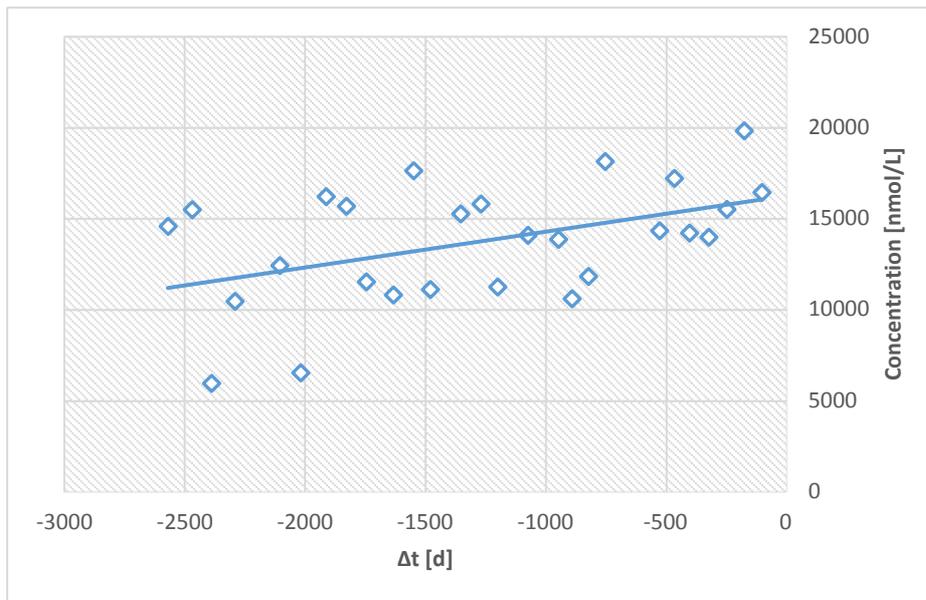


Abbildung 3.2.5. Konzentrationen von (◇) HDL A eines Diabetikers in nmol/L; Δt [d]: Zurückliegende Zeit seit Diagnosestellung (oGTT) in Tagen.

3.3 Vergleich der aus den Rückstellproben berechneten Werte für den Zeitpunkt der Diagnosestellung mit den Nüchternwerten

Wie in Abschnitt 3.2 erklärt, wurde der Zeitverlauf der Rückstellproben mit Geraden gefittet. Mithilfe dieser Geraden wurden Lipoproteinkonzentrationen für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests, also der Diagnosestellung, berechnet. Diese Werte werden in Tabelle 3.3.1 mit Konzentrationen aus den im Rahmen des oGTTs abgenommenen Nüchternblutproben verglichen. An dieser Tabelle erkennt man, dass die Nüchternwerte und die aus den Rückstellproben berechneten Werte recht ähnlich sind und immer innerhalb der Standardabweichung. Die Standardabweichung selbst ist meistens bei den aus den Rückstellproben berechneten Werten kleiner.

Table 3.3.1 Vergleich der Lipoproteinkonzentrationen, die nüchtern und ohne Nahrungseinschränkung erhalten wurden.^a

		Gesunde	IFG	IGT	IFG + IGT	T2D
N_f		196	167	21	29	19
N_{nf}		251	193	26	68	57
Lipoprotein	Nüchtern/ Nicht-nüchtern	c [nM]				
HDL A (7 – 8.5 nm)	Nüchtern	16628±2839	16885±2939	16725±2658	17107±2445	17408±2776
	Nicht-nüchtern	16963±3320	17362±2777	16799±2420	17285±2251	18014±2454
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	2	2.8	0.4	1	3.5

HDL B (8.5 – 10 nm)	Nüchtern	4688±1451	4247±1331	4586±1692	4724±1530	4218±1123
	Nicht-nüchtern	4623±1442	4501±1267	4479±1778	4779±1493	4390±1156
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-1.4	6	-2.3	1.2	4.1
HDL C (10 – 13 nm)	Nüchtern	2445±903	2106±695	2309±1086	2259±612	2004±593
	Nicht-nüchtern	2407±827	2270±749	2300±1049	2263±614	2085±565
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-1.6	7.8	-0.4	0.2	4.1
HDL D (13 – 16 nm)	Nüchtern	1159±206	1111±170	1184±228	1174±183	1125±147
	Nicht-nüchtern	1154±193	1158±176	1193±235	1170±155	1149±162
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-0.5	4.2	0.7	-0.3	2.1
HDL total (7 – 16 nm)	Nüchtern	24921±3488	24349±3423	24805±3272	25265±2840	24754±3003
	Nicht-nüchtern	25147±3874	25290±3234	24771±3104	25498±2947	25638±3128
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.9	3.9	-0.1	0.9	3.6
Apo-A1_{NMR}^b	Nüchtern	49842±6976	48698±6845	49611±6543	50529±5679	49508±6006
	Nicht-nüchtern	50294±7749	50581±6468	49543±6207	50996±5893	51276±6255
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.9	3.9	-0.1	0.9	3.6
LDL A (16 – 19 nm)	Nüchtern	469.2±127.2	426.4±97.6	469.6±172.6	455.1±81.2	395.1±97.6
	Nicht-nüchtern	465.5±118.5	449.9±105.7	461.4±174.8	452.0±87.9	420.7±86.3
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-0.8	5.5	-1.7	-0.7	6.5
LDL B (19 – 21 nm)	Nüchtern	370.0±74.3	354.3±61.0	375.2±85.6	374.5±59.8	339.1±59.0
	Nicht-nüchtern	369.4±72.2	367.3±66.0	374.2±89.8	371.1±57.4	358.8±59.1
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-0.2	3.7	-0.3	-0.9	5.8
LDL C (21 – 22 nm)	Nüchtern	328.5±66.5	314.9±56.4	331.2±78.5	328.6±54.5	296.2±63.4
	Nicht-nüchtern	329.9±70.1	323.0±64.7	326.7±82.9	324.6±53.9	311.5±55.9
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.4	2.6	-1.4	-1.2	5.1
LDL D (22 – 25 nm)	Nüchtern	221.3±48.7	216.9±45.1	225.0±54.2	229.0±51.1	205.1±53.7
	Nicht-nüchtern	223.6±57.1	223.1±47.1	227.5±59.1	224.0±47.1	219.2±47.0
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	1	2.8	1.1	-2.2	6.9
LDL E (25 – 30 nm)	Nüchtern	175.6±41.9	180.3±41.0	185.4±35.7	196.6±58.0	169.8±44.1
	Nicht-nüchtern	177.6±53.2	183.2±46.1	187.6±38.2	191.5±45.3	188.8±47.8
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	1.1	1.6	1.2	-2.6	11.2
LDL total (16 – 30 nm)	Nüchtern	1564.7±328.1	1492.9±273.4	1586.4±406.0	1583.7±266.8	1405.2±286.3
	Nicht-nüchtern	1566.0±336.1	1546.5±301.0	1577.2±423.9	1563.1±262.4	1498.8±271.7
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.1	3.6	-0.6	-1.3	6.7
IDL (30 – 40 nm)	Nüchtern	83.41±20.95	84.43±20.27	83.41±19.31	91.8±28.37	78.71±23.38
	Nicht-nüchtern	84.87±27.24	85.67±21.48	86.58±19.4	88.13±21.97	86.57±22.98
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	1.8	1.5	3.8	-4	10

VLDL A (40 – 60 nm)	Nüchtern	42.93±13.76	45.08±13.79	45.22±12.18	51.88±23.09	43.17±15.54
	Nicht-nüchtern	43.33±17.74	45.98±14.42	48.03±11.93	49.4±15.7	48.95±16.87
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.9	2	6.2	-4.8	13.4
VLDL B (60 – 80 nm)	Nüchtern	9.92±3.22	10.32±3.26	10.1±3.03	12.28±6.02	9.35±3.23
	Nicht-nüchtern	10.06±4.34	10.5±3.42	10.74±2.68	11.35±3.61	11.19±4.11
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	1.4	1.7	6.3	-7.6	19.7
IDL and VLDL (30 – 80 nm)	Nüchtern	136.26±37.08	139.83±36.48	138.72±33.32	155.95±56.55	131.22±40.77
	Nicht-nüchtern	138.27±48.51	142.15±38.65	145.35±32.75	148.88±40.54	146.71±43.34
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	1.5	1.7	4.8	-4.5	11.8
Apo-B100_{NMR}^b	Nüchtern	1700.9±352.0	1632.7±300.9	1725.1±431.3	1739.6±310.7	1536.4±318.3
	Nicht-nüchtern	1704.2±372.0	1688.6±329.4	1722.6±449.1	1712.0±294.3	1645.5±306.3
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0.2	3.4	-0.1	-1.6	7.1
CM Re (80 – 100 nm)	Nüchtern	0.66±0.28	0.7±0.28	0.7±0.25	0.86±0.52	0.68±0.33
	Nicht-nüchtern	0.66±0.35	0.73±0.28	0.77±0.23	0.8±0.33	0.78±0.34
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0	4.3	10	-7	14.7
CM A (100 – 150 nm)	Nüchtern	0.42±0.17	0.44±0.18	0.43±0.16	0.56±0.35	0.4±0.17
	Nicht-nüchtern	0.42±0.23	0.45±0.18	0.47±0.14	0.51±0.2	0.5±0.23
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0	2.3	9.3	-8.9	25
CM B (> 150 nm)	Nüchtern	0.075±0.039	0.079±0.04	0.076±0.041	0.109±0.083	0.066±0.041
	Nicht-nüchtern	0.073±0.051	0.082±0.038	0.0810±0.030	0.095±0.046	0.088±0.048
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	-2.7	3.8	6.6	-12.8	33.3
CM total (80 – 430 nm)	Nüchtern	1.15±0.48	1.22±0.49	1.21±0.45	1.53±0.94	1.14±0.54
	Nicht-nüchtern	1.15±0.62	1.26±0.49	1.32±0.38	1.41±0.57	1.37±0.61
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0	3.3	9.1	-7.8	20.2
Apo-B48_{NMR}^b	Nüchtern	1.15±0.48	1.22±0.49	1.21±0.45	1.53±0.94	1.14±0.54
	Nicht-nüchtern	1.15±0.62	1.26±0.49	1.32±0.38	1.41±0.57	1.37±0.61
	$\Delta_{C_{nf-f}}$ [%]	0	3.3	9.1	-7.8	20.2

^aNomenklatur der Lipoproteine siehe Materialien und Methoden (Kap. 2.3.2). Der Mittelwert \pm der Standardabweichung der Konzentrationen ist dargestellt. Die Nüchternwerte wurden aus den NMR-Spektren berechnet, die vor der oGTT Bestimmung aufgenommen wurden. Die Nicht-Nüchtern-Werte wurden durch Extrapolation der Rückstellproben für die Zeit $t=0$ bestimmt. T2D wurde erst in der Studie aus den oGTT-Messungen bestimmt und war vorher nicht bekannt. Δc , Differenz der Partikelkonzentrationen unter Hunger und normalen Ernährungsbedingungen der Blutspender.

^bDie Apo-B100 Konzentration wurde aus der Summe der Partikelkonzentrationen von VLDL, IDL und LDL unter der Annahme von 1 Apo-B100 Molekül/Partikel berechnet.

Nicht für alle Probanden liegen Nüchternproben vor, aber für die meisten mehrere Rückstellproben. Deshalb gibt es bei den aus den Rückstellproben berechneten

Werten mehr Probanden. Die Tabelle 3.3.2 soll eine Übersicht über die Anzahl der Probanden geben, bei denen Nüchternwerte bzw. Rückstellproben vorliegen.

Tabelle 3.3.2. Vergleich der Anzahl von Probanden, für die Nüchternblutproben vorliegen mit der Anzahl von Probanden, für die mindestens 2 Rückstellproben vorliegen^b

	Nüchternproben	Rückstellproben
Gesunde	196	251
IFG	167	193
IGT	21	26
IFG + IGT	29	68
DM	19	57
Gesamt	432	595

^b Tabelle 3.3.2. IFG: gestörte Nüchterglukose; IGT: gestörte Glukosetoleranz; DM: neu diagnostizierte Diabetes Mellitus; Rückstellproben: mindestens 2 Rückstellproben liegen vor.

3.4 Wichtung der Konzentration mit der Gesamtlipoproteinkonzentration

Um zu sehen, wie sich die Konzentrationen der Lipoproteinsubgruppen relativ zur Konzentration aller Lipoproteine zusammen verändert, wurden die Konzentrationen der einzelnen Subgruppen durch die Summe aller Lipoproteinkonzentrationen geteilt. Mit den so gewichteten Daten wurde dann ebenfalls für jeden Probanden eine Gerade berechnet. (siehe Abschnitt „Berechnung des Zeitverlaufs aus Rückstellproben“)

3.5 Vergleich der Nüchternblutproben von Gesunden mit Prädiabetikern und Diabetikern

In der Literatur werden normalerweise für die Lipoproteinkonzentrationsmessungen nüchtern abgegebene Blutproben verwendet. Deshalb werden im Folgenden zunächst die Nüchternblutproben der Probanden untersucht. Diese Ergebnisse sollen dann verwendet werden, um sie später mit den Ergebnissen aus Absatz 3.3.1 zu vergleichen, wo Rückstellproben von nicht nüchternen Probanden verwendet wurden.

Dabei wurden die Lipoproteinkonzentrationen von Gesunden mit denen von Diabetikern und Prädiabetikern mithilfe statistischer Testverfahren verglichen. Die Proben wurden als Nüchternwerte des oralen Glukosetoleranztests abgenommen.

Welche Signifikanztests dabei verwendet wurden, war je nach Lipoproteingruppe unterschiedlich. Zuerst wurden für viele Signifikanztests wichtige Voraussetzungen wie Normalverteilung und Homoskedastizität untersucht. Um auf Normalverteilung zu testen, wurde dabei der Kolmogorov-Smirnov Test angewandt. Um zu prüfen, in wie weit die Varianzen übereinstimmen, wurde der Levene Test angewandt. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet, wenn die Konzentrationen einer Lipoproteingruppe sowohl bei Gesunden als auch bei Prädiabetikern und Diabetikern annähernd normalverteilt waren und die Varianzen übereinstimmten. Gab es in den Varianzen Unterschiede, wurde der t-Test nach Welch verwendet, da bei diesem keine gleichen Varianzen vorausgesetzt werden. Waren die Konzentrationen einer Lipoproteinuntergruppe nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da er bei nicht normalverteilten Daten eine größere Teststärke als der t-Test hat (Zimmermann & Zumbo, 1993) bzw. (Eid et al., 2015). Da die beiden Stichproben unterschiedlich groß sind (226 gesunde zu 319 an Diabetes oder Prädiabetes erkrankte) fällt der Test konservativer aus. (Eid et al., 2015) War weder eine Übereinstimmung der Varianzen noch eine Normalverteilung gegeben, wurde versucht, die Daten durch Transformation mit dem natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion an eine Gaußverteilung anzupassen. Folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der Nüchternblutproben von Gesunden und an Diabetes oder Prädiabetes erkrankten zusammen:

Tabelle 3.5.1a. Übersicht über statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte^a

Lipoproteingruppe	Normalverteilung ⁿ	Homo-skedastizität ^h	Welcher Test wurde verwendet?	Nach Test signifikant unterschiedlich? ^s	Unterschiede der Nüchternwerte von (Prä-)diabetikern im Vergleich zu Gesunden
Chylomikronen B	Nein ($p_g=2.5 \times 10^{-5}$; $p_k=8.3 \times 10^{-8}$)	Ja ($p=0.394$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.170$)	-/-
Chylomikronen A	Nein ($p_g=0.001$; $p_k=3.7 \times 10^{-10}$)	Ja ($p=0.617$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.066$)	-/-
Chylomikronen Remnants	Nein ($p_g=0.008$; $p_k=5 \times 10^{-6}$)	Ja ($p=0.811$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.035$)	Zunahme bei (Prä-) Diabetikern
VLDL B	Nein ($p_k=0.085$; $p_k=1.3 \times 10^{-5}$)	Ja ($p=0.728$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.163$)	-/-
VLDL A	Nein ($p_g=0.200$; $p_k=4.1 \times 10^{-5}$)	Ja ($p=0.829$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.057$)	-/-
IDL	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Ja ($p=0.762$)	t-Test	Nein ($p=0.601$)	-/-
LDL E	Nein ($p_g=0.200$; $p_k=0.033$)	Ja ($p=0.785$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.136$)	-/-
LDL D	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.073$)	Ja ($p=0.805$)	t-Test	Nein ($p=0.393$)	-/-
LDL C	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Ja ($p=0.064$)	t-Test	Ja ($p=0.031$)	Abnahme bei (Prä-) Diabetikern
LDL B	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Nein ($p=0.026$)	t-Test nach Welch	Ja ($p=0.041$)	Abnahme bei (Prä-) Diabetikern
LDL A	Nein ($p_g=0.51$; $p_k=0.006$)	Nein ($p=0.008$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja	Abnahme bei (Prä-) Diabetikern
HDL D	Nein ($p_g=0.200$;	Nein ($p=0.014$)	Transformation der Daten,	Nein	-/-

	$p_k=0.005$)		siehe nächste Tabelle		
HDL C	Nein ($p_g=3.1 \times 10^{-4}$; $p_k=3 \times 10^{-5}$)	Nein ($p=0.001$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja	Abnahme bei (Prä-) Diabetikern
HDL B	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Ja ($p=0.687$)	t-Test	Ja ($p=0.007$)	Abnahme bei (Prä-) Diabetikern
HDL A	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Ja ($p=0.732$)	t-Test	Nein ($p=0.157$)	-/-
Total Lipoprotein	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Ja ($p=0.271$)	t-Test	Nein ($p=0.335$)	-/-

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; CM: Chylomikronen; ^hVarianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen; ^ssowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden abgelehnt; ⁿZur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten

Die Lipoproteinuntergruppen, die nicht die Voraussetzungen des t-Test oder des u-Test erfüllten, wurden mithilfe des natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion transformiert. Die folgende Tabelle zeigt, welche Transformationen benutzt wurden und welche Tests auf die transformierten Variablen angewandt wurden.

Tabelle 3.5.1b. Übersicht über die Transformationen und statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte, die weder normalverteilt waren noch gleiche Varianzen aufwiesen^a

Lipoproteingruppe	Art der Transformation	Ergebnis der Transformation ^{b,d}	Durchgeführter Test nach Transformation	Ergebnis des Tests ^c
HDL C	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$) und gleiche Varianzen ($p=0.078$)	T-Test	Signifikant unterschiedlich ($p=5.3 \times 10^{-5}$)
HDL D	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	T-Test nach Welch	Nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.084$)
LDL A	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$) und gleich Varianzen ($p=0.073$)	T-Test	Signifikant unterschiedlich ($p=0.001$)

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; ^bVarianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen; ^csowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden abgelehnt; ^dZur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Bei den Nüchternblutproben der Gruppe der Prädiabetiker und Diabetiker lässt sich also eine Abnahme von HDL B, HDL C, LDL A, LDL B und LDL C sowie eine Zunahme von Chylomikronen Remnants finden.

3.6 Vergleich der Rückstellproben von Gesunden mit Prädiabetikern und Diabetikern mithilfe von statistischen Testverfahren

Im Folgenden wurden die Unterschiede in den Zeitverläufen der Rückstellproben von Gesunden und Prädiabetikern und Diabetikern mithilfe von statistischen

Testverfahren analysiert. Dabei wurden die verschiedenen Prädiabetesgruppen und die Diabetiker zur Gruppe der Erkrankten zusammengefasst, wodurch eine größere Stichprobe entstand. Dazu wurden die wie in Abschnitt 3.1 aus den Rückstellproben berechneten Geradenfunktionen benutzt. Verglichen wurden einmal die aus den Geraden berechneten Werte für den Zeitpunkt der Diagnosestellung von weder an Diabetes noch Prädiabetes erkrankten mit den restlichen Probanden. Anschließend wurden die Steigungen der Geraden zwischen den beiden Gruppen verglichen. Eine positive Steigung entspricht dabei einer Zunahme der Lipoproteinkonzentrationen über die Zeit, eine negative Steigung entspricht einer Abnahme über die Zeit. Das Ziel war dabei zu untersuchen, ob sich über die Jahre hinweg das Lipoproteinprofil der Probanden von einem für Gesunde typischen Profil in Richtung zu einem für Diabetiker typischen Lipoproteinprofil gewandelt hatte.

Anschließend wurden noch Konzentrationen der Lipoproteinuntergruppen relativ zur Konzentration der gesamten Lipoproteine (s. Abschnitt 3.2) betrachtet. Dabei wurden wieder die Gruppe der Gesunden mit der Gruppe der an Prä- oder Diabetes erkrankten verglichen. Auch dabei wurden wieder die mithilfe der Geraden berechneten Konzentrationen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sowie die Steigungen der Geraden verwendet.

Es wurden die gleichen statistischen Signifikanztests dabei verwendet, die auch für die Nüchternwerte in Abschnitt 3.3 verwendet wurden: Diese waren je nach Lipoproteinuntergruppe unterschiedlich. Zuerst wurden wieder die für viele Signifikanztests wichtigen Voraussetzungen wie Normalverteilung und Homoskedastizität untersucht. Um auf Normalverteilung zu testen, wurde dabei der Test nach Kolmogorov-Smirnov angewandt. Um zu prüfen, inwieweit die Varianzen übereinstimmen wurde der Levene Test angewandt. Als Signifikanztest wurde der t-Test verwendet, wenn die Konzentrationen der Lipoproteinuntergruppe sowohl bei Gesunden als auch bei Prädiabetikern und Diabetikern normalverteilt waren und die Varianzen übereinstimmten. Gab es in den Varianzen Unterschiede, wurde der t-Test nach Welch verwendet, da bei diesem keine gleichen Varianzen vorausgesetzt werden. Waren die Konzentrationen einer Lipoproteinuntergruppe nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da er bei nicht

normalverteilten Daten eine größere Teststärke als der t-Test hat (Zimmermann & Zumbo, 1993) bzw. (Eid et al., 2015). War weder eine Übereinstimmung der Varianzen noch eine Normalverteilung gegeben, wurde versucht, die Daten durch Transformation mit dem Natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion an eine Gaußverteilung anzupassen. Fall das nicht gelang, wurden die Daten in Rangdaten überführt und anschließend der Welch-Test durchgeführt. (Zimmerman & Zumbo, 1992)

3.6.1 Vergleich der aus den zeitabhängigen Lipoproteinkonzentrationen berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests von Gesunden mit an Prädiabetes oder Diabetes erkrankten

Für die folgende Auswertung wurden, wie in Abschnitt 3.2. erklärt, die Lipoproteinkonzentrationen der einzelnen Probanden über die Zeit linear extrapoliert. Aus diesen wurde dann ein Wert für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests, also für den Zeitpunkt der Diagnosestellung berechnet. Diese Werte wurden zusammen mit den Werten, die für nüchterne Probanden aus den Spektren, die direkt vor der Durchführung des oGGT aufgenommen wurden, bereits in Tabelle 3.3.1 dargestellt. Die prozentualen Unterschiede der Konzentrationen der verschiedenen Lipoproteinfraktionen der Prädiabetiker und der Diabetiker im Vergleich zu den gesunden Testpersonen sind in Tabelle 3.6.1 wiedergegeben. Diese Tabelle enthält auch die Werte für die nüchternen Probanden

Tabelle 3.6.1. Unterschiede der Lipoproteinkonzentrationen zwischen Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern und deren Signifikanz^a

Lipoprotein	Nüchtern/ nicht-nüchtern		IFG	IGT	IFG + IGT	T2D
HDL A (7 – 8.5 nm)	Nüchtern	$\Delta_{C_{x-H}}$ [%]	+1.5	+0.6	+2.9	+4.7
	Nicht-nüchtern	$\Delta_{C_{x-H}}$ [%]	+2.4	-1.0	+1.9	+6.2
	Nüchtern	P_{x-H}	.. ^c	.. ^c	.. ^c	0.008
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	.. ^c	.. ^c	.. ^c	.. ^c
HDL B (8.5 – 10 nm)	Nüchtern	$\Delta_{C_{x-H}}$ [%]	-9.4	-2.2	+0.8	-10.0
	Nicht-nüchtern	$\Delta_{C_{x-H}}$ [%]	-2.7	-3.1	+3.4	-5.0
	Nüchtern	P_{x-H}	0.005	.. ^c	.. ^c	.. ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	.. ^c	.. ^c	.. ^c	.. ^c

HDL C (10 – 13 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-13.9	-5.6	-7.6	-18.0
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-5.7	-4.5	-6.0	-13.4
	Nüchtern	P_{x-H}	< 0.005	- ^c	- ^c	0.005
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.041	- ^c	- ^c	- ^c
HDL D (13 – 16 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-4.1	+2.2	+1.3	-3.0
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+0.3	+3.4	+1.5	-0.4
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
HDL total (7 – 16 nm) Apo-AI _{NMR} ^b	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-2.3	-0.5	+1.4	-0.7
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+0.6	-1.5	+1.4	2.0
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
LDL A (16 – 19 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-9.1	+0.1	-3.0	-15.8
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-3.4	-0.9	-2.9	-9.6
	Nüchtern	P_{x-H}	0.001	- ^c	- ^c	0.008
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
LDL B (19 – 21 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-4.2	+1.4	+1.2	-8.4
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-0.6	+1.3	+0.4	-2.9
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
LDL C (21 – 22 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-4.1	+0.8	0.0	-9.8
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-2.1	-1.0	-1.6	-5.6
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.026	0.049	0.003	0.020
LDL D (22 – 25 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-2.0	+1.7	+3.4	-7.4
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-0.2	+1.8	+0.2	-2.0
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
LDL E (25 – 30 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+2.7	+5.6	+11.9	-3.3
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+3.1	+5.6	+7.8	+6.3
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	0.012	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
LDL total (16 – 30 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-4.6	+1.4	+1.2	-10.2
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	-1.2	+0.7	-0.2	-4.3
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
IDL (30 – 40 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+1.2	0.0	+10.1	-5.6
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+0.9	+2.0	+3.8	+2.0
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
VLDL A (40 – 60 nm)	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+5.0	+5.3	+20.8	+0.6
	Nicht-nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+6.1	+10.8	+14.0	+13.0
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.026	0.049	0.003	0.020
VLDL B	Nüchtern	ΔC_{x-H} [%]	+4.0	+1.8	+23.8	-5.7

(60 – 80 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+4.4	+6.8	+12.8	+11.2
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	0.006	- ^c
IDL and VLDL (30 – 80 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+2.6	+1.8	+14.5	-3.7
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+2.8	+5.1	+7.7	+6.1
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
Apo-B100_{NMR}^b	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	-4.0	+1.4	+2.3	-9.7
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	-0.9	+1.1	+0.5	-3.4
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
CM Re (80 – 100 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+6.1	+6.1	+30.3	+3.0
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+10.6	+16.7	+21.2	+18.2
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.004	0.016	< 0.001	0.011
CM A (100 – 150 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+4.8	+2.4	+33.3	-4.8
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+7.1	+11.9	+21.4	+19.0
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.016	0.041	< 0.001	0.016
CM B (>150 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+5.3	+1.3	+45.3	-12.0
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+12.3	+11.0	+30.1	+20.5
	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	0.011	- ^c	< 0.001	0.048
CM total (80 – 430 nm)	Nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+6.1	+5.2	+33.0	-0.9
	Nicht-nüchtern	Δc_{x-H} [%]	+9.6	+14.8	+22.6	+19.1
Apo-B48_{NMR}^b	Nüchtern	P_{x-H}	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
	Nicht-nüchtern	P_{x-H}	- ^c	0.022	< 0.001	0.012

^aNomenklatur der Lipoproteine siehe Materialien und Methoden (Kap. 2.3.2). Die Nüchternwerte wurden aus den NMR-Spektren berechnet, die vor der oGTT Bestimmung aufgenommen wurden. Die Nicht-Nüchtern-Werte wurden durch Extrapolation der Rückstellproben für die Zeit $t=0$ bestimmt. T2D wurde erst in der Studie aus den oGTT-Messungen bestimmt und war vorher nicht bekannt. Die relativen Unterschiede der Lipoproteinkonzentrationen Δc zwischen den gesunden Probanden und Prädiabetikern und Diabetikern wurde für die beiden Gruppen (unter Hunger und extrapoliertes Wert unter normalen Ernährungsbedingung) berechnet. Zusätzlich wird die Signifikanz p der Unterschiede Δc_{x-H} angegeben (siehe auch Tabellen 3.5.1 und 3.6.2. Werte, mit $p < 0.05$ sind in Fettdruck dargestellt. ^bDie Apo-B100 Konzentration wurde aus der Summe der Partikelkonzentrationen von VLDL, IDL und LDL unter der Annahme von 1 apo-B100 Molekül/Partikel berechnet.

Um zu überprüfen, bei welchen der Lipoproteinuntergruppen sich die Konzentrationen zwischen den Gesunden und den Prädiabetikern und Diabetikern zusammengefasst signifikant unterscheiden, wurde, wie zu Beginn des Abschnitt 3.4 beschrieben, verschiedene statistische Testverfahren angewandt. Die angewandten Testverfahren und deren Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.6.2a. Übersicht über statistische Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die aus dem Zeitverlauf der Rückstellwerten mithilfe von Geradenfits berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztest.^a

Lipoprotein-gruppe	Normalverteilung ^d	Gleichheit der Varianzen ^b	Name des verwendeten Tests	Nach verwendeten Test signifikant ^c	Von Gesunden zu (Prä-)diabetikern Zunahme oder Abnahme?
Chylomikronen A	Nein ($p_g=0.0001$; $p_k=8.8 \times 10^{-7}$)	Ja ($p=0.194$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.0001$)	Zunahme
Chylomikronen B	Nein ($p_g=0.000003$; $p_k=0.00002$)	Ja ($p=0.105$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.0003$)	Zunahme
Chylomikronen Remnants	Nein ($p_g=0.00003$; $p_k=0.0004$)	Ja ($p=0.313$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.00003$)	Zunahme
HDL A	Nein ($p_g=0.008$; $p_k=0.200$)	Nein ($p=0,023$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja ($p=0.042$)	Zunahme
HDL B	Ja ($p_k=p_g=0.200$)	Ja ($p=0.302$)	t-Test	Nein ($p=0.448$)	-/-
HDL C	Nein ($p_g=0.001$; $p_k=1.6 \times 10^{-9}$)	Nein ($p=0.027$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja ($p=0.027$)	Abnahme
HDL D	Nein ($p_g=0.200$; $p_k=0.011$)	Nein ($p=0.038$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein ($p=0.500$)	-/-
IDL	Nein ($p_g=2.6 \times 10^{-4}$; $p_k=0.038$)	Nein ($p=0.010$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein ($p=0.451$)	-/-

LDL A	Nein ($p_g=0.029$; $p_k=0.002$)	Nein ($p=0.024$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Grenzwertig ($p=0.049$ bzw. $p=0.057$)	Abnahme
LDL B	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.62$)	Ja ($p=0.050$)	t-Test	Nein ($p=0.694$)	-/-
LDL C	Nein ($p_g=0.018$; $p_k=0.008$)	Ja ($p=0.054$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.244$)	-/-
LDL D	Nein ($p_g=0.004$; $p_k=0.062$)	Nein ($p=0.039$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein ($p=0.809$)	-/-
LDL E	Nein ($p_g=0.007$; $p_k=0.025$)	Ja ($p=0.112$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.006$)	Zunahme
VLDL A	Nein ($p_g=0.001$; $p_k=0.001$)	Ja ($p=0.158$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.001$)	Zunahme
VLDL B	Nein ($p_g=0.002$; $p_k=0.0001$)	Nein ($p=0.041$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja ($p=0.006$)	Zunahme
Gesamte Lipoproteine	Nein ($p_g=0.007$; $p_k=0.052$)	Nein ($p=0.019$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein ($p=0.221$)	-/-

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; CM: Chylomikronen; ^bVarianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0.05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen; ^csowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden abgelehnt; ^dZur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Die Lipoproteinuntergruppen, die nicht die Voraussetzungen des t-Test oder des u-Test erfüllten, wurden mithilfe des natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion transformiert. Die folgende Tabelle zeigt, welche Transformationen benutzt wurden und welche Tests auf die transformierten Variablen angewandt wurden.

Tabelle 3.6.2b Übersicht über die Transformationen und statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p -Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte, die weder normalverteilt waren noch gleiche Varianzen aufwiesen^a

Lipoprotein- untergruppe	Art der Transformation	Ergebnis der Transformation ^{h,n}	Name des angewandten Tests nach Transformation	Ergebnis des Tests ^s
HDL A	Wurzelfunktion	Normalverteilt ($p_g=p_k=0.200$)	t-Test nach Welch	Signifikant unterschiedlich ($p=0.042$)
HDL C	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.067$)	t-Test nach Welch	Signifikant unterschiedlich ($p=0.027$)
HDL D	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.081$) und gleiche Varianzen ($p=0.055$)	t-Test	Nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.500$)
IDL	Wurzelfunktion	Normalverteilt ($p_g=p_k=0.200$)	t-Test nach Welch	Nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.451$)
LDL A	Wurzelfunktion	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.060$)	t-Test nach Welch	signifikant unterschiedlich ($p=0.049$)
	Natürlicher Logarithmus	gleiche Varianzen ($p=0.085$)	Mann-Whitney-U- Test	Nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.057$)
LDL D	Wurzelfunktion	Normalverteilt ($p_k=p_g=0.200$) und gleiche Varianzen ($p=0.108$)	t-Test	Nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.809$)
VLDL B	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=0.200$; $p_k=0.083$)	t-Test nach Welch	signifikant unterschiedlich ($p=0.006$)
Gesamte Lipoproteine	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.221$)			

^aTabelle 3.6.2b; p_g : p -Wert für die gesunden Probanden, p_k : p -Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; ^hVarianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen; ^ssowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden abgelehnt; ⁿZur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass für den Zeitpunkt der Diagnosestellung unter normalen Ernährungsbedingungen bei (Prä)diabetikern signifikant erhöhte Konzentrationen an großen Lipoproteinpartikeln (Chylomikronen A, Chylomikronen B, Chylomikronen Remnants, VLDL A, VLDL B), vorliegen. Diese Unterschiede sind bei nüchternen Probanden nicht signifikant. Bei den kleineren Partikeln findet man dagegen im Wesentlichen nur signifikante Unterschiede bei nüchternen Probanden. Bei Diabetikern sind HDL A, und LDL E signifikant erhöht, aber HDL C und LDL A signifikant verringert.

3.6.2 Vergleich der Steigungen der aus den Rückstellproben berechneten Geraden von Gesunden mit (Prä)diabetikern

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben wurden aus den Rückstellproben Geraden berechnet. Die Steigung dieser Geraden kann man als mittleren Trend deuten, also wie stark die durchschnittlichen Lipoproteinkonzentrationen über die Zeit zu- oder abgenommen haben. Die Mittelwerte der Steigungen und ihre Standardabweichungen werden in Tabelle 3.6.3 gezeigt. Diese Steigungen wurden verglichen, um zu sehen ob bei den Probanden innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Veränderung der Lipoproteine in Richtung Diabetes stattgefunden hat. Hätten viele der (Prä)diabetiker ihr pathologisches Lipoproteinprofil innerhalb des Beobachtungszeitraumes entwickelt, müsste sich dies in den Steigungen der Geraden zeigen. Um eine höhere Signifikanz zu erreichen, wurden in diesem Kapitel die gesunden Probanden, bei denen keine (Diabetes-abhängigen) Veränderungen des Lipoproteinmusters zu erwarten ist, mit der zusammengefassten Gruppe von Prädiabetikern und Diabetikern verglichen. In Tabelle 3.6.3a sind die angewandten Signifikanztests und ihre Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3.6.3 Mittelwerte und Standardabweichungen der berechneten Steigungen und der Lipoproteingruppen für Probanden ohne Diabetes, Prädiabetiker und Diabetiker^a

	Gesunde	IFG	IGT	IFG + IGT	T2D	Prädiabetiker und Diabetiker
Anzahl	224	189	25	68	56	338
Lipoprotein						
HDL A	+0,284±4,019	-0,049±1,921	+0,490±4,956	+0,063±1,46	+0,228±1,82	+0,059±2,190
HDL B	+0,187±1,84	+0,242±0,784	-0,269±1,454	+0,379±0,5	+0,305±0,541	+0,242±0,784
HDL C	+0,096±0,654	+0,117±0,326	-0,106±0,734	+0,187±0,241	+0,127±0,179	+0,116±0,345
HDL D	+0,034±0,184	+0,032±0,168	-0,001±0,332	+0,063±0,088	+0,043±0,069	+0,037±0,162
LDL A	+0,014±0,103	+0,016±0,08	-0,012±0,118	+0,025±0,044	+0,013±0,027	+0,015±0,072
LDL B	+0,010±0,062	+0,007±0,069	-0,007±0,093	+0,017±0,032	+0,009±0,023	+0,008±0,060
LDL C	+0,012±0,058	+0,005±0,085	-0,005±0,055	+0,014±0,032	+0,005±0,023	+0,006±0,067
LDL D	+0,004±0,060	0,000±0,047	-0,004±0,092	+0,004±0,024	+0,001±0,021	+0,001±0,045
LDL E	+0,005±0,046	0,000±0,051	-0,008±0,068	+0,007±0,026	+0,003±0,023	+0,001±0,045
IDL	+0,001±0,029	-0,001±0,022	-0,004±0,041	+0,001±0,013	0,000±0,011	-0,001±0,021
VLDL A	0,000±0,017	-0,001±0,012	-0,003±0,031	+0,002±0,009	0,001±0,008	0,000±0,013
VLDL B	0,000±0,004	0,000±0,003	-0,001±0,007	0,000±0,003	0,000±0,002	0,000±0,003
Chylo Rem	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,001	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Chylo A	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
Chylo B	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000

^aIFG: Probanden mit gestörter Nüchtern-glucose; IGT: Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; T2D: Probanden mit Typ 2 Diabetes; Chylo Rem: Chylomikronen Remnants.

Tabelle 3.6.4a Übersicht über statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die aus dem Zeitverlauf der Rückstellwerten mithilfe von Geradenfits berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztest^a

Lipoproteingruppe	Normalverteilung	Homoskedastizität ^b	Name des verwendeten Tests	Unterschied nach Test ^c	
Chylomikronen A	Nein ($p_g=1.4 \times 10^{-39}$; $p_k=1.7 \times 10^{-31}$)	Ja ($p=0.059$)	Mann-Whitney-U-Test	Nicht signifikant ($p=0.168$)	-/-
Chylomikronen B	Nein ($p_g=9.1 \times 10^{-47}$; $p_k=2.0 \times 10^{-28}$)	Nein ($p=0.024$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.157$)	-/-
Chylomikronen Remnants	Nein ($p_g=4.0 \times 10^{-41}$; $p_k=8.6 \times 10^{-29}$)	Nein ($p=0.021$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.100$)	-/-
HDL A	Nein ($p_g=3.1 \times 10^{-58}$; $p_k=3.3 \times 10^{-22}$)	Nein ($p=0.003$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.574$)	-/-
HDL B	Nein ($p_g=2.4 \times 10^{-51}$; $p_k=1.3 \times 10^{-33}$)	Nein ($p=0.009$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Signifikant ($p=7.3 \times 10^{-4}$)	Bei (Prä-)diabetikern stärkere Zunahme
HDL C	Nein ($p_g=1.3 \times 10^{-34}$; $p_k=8.0 \times 10^{-28}$)	Nein ($p=0.002$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Signifikant ($p=0.042$)	Bei (Prä-)diabetikern stärkere Zunahme
HDL D	Nein ($p_g=1.8 \times 10^{-33}$; $p_k=1.3 \times 10^{-49}$)	Ja ($p=0.215$)	Mann-Whitney-U-Test	Signifikant ($p=0.005$)	Bei (Prä-)diabetikern stärkere Zunahme
IDL	Nein ($p_g=2.4 \times 10^{-42}$; $p_k=3.3 \times 10^{-38}$)	Ja ($p=0.058$)	Mann-Whitney-U-Test	Nicht signifikant ($p=0.326$)	-/-
LDL A	Nein ($p_g=3.2 \times 10^{-36}$; $p_k=1.4 \times 10^{-41}$)	Nein ($p=0.038$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.101$)	-/-
LDL B	Nein ($p_g=3.2 \times 10^{-31}$; $p_k=1.5 \times 10^{-51}$)	Ja ($p=0.185$)	Mann-Whitney-U-Test	Signifikant	Bei Gesunden eine stärkere Zunahme als bei (Prä-)diabetikern
LDL C	Nein ($p_g=9.5 \times 10^{-33}$)	Ja	Mann-Whitney-U-Test	Nicht signifikant	-/-

	$p_k=2.0 \times 10^{-62}$	($p=0.340$)		($p=0.409$)	
LDL D	Nein ($p_g=9.4 \times 10^{-42}$; $p_k=2.8 \times 10^{-46}$)	Ja ($p=0.120$)	Mann-Whitney-U-Test	Nicht signifikant ($p=0.183$)	-/-
LDL E	Nein ($p_g=3.1 \times 10^{-34}$; $p_k=3.5 \times 10^{-45}$)	Nein ($p=0.232$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.134$)	-/-
VLDL A	Nein ($p_g=1.2 \times 10^{-35}$; $p_k=1.3 \times 10^{-34}$)	Ja ($p=0.120$)	Mann-Whitney-U-Test	Nicht signifikant ($p=0.121$)	-/-
VLDL B	Nein ($p_g=1.8 \times 10^{-37}$; $p_k=5.0 \times 10^{-34}$)	Nein ($p=0.045$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nicht signifikant ($p=0.217$)	-/-
Total Lipoprotein	Nein ($p_g=2.0 \times 10^{-43}$; $p_k=1.8 \times 10^{-22}$)	Nein ($p=0.014$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Signifikant ($p=0.045$)	-/-

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; CM: Chylomikronen. ^bVarianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen. ^csowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden, abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Die Lipoproteinuntergruppen, die nicht die Voraussetzungen des t-Test oder des u-Test erfüllten, wurden mithilfe des natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion transformiert. Die Tabelle 3.6.4b zeigt, welche Transformationen benutzt wurden und welche Tests auf die transformierten Variablen angewandt wurden.

Tabelle 3.6.4b Übersicht über die Transformationen und statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte, die weder normalverteilt waren noch gleiche Varianzen aufwiesen.^a

Lipoproteingruppe	Art der Transformation	Ergebnis der Transformation	Durchgeführter Test nach Transformation	Ergebnis des Tests
Chylomikronen B	Natürlicher Logarithmus	Gleiche Varianzen (p=0.484)	u-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.157)
Chylomikronen Remnants	Wurzelfunktion	Gleiche Varianzen (p=0.140)	u-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.100)
HDL A	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach nicht signifikant unterschiedlich (p=0.574)			
HDL B	Natürlicher Logarithmus	Gleiche Varianzen (p=0.055)	u-Test	signifikant unterschiedlich (p=7.3x10 ⁻⁴)
HDL C	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach signifikant unterschiedlich (p=0.042)			
LDL A	Wurzelfunktion	Gleiche Varianzen (p=0.188)	u-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.101)
LDL E	Wurzelfunktion	Gleiche Varianzen (p=0.820)	u-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.134)
VLDL B	Wurzelfunktion	Gleiche Varianzen (p=0.303)	u-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.217)
Total Lipoprotein	Natürlicher Logarithmus	Gleiche Varianzen (p=0.152)	u-Test	signifikant unterschiedlich (p=0.045)

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankten. Varianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen. Sowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden, abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass im Vergleich zu den Gesunden Prädiabetiker und Diabetiker im Schnitt stärkere positive Steigung an HDL B, HDL C und HDL D haben. Dies widerspricht scheinbar den Ergebnissen von Kapitel 3.6.1 bei denen Diabetiker außer bei HDL A niedrigere HDL-Werte zeigen als Gesunde. Dabei war aber auch bei den Gesunden eine positive Steigung zu verzeichnen, auch wenn diese weniger stark war als bei den (Prä)diabetikern. Hingegen war die Steigung bei den (Prä)diabetikern bezüglich des LDL B weniger stark als bei den Gesunden, auch wenn bei beiden ein Anstieg des LDL B beobachtet werden konnte. Dies ist zumindest partiell mit der Beobachtung zu vereinbaren, dass Diabetiker niedrigere LDL-Partikelzahlen vorweisen als gesunde Probanden (vgl. auch Tabelle 3.6.1).

3.6.3 Vergleich der aus den, mit der Gesamtlipoproteinkonzentration gewichteten, Lipoproteinkonzentrationen berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glucose Toleranztests von Gesunden mit an Prädiabetes oder Diabetes erkrankten

Für die folgende Auswertung wurden, wie in Abschnitt 3.3 erklärt, zuerst die Konzentrationen der Lipoproteinuntergruppen eines Probanden durch die Summe der Konzentrationen seiner gesamten Lipoproteine geteilt. Es wurde also berechnet, welchen Anteil die Konzentration einer Lipoproteinuntergruppe an der gesamten Lipoproteinkonzentration eines Probanden ausmacht. Durch diese so gewichteten Lipoproteinkonzentrationen der einzelnen Probanden wurden, in Abhängigkeit von der Zeit, Geraden gelegt. Aus diesen wurde dann ein Wert für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests, also für den Zeitpunkt der Diagnosestellung berechnet. Es wurde die Gruppe der Gesunden mit der Gruppe der an Diabetes oder Prädiabetes erkrankten verglichen.

Um zu überprüfen, bei welchen der Lipoproteinuntergruppen sich die Konzentrationen signifikant unterscheiden, wurden, wie zu Beginn des Abschnitt 3.4 beschrieben, verschiedene statistische Testverfahren angewandt. Die angewandten Testverfahren und deren Ergebnisse sind in Tabelle 3.6.4a zusammengefasst. Es wurden wieder die Gesunden mit der Gesamtgruppe der Prädiabetiker und Diabetiker verglichen.

Tabelle 3.6.5a Übersicht über statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p -Werten für die aus dem Zeitverlauf der Rückstellwerte mithilfe von Geradenfits berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztest. ^a

Lipoprotein-gruppe	Normal-verteilung	Homo-skedastizität	Name des durchgeführten Tests	Nach Test signifikant unterschiedlich?	Zu- oder Abnahme bei (Prä-)diabetikern im Vergleich zu Gesunden
Chylo-mikronen A	Nein ($p_g=1.9 \times 10^{-5}$; $p_k=8.0 \times 10^{-8}$)	Ja ($p=0.204$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=3.4 \times 10^{-4}$)	Zunahme
Chylo-mikronen B	Nein ($p_g=3.7 \times 10^{-5}$; $p_k=8.6 \times 10^{-5}$)	Ja ($p=0.056$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.001$)	Zunahme
Chylo-mikronen Remnants	Nein ($p_g=8.4 \times 10^{-5}$; $p_k=0.005$)	Ja ($p=0.342$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=1.1 \times 10^{-4}$)	Zunahme
HDL A	Ja ($p_g=p_k=0.200$)	Ja ($p=0.118$)	t-Test	Ja ($p=0.038$)	Zunahme
HDL B	Ja ($p_g=p_k=0.200$)	Ja ($p=0.467$)	t-Test	Nein ($p=0.206$)	-/-
HDL C	Nein ($p_g=1.1 \times 10^{-4}$; $p_k=1.6 \times 10^{-7}$)	Nein ($p=0.012$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja ($p=0.005$)	Abnahme
HDL D	Nein ($p_g=0.006$; $p_k=0.004$)	Ja ($p=0.201$)	Mann-Whitney-U-Test	Nein ($p=0.975$)	-/-
IDL	Nein ($p_g=0.002$; $p_k=0.070$)	Nein ($p=0.035$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein	-/-
LDL A	Nein ($p_g=0.074$; $p_k=0.004$)	Nein ($p=0.016$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja	Abnahme
LDL B	Ja ($p_g=0.200$; $p_k=0.200$)	Nein ($p=0.087$)	t-Test nach Welch	Nein ($p=0.211$)	-/-
LDL C	Nein ($p_g=0.200$; $p_k=0.021$)	Ja ($p=0.356$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.019$)	Abnahme
LDL D	Ja ($p_g=0.091$; $p_k=0.086$)	Ja ($p=0.155$)	t-Test	Nein ($p=0.366$)	-/-

LDL E	Nein ($p_g=0.075$; $p_k=0.008$)	Ja ($p=0.368$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.036$)	Zunahme
VLDL A	Nein ($p_g=0.001$; $p_k=0.001$)	Ja ($p=0.456$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.002$)	Zunahme
VLDL B	Nein ($p_g=0.002$; $p_k=8 \times 10^{-6}$)	Ja ($p=0.114$)	Mann-Whitney-U-Test	Ja ($p=0.021$)	Zunahme

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankten; CM: Chylomikronen, Varianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen. Sowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden, abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Die Lipoproteinuntergruppen, die nicht die Voraussetzungen des t-Test oder des u-Test erfüllten, wurden mithilfe des natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion transformiert. Die Tabelle 3.6.4b zeigt welche Transformationen benutzt wurden und welche Tests auf die transformierten Variablen angewandt wurden.

Tabelle 3.6.4b Übersicht über die Transformationen und statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte, die weder normalverteilt waren noch gleiche Varianzen aufwiesen. ^a

Lipoprotein-gruppe	Art der Transformation	Ergebnis der Transformation	Durchgeführter Test nach Transformation	Ergebnis des Tests
HDL C	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=p_k=0.200$); gleiche Varianzen ($p=0.064$)	T-Test	Signifikant unterschiedlich ($p=0.005$)
IDL	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach nicht signifikant unterschiedlich ($p=0.192$)			
LDL A	Natürlicher Logarithmus	Normalverteilt ($p_g=p_k=0.200$) und gleiche Varianzen ($p=0.057$)	T-Test	Signifikant unterschiedlich ($p=0.008$)

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter. Varianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen. Sowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden, abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Wichtung mit der Gesamtlipoproteinkonzentration die Ergebnisse recht ähnlich sind zu den Ergebnissen ohne Wichtung (vgl. Absatz 3.4.1): Wie auch bei den Lipoproteinkonzentrationen ohne Wichtung gibt es eine Zunahme der Konzentrationen von Chylomikronen A, Chylomikronen B, VLDL A, VLDL B, Chylomikronen Remnants, HDL A und LDL E sowie eine Abnahme der Konzentrationen von HDL C bei der Gruppe der Prädiabetiker und Diabetiker. Die Abnahme der Konzentration von LDL A ist signifikanter und anders als bei den nicht gewichteten Werten wurde zusätzlich eine Abnahme von LDL C als signifikant erkannt.

3.6.4 Vergleich der Steigungen der aus den mit der Gesamtlipoprotein gewichteten Rückstellproben berechneten Geraden von Gesunden mit (Prä)diabetikern

Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben wurden die Konzentrationen der Lipoproteinuntergruppen durch die Summe aller Lipoproteinuntergruppen geteilt. Als Ergebnis bekam man so den Anteil einer Lipoproteinuntergruppe an der Gesamtlipoproteinkonzentration. Aus den so gewichteten Rückstellproben wurden Geraden berechnet. Die Steigung dieser Geraden kann man als mittleren Trend deuten, also wie stark die durchschnittlichen Lipoproteinkonzentrationen über die Zeit zu- oder abgenommen haben. Diese mit der Gesamtlipoproteinkonzentration gewichteten Steigungen wurden verglichen, um zu sehen ob bei den Probanden innerhalb des Beobachtungszeitraums eine Veränderung der Lipoproteine in Richtung Diabetes stattgefunden hat.

Um zu überprüfen bei welchen der Lipoproteinuntergruppen sich die Steigungen der gewichteten Lipoproteinkonzentrationen signifikant unterscheiden, wurde wie zu Beginn des Abschnitt 3.4 beschrieben verschiedene statistische Testverfahren angewandt. Die angewandten Testverfahren und deren Ergebnisse sind in Tabelle 3.6.5a zusammengefasst.

Tabelle 3.6.5a Übersicht über statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die aus dem Zeitverlauf der Rückstellwerte mithilfe von Geradenfits berechneten Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztest^a

Lipoprotein- gruppe	Normal- verteilung	Homo- skedastizität	Welcher Test wurde verwendet?	Nach Test signifikante Unterschiede zwischen (Prä)- diabetikern und Gesunden?	Unterschiede der Steigung von (Prä)- diabetikern und Gesunden
Chylo- mikronen A	Nein ($p_g=5.3 \times 10^{-39}$; $p_k=9.3 \times 10^{-25}$)	Ja ($p=0.059$)	Mann-Whitney-U- Test	Nein ($p=0.425$)	-/-
Chylo- mikronen B	Nein ($p_g=2.0 \times 10^{-44}$; $p_k=2.4 \times 10^{-24}$)	Nein ($p=0.024$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein	-/-
Chylo- mikronen Remnants	Nein ($p_g=3.0 \times 10^{-44}$; $p_k=1.8 \times 10^{-24}$)	Nein ($p=0.021$)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein	-/-
HDL A	Nein ($p_g=2.0 \times 10^{-58}$; $p_k=2.8 \times 10^{-41}$)	Nein	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein ($p=$	-/-

		(p=0.003)			
HDL B	Nein ($p_g=7.3 \times 10^{-55}$, $p_k=5.0 \times 10^{-31}$)	Nein (p=0.009)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja	Bei (Prä)- diabetikern eine signifikant stärker positive Steigung als bei Gesunden
HDL C	Nein ($p_g=2.7 \times 10^{-42}$, $p_k=2.2 \times 10^{-35}$)	Nein (p=0.002)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Ja	Bei (Prä)- diabetikern eine signifikant stärker positive Steigung als bei Gesunden
HDL D	Nein ($p_g=1.8 \times 10^{-40}$, $p_k=4.3 \times 10^{-49}$)	Ja (p=0.215)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.104)	-/-
IDL	Nein ($p_g=1.2 \times 10^{-34}$, $p_k=4.2 \times 10^{-39}$)	Ja (p=0.058)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.934)	-/-
LDL A	Nein ($p_g=1.3 \times 10^{-45}$, $p_k=1.1 \times 10^{-52}$)	Nein (p=0.038)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein	-/-
LDL B	Nein ($p_g=1.3 \times 10^{-31}$, $p_k=6.4 \times 10^{-61}$)	Ja (p=0.185)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.565)	-/-
LDL C	Nein ($p_g=4.2 \times 10^{-33}$, $p_k=3.0 \times 10^{-74}$)	Ja (p=0.340)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.555)	-/-
LDL D	Nein ($p_g=2.9 \times 10^{-25}$, $p_k=7.1 \times 10^{-50}$)	Ja (p=0.120)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.925)	-/-
LDL E	Nein ($p_g=7.2 \times 10^{-31}$, $p_k=8.5 \times 10^{-49}$)	Ja (p=0.232)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.666)	-/-
VLDL A	Nein ($p_g=2.4 \times 10^{-37}$, $p_k=2.9 \times 10^{-29}$)	Ja (p=0.120)	Mann-Whitney-U- Test	Nein (p=0.313)	-/-
VLDL B	Nein ($p_g=8.4 \times 10^{-36}$, $p_k=4.0 \times 10^{-29}$)	Nein (p=0.045)	Transformation der Daten, siehe nächste Tabelle	Nein	-/-

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankter; CM: Chylomikronen. Varianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen Sowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden, abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Die Lipoproteinuntergruppen, die nicht die Voraussetzungen des t-Test oder des u-Test erfüllten, wurden mithilfe des natürlichen Logarithmus beziehungsweise der Wurzelfunktion transformiert. Die Tabelle 3.6.5b zeigt, welche Transformationen benutzt wurden und welche Tests auf die transformierten Variablen angewandt wurden.

Tabelle 3.6.5b Übersicht über die Transformationen und statistischen Testverfahren und deren Ergebnisse mit p-Werten für die Lipoproteinkonzentrationen der Nüchternwerte, die weder normalverteilt waren noch gleiche Varianzen aufwiesen^a

Lipoprotein-gruppe	Art der Transformation	Ergebnis der Transformation	Durchgeführter Test nach Transformation	Ergebnis des Tests
Chylomikronen B	Natürlicher Logarithmus	Gleiche Varianzen (p=0.091)	U-Test	Nicht signifikant unterschiedlich (p=0.223)
Chylomikronen Remnants	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach nicht signifikant unterschiedlich (p=0.104)			
HDL A	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach nicht signifikant unterschiedlich (p=0.574)			
HDL B	Natürlicher Logarithmus	Gleiche Varianzen (p=0.062)	U-Test	Signifikant unterschiedlich (p=0.005)
HDL C	Durch Transformation keine Normalverteilung, Homoskedastizität erreicht, deshalb Durchführung des Welch-Tests auf Grundlage der Rangdaten. Demnach signifikant unterschiedlich (p=0.042)			

^a p_g : p-Wert für die gesunden Probanden, p_k : p-Wert für die Gruppe der an Prädiabetes oder Diabetes erkrankten. Varianzgleichheit getestet durch Levene Test, bei einem Signifikanzniveau von über 0,05 wurde die Nullhypothese der Varianzgleichheit nicht verworfen. Sowohl bei u-Test als auch bei t-Test wurde bei einem Signifikanzniveau kleiner als 0.05 die Nullhypothese, dass sich die beiden Gruppen nicht unterscheiden abgelehnt. Zur Testung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow-Test verwendet, bei p über 0.05 wurde die Nullhypothese, dass die Werte normalverteilt sind, beibehalten.

Zusammenfassend sind bei den mit der Gesamtlipoproteinkonzentration gewichteten Steigungen der Lipoproteinuntergruppen eine Zunahme der Steigung von HDL B und

HDL C zu erkennen, wobei auch die Gesunden eine positive Steigung für diese Untergruppen aufweisen. Anders als bei den ungewichteten Steigungen aus Abschnitt 3.3.2 sind HDL D und LDL B nicht mehr signifikant unterschiedlich.

3.7 Grafische Betrachtung der Zeitverläufe der Rückstellproben

3.7.1 Häufigkeitsverteilung über die Anzahl der vorhandenen Proben über die vorhandenen Jahre

Bei der Auswertung der Krankheitsverläufe über die Jahre hinweg wurde zuerst überprüft, über welchen Zeitraum Rückstellproben vorliegen. Dafür wurden Histogramme erstellt, die x-Achse entspricht jeweils den Jahren die bei den Probanden zwischen der Diagnosestellung mithilfe des oralen Glucose-Toleranztest (oGTT) und der ältesten Rückstellprobe liegen.

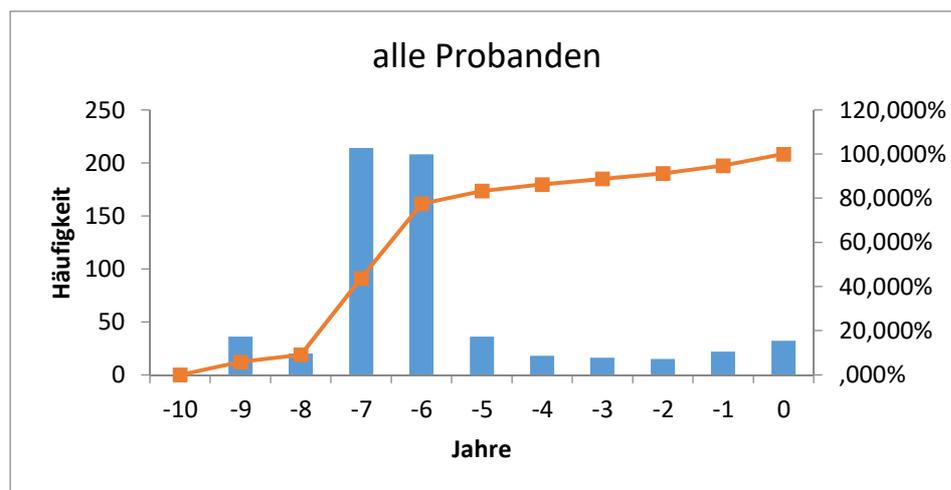


Abbildung 3.7.1. Häufigkeitsverteilung des Zeitraums zwischen ältester Rückstellprobe und oGTT aller Probanden. x-Achse: Angegeben ist die Differenz in Jahren zwischen der am längsten zurückliegenden Rückstellprobe eines Probanden und dem Zeitpunkt des oGTT. y-Achse: Absolute Häufigkeit (■) und kumulierte Häufigkeit [%] (—■); Alle Probanden wurden betrachtet.

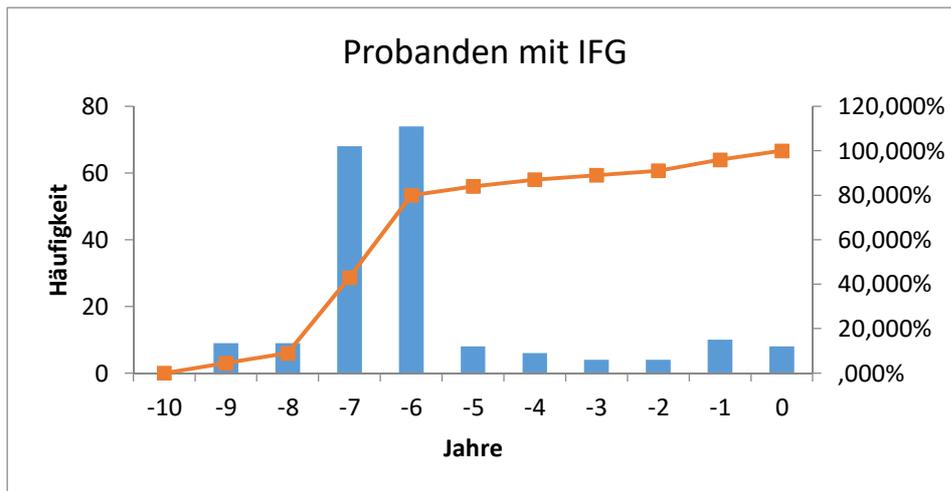


Abbildung 3.7.2. Häufigkeitsverteilung des Zeitraums zwischen ältester Rückstellprobe und oGTT der Probanden mit IFG. x-Achse: Angegeben ist die Differenz in Jahren zwischen der am längsten zurückliegenden Rückstellprobe eines Probanden und dem Zeitpunkt des oGTT. y-Achse: Absolute Häufigkeit (■) und kumulierte Häufigkeit [%] (—■—); nur Probanden mit gestörter Nüchtern glukose (IFG) wurden betrachtet.

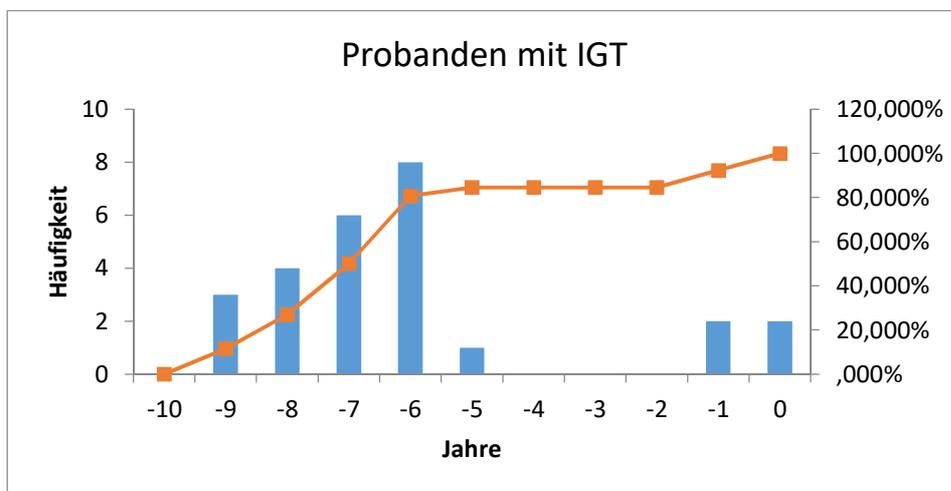


Abbildung 3.7.3. Häufigkeitsverteilung des Zeitraums zwischen ältester Rückstellprobe und oGTT der Probanden mit IGT. x-Achse: Angegeben ist die Differenz in Jahren zwischen der am längsten zurückliegenden Rückstellprobe eines Probanden und dem Zeitpunkt des oGTT. y-Achse: Absolute Häufigkeit (■) und kumulierte Häufigkeit [%] (—■—); nur Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) wurden betrachtet.

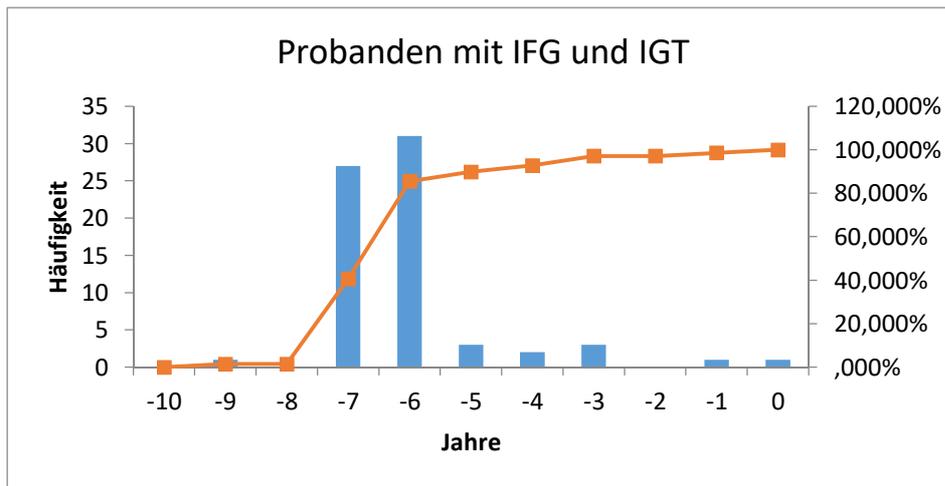


Abbildung 3.7.4. Häufigkeitsverteilung des Zeitraums zwischen ältester Rückstellprobe und oGTT der Probanden mit IFG und IGT. x-Achse: Angegeben ist die Differenz in Jahren zwischen der am längsten zurückliegenden Rückstellprobe eines Probanden und dem Zeitpunkt des oGTT. y-Achse: Absolute Häufigkeit (■) und kumulierte Häufigkeit [%] (—■); nur Probanden mit sowohl gestörter Nüchtern glukose (IFG) und eingeschränkter Glukosetoleranz (IGT) wurden betrachtet.

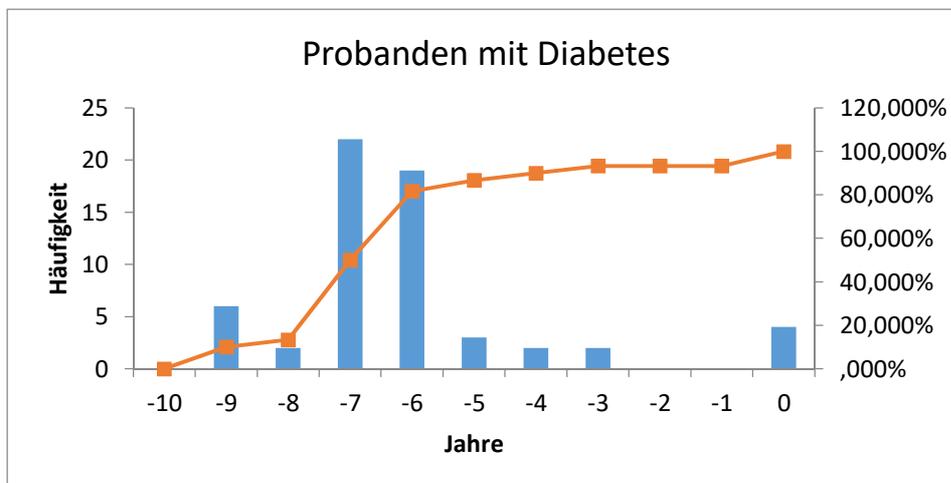


Abbildung 3.7.5. Häufigkeitsverteilung des Zeitraums zwischen ältester Rückstellprobe und oGTT der Probanden mit neu diagnostiziertem Diabetes. x-Achse: Angegeben ist die Differenz in Jahren zwischen der am längsten zurückliegenden Rückstellprobe eines Probanden und dem Zeitpunkt des oGTT. y-Achse: Absolute Häufigkeit (■) und kumulierte Häufigkeit [%] (—■); nur Probanden mit neu diagnostiziertem Diabetes wurden betrachtet.

Man kann in Abbildungen 3.7.1 bis 3.7.5 gut erkennen, dass über 80% aller Probanden für einen Zeitraum von mindestens 6 Jahren Rückstellproben abgegeben haben. Für längere Zeiträume nimmt dann die Anzahl der Probanden, für die noch

Rückstellproben vorliegen, stark ab. Bei der Bewertung der Zeitverläufe der Lipoproteinkonzentrationen (s. Abschnitt 3.3) und der Zeitverläufe der Verhältnisse (s. Abschnitt 3.7.2) sollte man beachten, dass die Rückrechnungen bis zu 6 Jahren noch relativ gut die gemessenen Konzentrationen repräsentieren, es sich hingegen bei den Rückrechnungen von acht und zehn Jahren um Extrapolationen handelt. Außerdem erkennt man nochmal gut, dass die Gruppe der Probanden mit gestörter Glukosetoleranz relativ klein ist. Es sind also dort eher inhomogene Verteilungen zu erwarten.

3.7.2 Grafische Betrachtung Verteilungskurven der Lipoproteinkonzentrationen über die letzten 10 Jahre

Für die Auswertung wurden, wie in Abschnitt 3.2 erklärt, die Lipoproteinkonzentrationen nach der Zeit aufgetragen und anschließend mit Geradengleichungen gefittet. Diese Geradengleichung wurde benutzt, um für jeden Studienteilnehmer die Lipoproteinkonzentrationen für die verschiedenen Zeiten t zu berechnen: für $t=0$, also der Zeitpunkt an dem der oGTT durchgeführt wurde und die Probanden in Gesunde und Prädiabetiker mit gestörter Nüchtern glukose (IFG), gestörter Glukosetoleranz (IGT), mit IFG+IGT, und Diabetiker (T2D) eingeteilt wurden, sowie für frühere Zeitpunkte von zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor dem oGTT Diese Lipoproteinkonzentrationen der verschiedenen Jahre wurden verwendet, um Häufigkeitsverteilungen zu erstellen. Für die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilungen wurde eine Kerndichteschätzung mit Gaußkernen genutzt. Um zu verhindern, dass wenig aussagekräftige Geraden die Verteilung stören, wurden alle jene Geraden herausgefiltert bei denen der p -Wert für den Wert bei $t=0$ über 0,05 lag.

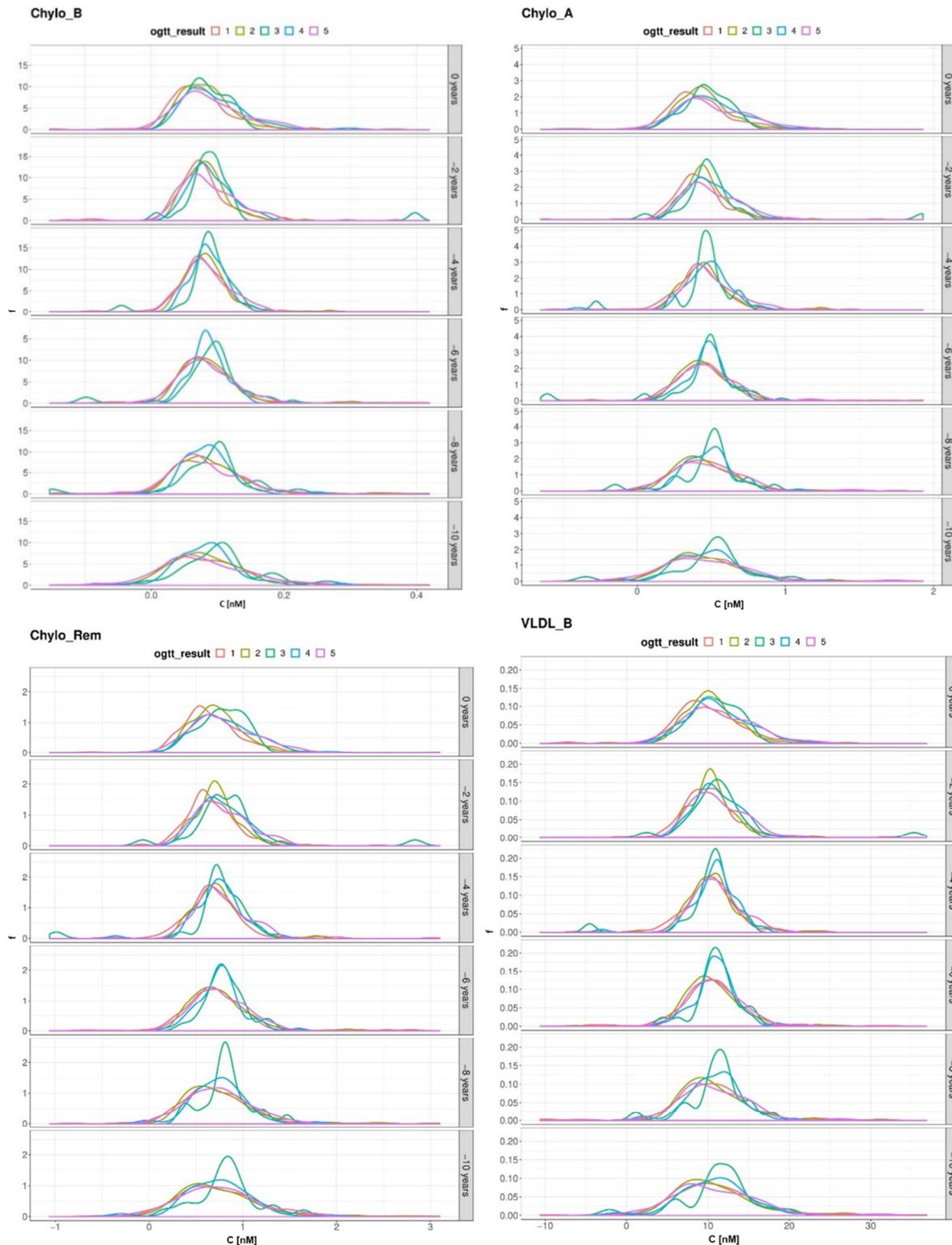


Abb 3.7.6. geglättete Häufigkeitsverteilung der Lipoproteinkonzentrationen von Chylo B (große Chylomikronen), Chylo A (kleine Chylomikronen), Chylo Rem (Chylomikronen Remnants), VLDL B (großes VLDL) für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. x-Achse: Lipoproteinkonzentration. y-Achse: Kerndichteschätzung. oGTT Ergebnis: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest (Gruppe 1 \square : Gesunde; Gruppe 2 \square : Probanden mit gestörter Nüchtern glukose; Gruppe 3 (\square) Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 4 (\square) Probanden mit gestörter Nüchtern glukose und gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 5 (\square) Diabetiker.

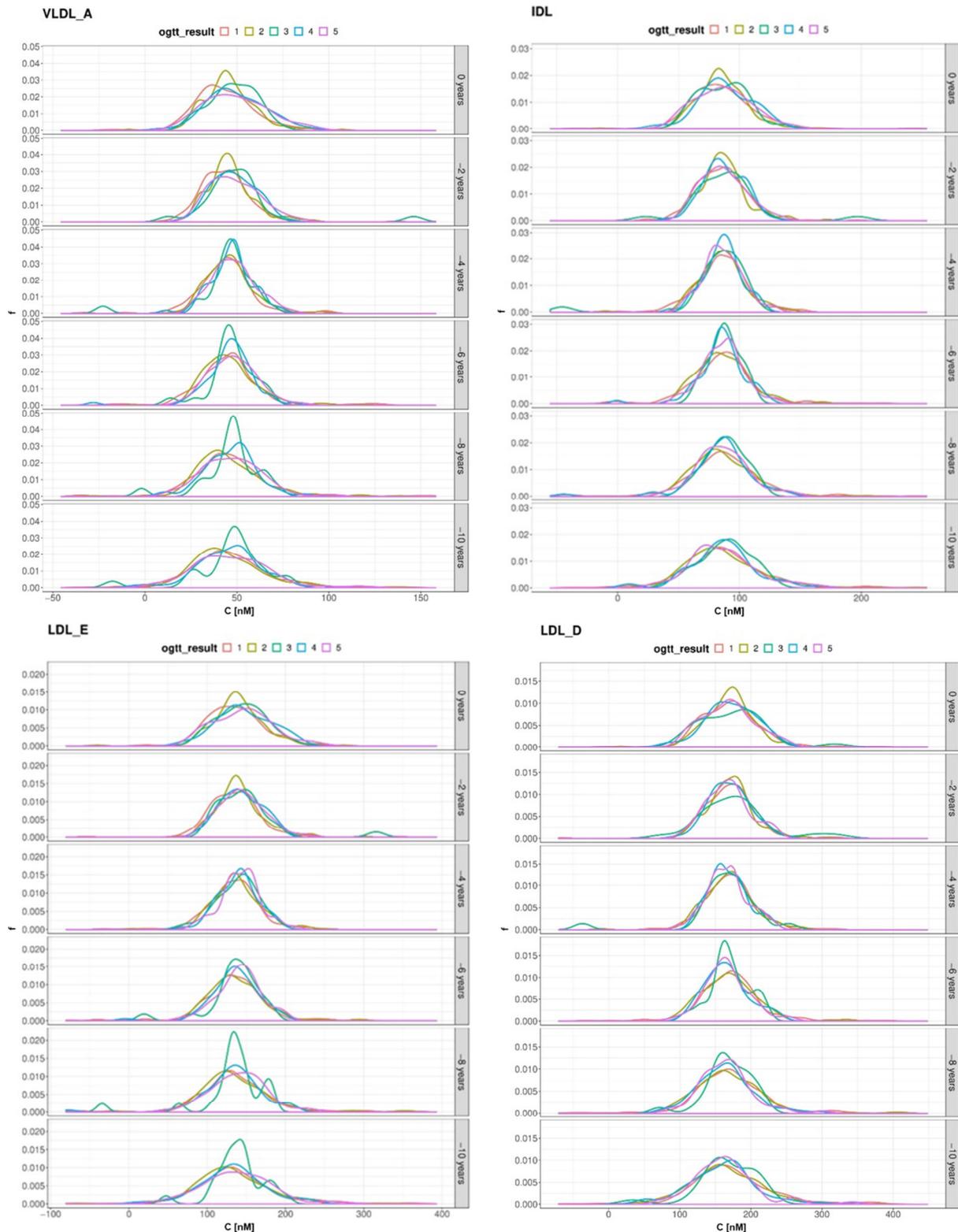


Abb 3.7.7. geglättete Häufigkeitsverteilung der Lipoproteinkonzentrationen von VLDL A (kleines VLDL), IDL, LDL E (sehr großes LDL), LDL D (großes LDL) für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. x-Achse: Lipoproteinkonzentration. y-Achse: Kerndichte der Kerndichteschätzung. oGTT Ergebnis: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest (Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose; Gruppe 3 (□) Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 4 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose und gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

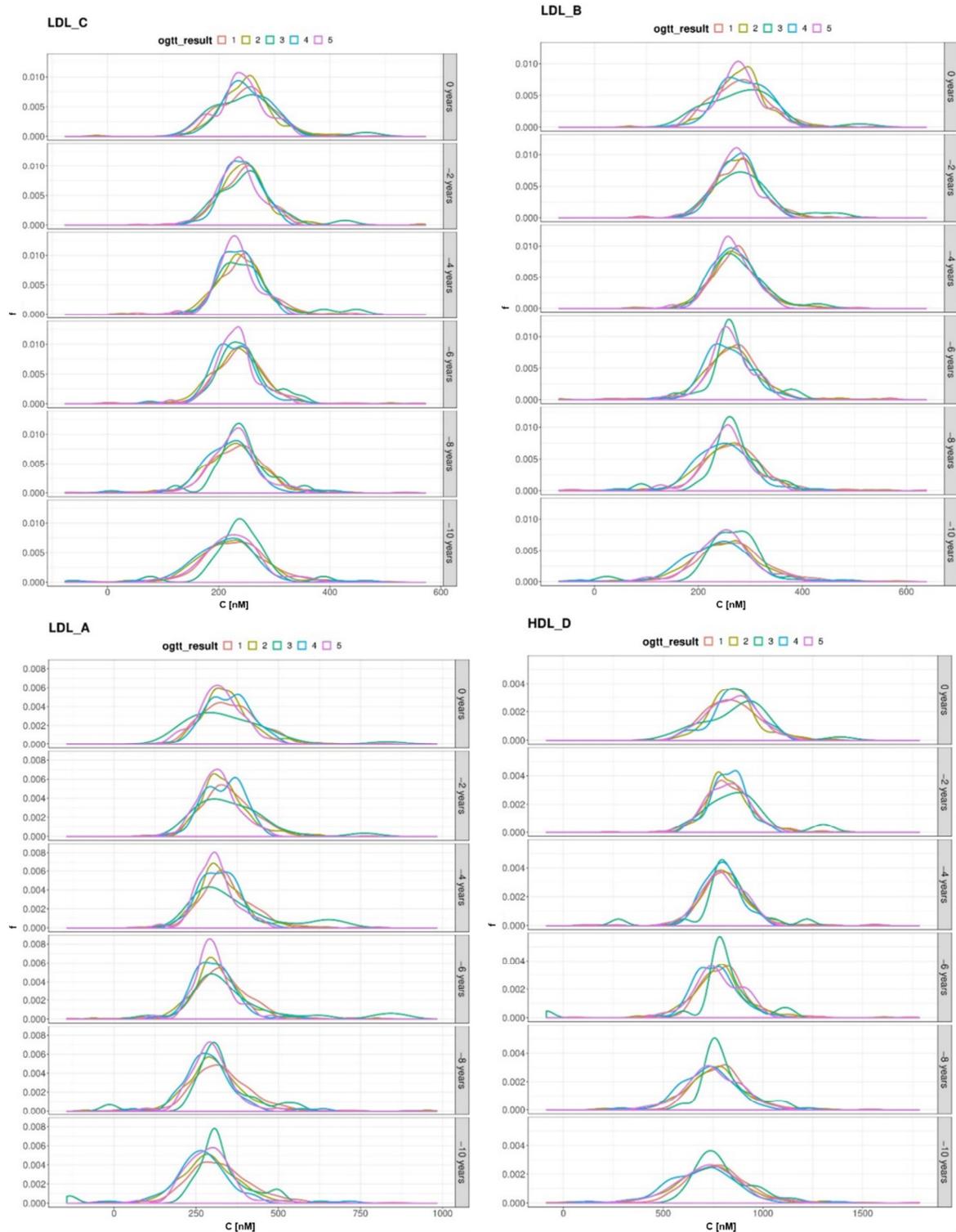


Abb
 Abbildung 3.7.8. Geplättete Häufigkeitsverteilung der Lipoproteinkonzentrationen von LDL C (mittleres LDL), LDL B (kleines LDL), LDL A (sehr kleines LDL), HDL D (sehr großes HDL) für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. x-Achse: Lipoproteinkonzentration. y-Achse: Kerndichte der Kerndichteschätzung. oGTT Ergebnis: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest (Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose; Gruppe 3 (□) : Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 4 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose und gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

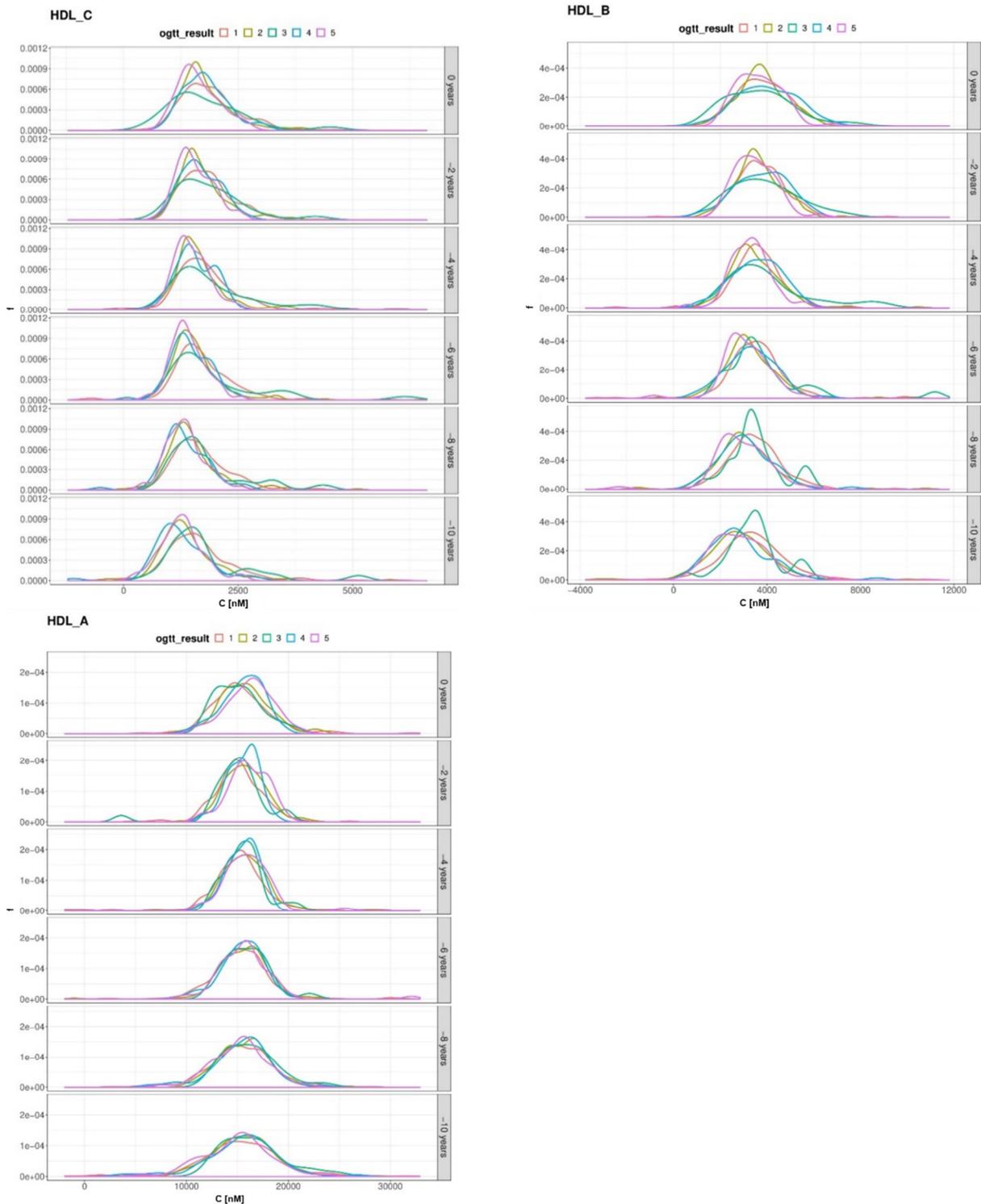


Abb 3.7.9. Geglättete Häufigkeitsverteilung der Lipoproteinkonzentrationen von HDL C (großes HDL), HDL B (mittleres HDL), HDL A (kleines HDL) für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. x-Achse: Lipoproteinkonzentration. y-Achse: Kerndichte der Kerndichteschätzung. OGTT Ergebnis: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest. Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose; Gruppe 3 (□) Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 4 (□): Probanden mit gestörter Nüchternglukose und gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 5 (□): Diabetiker.

In Abbildungen 3.7.6 bis 3.7.9 sind die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Lipoproteinsubgruppen bei Gesunden, bei Prädiabetikern mit IFG, IGT, IGT+IFG und Diabetikern (T2D) dargestellt, die in den Graphiken als Gruppe 1, 2, 3, 4 und 5 bezeichnet werden. Da man annehmen muss, dass die Lipoproteinmuster nicht nur von der (prä)diabetischen Stoffwechsellage, sondern auch von anderen Vorerkrankungen abhängen, würde man potentiell inhomogene Verteilungen bei einzelnen Lipoproteinen erwarten. Diese würden dann im einfachsten Fall zu einer Aufspaltung der Verteilungsfunktion mit zwei oder mehreren relativen Maxima führen. Falls die Rückextrapolation auf die Zeit $t=10$ Jahre ideal funktionieren würde, sollten die Insulin-abhängigen Effekte dort kleiner sein und daher homogenere Verteilungen erwartet werden. Das metabolische Syndrom ist durch eine Erhöhung der Konzentration von triglyceridhaltigen Lipoproteinen, eine Konzentrationserhöhung der kleinen LDL-Partikel und eine Erniedrigung von HDL gekennzeichnet. Die statistische Analyse zeigt dieses Bild für die Chylomikronen und VLDL, wo eine Erhöhung der Partikelzahlen im Vergleich zu Gesunden bei Probanden mit IFG, und Probanden mit IGT, und Probanden mit IFG+IGT sichtbar ist, welche am ausgeprägtesten bei Probanden mit IFG+IGT ist. Für ausgebildeten Diabetes sind dann etwas kleinere Konzentrationserhöhungen zu beobachten als bei IFG+IGT. Während in Gruppe 1 und 2 die Verteilungskurven von Chylomikronen und Chylomikronen Remnants weitgehend homogen sind, sind in den anderen Gruppen deutlich zwei Maxima bei $t = 0$ zu erkennen, d. h. es gibt deutlich zwei Gruppen mit verschiedenen Teilchenzahlen. 6 Jahre vorher sind die Verteilungen für alle Gruppen weitgehend homogen, die Verteilungen für die Gesunden und Probanden, bei denen später erhöhte Nüchternblutglukose oder Diabetes diagnostiziert wurde, haben sehr ähnliche Häufigkeitsverteilungen. Die Patientengruppen, die später eine eingeschränkte Glukosetoleranz aufweisen, (Gruppen 3 und 4) zeigen erhöhte Partikelkonzentrationen. Dieses generelle Bild ergibt sich auch für einen Zeitpunkt, der 10 Jahre vor dem Test liegt. Dies legt nahe, dass sich die Gruppe mit IGT und IGT+IFG, was die Chylomikronenkonzentrationen betrifft, auch schon zu früheren Zeitpunkten charakteristisch von den anderen unterscheidet.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für VLDL A, VLDL B und IDL. 6 Jahre vor der Diagnosestellung sind die Verteilungen für alle Gruppen recht homogen. Zu diesem Zeitpunkt unterscheiden sich die mittleren Partikelkonzentrationen aller

Probandengruppen nur wenig (obwohl tendenziell die Gruppen, für die eine gestörte Glukosetoleranz diagnostiziert wurde, wieder etwas höhere VLDL B Konzentration zeigen als die anderen Gruppen). Die Extrapolation zu $t = 10$ Jahre führt zu etwas inhomogeneren Verteilungen.

Bei nicht-nüchternen Probanden unterscheiden sich die mittleren LDL-Partikelkonzentrationen zur Zeit $t = 0$ nur bei Probanden der Gruppe IGT + IFG für LDL E von den Gesunden. Die Verteilungskurven (Abb. 3.7.7 und 3.7.8) sind aber manchmal deutlich unterschiedlich, einzelne sind klar zweigipfelig. Dies gilt auch für die Gruppe der Gesunden (LDL D, LDL B, LDL A), das heißt, auch diese Gruppe ist bezüglich Ihrer LDL-Lipoproteine nicht homogen. Überraschenderweise überlagern sich die Verteilungskurven von Gesunden und Probanden mit T2D für LDL D sogar perfekt. Dies suggeriert, dass LDL D Konzentrationen anscheinend von der diabetischen Stoffwechsellage wenig beeinflusst werden. Wie schon bei den großen Lipoproteinen zu beobachten, werden die Verteilungsfunktionen der verschiedenen Gruppen immer homogener und ähnlicher, je mehr man in der Zeit zurückgeht. Dies wäre auch zu erwarten, wenn sich die (prä)diabetische Stoffwechsellage erst mit der Zeit ausbildet.

Die Analyse der Anzahl der HDL-Partikel bei den nicht-nüchternen Probanden (Tabelle 3.6.3) ergab nur für die Gruppe IFG eine signifikante Abweichung von den Gesunden bei HDL C. Die Konzentrationsverteilung von HDL-C der Gesunden ist ansatzweise inhomogen und zeigt zwei relative Maxima. Diese Aufspaltung ist auch schon zwei Jahre vorher zu sehen, für frühere Zeiten ergibt sich eine homogenere Verteilung mit einer Verschiebung des Maximums zu kleineren HDL C Konzentrationen. Wie auch schon bei den anderen Lipoproteinen beobachtet, sind die Verteilungen der Lipoproteinkonzentrationen ähnlicher und homogener in den Rückstellproben 10 und 6 Jahren vor der Diagnosestellung und Einteilung in die Gruppen der Gesunden, Prädiabetiker und Diabetiker wie es zu erwarten wäre, wenn in dieser Zeit ein erheblicher Teil der Probanden noch gesund gewesen wären. Ein typisches Bild zeigt HDL A. 10 bis 6 Jahre vor der Diagnosestellung sind die Verteilungen in allen Gruppen homogen. Erst dann beginnen sich die Kurven zu trennen, die Verteilung der Diabetiker ist zweigipfelig 2 Jahre vor Diagnosestellung und ist dann zum Zeitpunkt $t = 0$ vollkommen zu höheren Werten verschoben.

Ganz allgemein erkennt man, dass häufig die Verteilungen von Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern bei t=6 Jahre am ehesten übereinanderliegen, wohingegen die Verteilungen bei t=8 Jahre und t=10 Jahre wieder weiter auseinanderliegen. Dies kann damit erklärt werden, dass die länger zurückliegenden Zeitpunkte Extrapolationen sind, bei denen nur wenige Proben vorliegen. Zusätzlich sind die Verteilungen von Gruppe 3 (gestörte Glukosetoleranz) oft relativ inhomogen, was auch an der, im Vergleich zu den anderen Gruppen, geringeren Probandenzahl liegen kann.

3.8 Korrelationen zwischen den Konzentrationsverhältnissen einzelner Lipoproteinsubklassen

Im klinischen Alltag wird bei der Beurteilung kardiovaskulärer Ereignisse anhand von Lipoproteinen neben dem HDL- und LDL-Cholesterol auch das Verhältnis von LDL-Cholesterol zu HDL-Cholesterol betrachtet. Im Folgenden wurde untersucht, ob paarweise Kombinationen der Konzentrationen einzelner bestimmter Verhältnisse von Lipoproteinsubklassen in Bezug auf Diabetes aussagekräftiger sind als die einzelnen Lipoproteinkonzentrationen. Dafür wurden für jede abgegebene Blutprobe der Quotient und das Produkt zwischen den einzelnen Lipoproteinkonzentrationen berechnet. Diese Verhältnisse wurden für jeden Probanden nach der Zeit aufgetragen und dann mit einer Gerade gefittet. Mithilfe dieser Geraden wurden dann für jeden Probanden für alle Verhältnisse die Werte für den Zeitpunkt des oGTTs berechnet.

3.8.1 Prozentuale Unterschiede der Quotienten und Produkte der Lipoproteinkonzentrationen zwischen Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern

Nachdem, wie in Abschnitt 3.8 erklärt, die Produkte und Quotienten aus den Lipoproteinenkonzentrationen berechnet wurden, sollten die prozentualen Unterschiede zwischen den Gesunden und den (Prä-)Diabetikern bestimmt werden. Dafür wurden für die Gruppe von Gesunden, die Gruppen der verschiedenen Prädiabetiker und die der Diabetiker der Median aller Verhältnisse und Produkte gebildet. Dann wurde berechnet, um wie viel Prozent sich die Mediane der Prädiabetiker- und Diabetiker-Gruppen von den Gesunden unterscheiden. Es wurden die Unterschiede aller möglichen paarweisen Verhältnisse und Produkte berechnet.

Abbildung 3.8.1 zeigt einen Ausschnitt aus der graphischen Darstellung aller prozentualen Veränderungen der Produkte und Quotienten. Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen, die größer als 50 % sind, werden beobachtet. Da die Produkte und Quotienten hier jeweils für einzelne Probanden gebildet wurden, können sich prinzipiell wesentlich höhere Unterschiede zur Gruppe der Gesunden ergeben als aus den Mittelwerten berechnet werden können. Die Unterschiede der Produkte von Mittelwerten sollten maximal für das Produkt der Chylomikronen A und B Konzentrationen sein. Hier berechnet man nur einen Unterschied von 6.5 %. In Abbildung 3.8.1 zeigen die (Prä-)Diabetikergruppen an vielen Stellen ein ähnliches Muster der kombinierten Konzentrationen. Die Probanden mit gestörter Nüchtern glukose zeigen die geringsten prozentualen Veränderungen relativ zu der Gruppe der Gesunden.

Die größten Veränderungen im Vergleich zum Gesunden sind bei den Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT) und bei den Probanden mit einer Kombination aus gestörter Glukosetoleranz und gestörter Nüchtern glukose (IFG + IGT) zu sehen. Bei den Probanden mit neu diagnostiziertem Diabetes Mellitus Typ II hingegen sind die Unterschiede zu den Gesunden weniger stark.

Vom Muster der betroffenen Wertepaare her scheinen die Probanden mit IFG am ehesten den Probanden mit vollausgebildetem Diabetes (T2D) zu ähneln. Vor allem die Produkte aus den Konzentrationen kleiner Chylomikronen und Konzentrationen unterschiedlicher LDL Untergruppen sind bei T2D auffällig niedrig, sogar noch niedriger als bei den Probanden mit gestörter Nüchtern glukose (siehe lila Kasten). Bei den Probanden mit gestörter Glukosetoleranz sind besonders die Produkte und Quotienten mit Chylomikronen Remnants höher als bei den Gesunden, die Unterschiede sind sogar größer als bei allen anderen (Prä)diabetesgruppen (schwarzer Kasten).

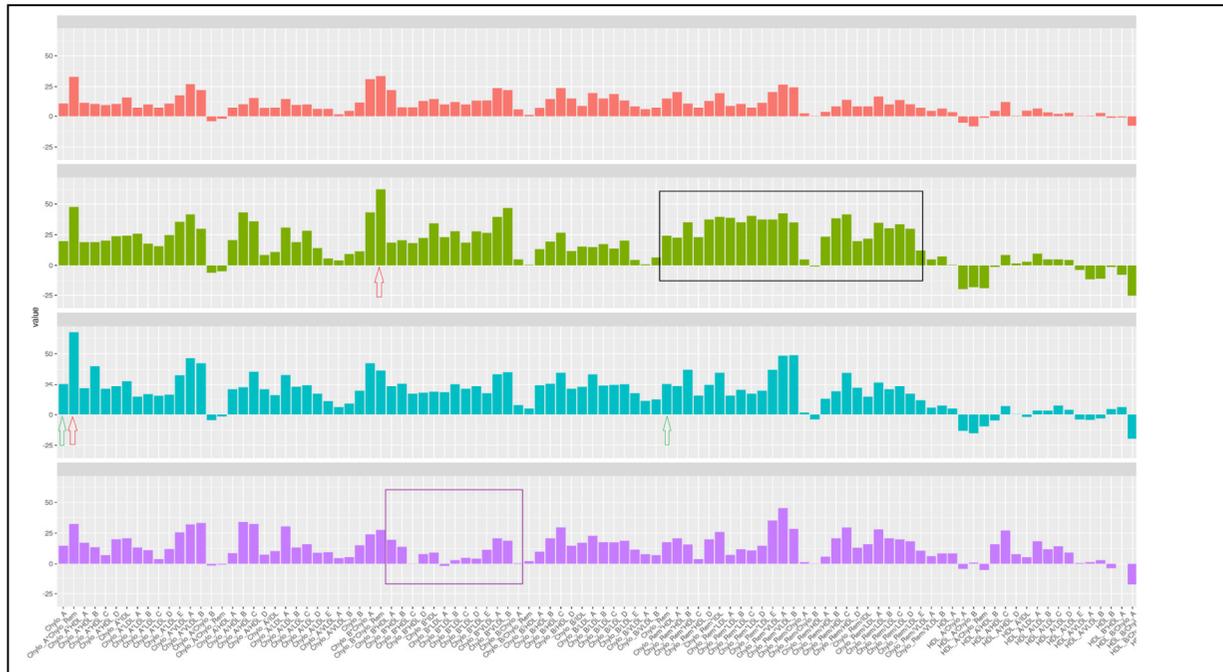


Abbildung 3.8.1. Charakteristischer Ausschnitt aus der grafischen Darstellung der prozentualen Unterschiede zwischen allen Verhältnissen der Lipoproteinsubklassen zueinander. Verwendet wurde der Median der mithilfe der Geradenfits berechneten Werte für $t=0$. value: prozentualer Unterschied des Medians eines Verhältnisses zwischen (Prä-)Diabetikern. Probanden mit (■) IFG; (■) IGT; (■) IFG&IGT; (■) T2D und Gesunden.

Die Unterschiede zwischen den Produkten/Verhältnissen der Konzentrationen sind wesentlich größer als die Unterschiede zwischen den einzelnen Lipoproteinsubklassen. Beispielsweise sind sowohl der Unterschied zwischen den Probanden mit IFG + IGT und den Gesunden bezüglich des Produktes aus kleinen Chylomikronen und Chylomikronen Remnants und der Unterschied zwischen Probanden mit IGT und Gesunden bezüglich des Produktes aus großen Chylomikronen und Chylomikronen Remnants über 60% (rote Pfeile in Abb. 3.8.1). Das sind wesentlich größere Unterschiede als die prozentualen Unterschiede in Bezug auf die Konzentrationen von einzelnen Lipoproteingruppen: Der Unterschied des Produktes der großen Chylomikronen und der Chylomikronen Remnants zwischen Gesunden und Probanden mit IFG + IGT beträgt jeweils nur 26% (grüne Pfeile).

Um nochmal die relevantesten Quotienten und Produkte zu betrachten, wurden die Verhältnisse gefiltert: Abbildung 3.8.2 zeigt jetzt alle Produkte und Quotienten, bei denen die prozentualen Veränderungen der (Prä)diabetiker zu den Gesunden über 20% betragen. Auffällig (und zu erwarten ist auch hier, dass große Unterschiede > 20 % fast ausschließlich bei Produkten/Verhältnissen zu beobachten sind, die eine der Chylomikronen- oder VLDL-Klassen enthalten. Ausnahmen sind die Verhältnisse von HDL C/HDL A (T2D), HDL C/HDL D (IGT, T2D), LDL E/HDL C (IGT), LDL E/LDL A (IGT).

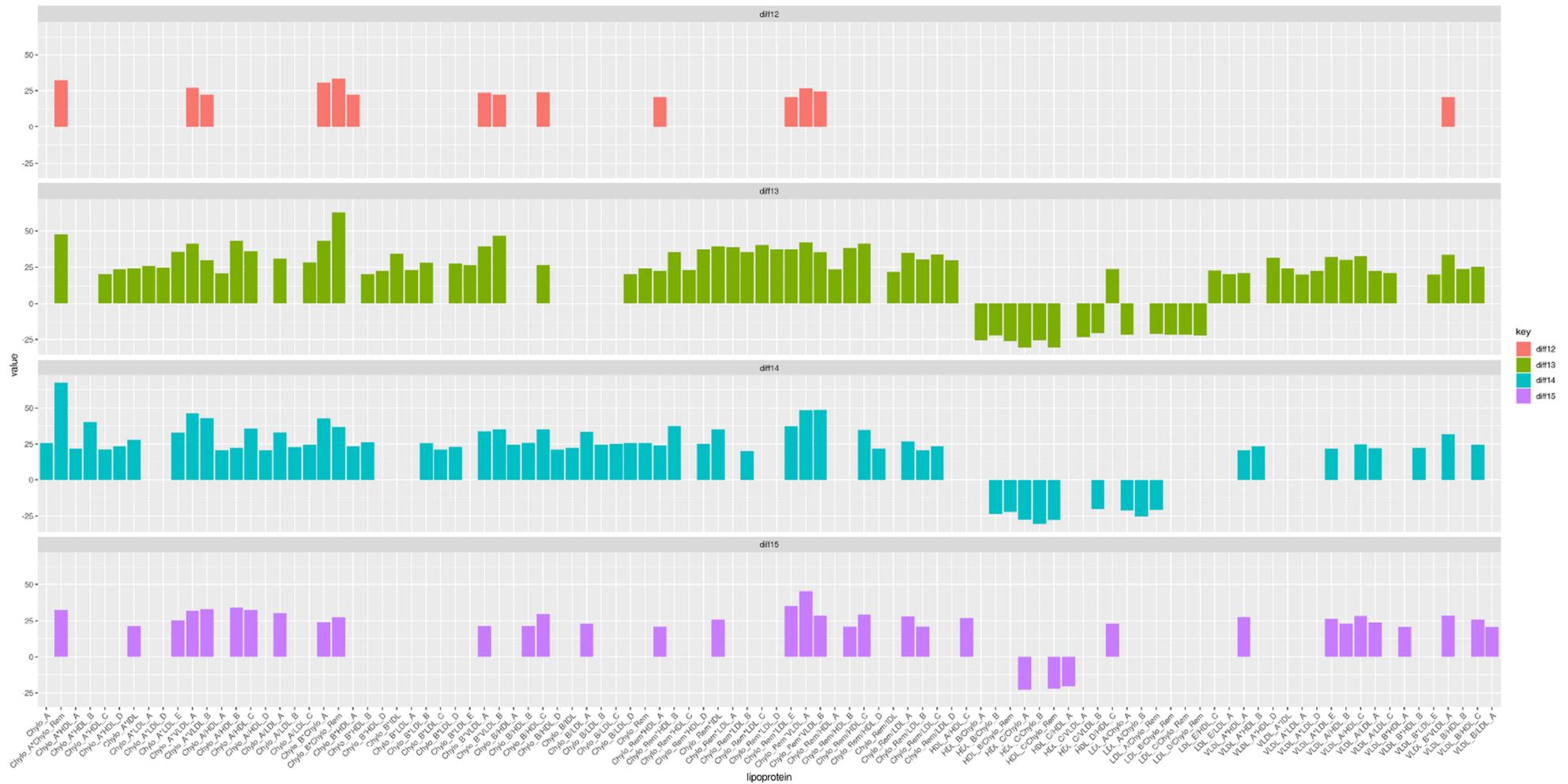


Abbildung 3.8.2. Grafische Darstellung der prozentualen Unterschiede zwischen Verhältnissen und Produkten der Lipoproteinkonzentrationen. value: prozentualer Unterschied des Medians eines Verhältnisses zwischen (Prä-)Diabetikern (Probanden mit (■) IFG; (■) IGT; (■) IFG&IGT; (■) Diabetes) und Gesunden. Alle Unterschiede unter 20% wurden herausgefiltert. Verwendet wurden die mithilfe der Geradenfits berechneten Werte für $t=0$.

3.8.2 Zeitabhängigkeit der kombinierten Lipoproteinkonzentrationen.

In Abschnitt 3.7.2 wurden bereits die Häufigkeitsverteilungen über die Zeitverläufe für die einzelnen Lipoproteinklassen betrachtet. Auf die gleiche Art wurden auch die Produkte und Quotienten der Lipoproteinuntergruppen zueinander betrachtet. Für jede abgegebene Rückstellprobe wurden für jeden Probanden zwischen allen Lipoproteingruppen Quotienten und Produkte aus den Konzentrationen berechnet. Diese wurden, wie in Abschnitt 3.2. erklärt, mithilfe von Geraden über die Zeit gefittet, um einen Wert für $t=0$ zu erhalten. Alle Geraden mit $p > 0.05$ für den Zeitpunkt des oGTTs wurden herausgefiltert. Dann wurde für den Zeitpunkt des oGTTs, sowie für zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor der oGTT-Analyse die Verteilungen berechnet und mit Hilfe eines Kernschätzer geglättet. Da es sich um 315 Verhältnisse handelt, wird in den Abbildungen 3.8.3 bis 3.8.6 nur eine Auswahl der interessantesten Verteilungen gezeigt. Im Allgemeinen kann man erkennen, dass die Aufspaltung zwischen den Verhältnissen der Lipoproteingruppen zueinander stärker ist als zwischen den einzelnen Lipoproteingruppen. Interessant ist, dass sich die Verhältnisse teilweise anders verhalten als die einzelnen Lipoproteingruppen. Denn obwohl IDL allein bei Gesunden und (Prä-)Diabetikern eine recht ähnliche Verteilung zeigt, erkennt man bei dem Quotienten IDL/VLDL A sichtbare Unterschiede in den Verteilungen der gesunden und erkrankten Probanden. Der Quotient HDL D/HDL C zeigt schon bei den länger zurückliegenden Rückstellproben große Unterschiede zwischen gesunden und an Diabetes erkrankten. Scheinbar bestanden dort diese Unterschiede schon bei vielen Probanden Jahre vor Diagnosestellung und blieben recht konstant. Hingegen sieht man bei Probanden, die zum Zeitpunkt $t=0$ in Gruppe 4 eingeordnet wurden (gestörte Glukosetoleranz und gestörte Nüchtern glukose) bei dem Verhältnis HDL D/HDL C noch eine leichte Verschlechterung im Verlauf. Alle Verhältnisse zwischen LDL E und kleineren LDLs zeigen deutliche Unterschiede zwischen Gesunden und (Prä-)Diabetikern.

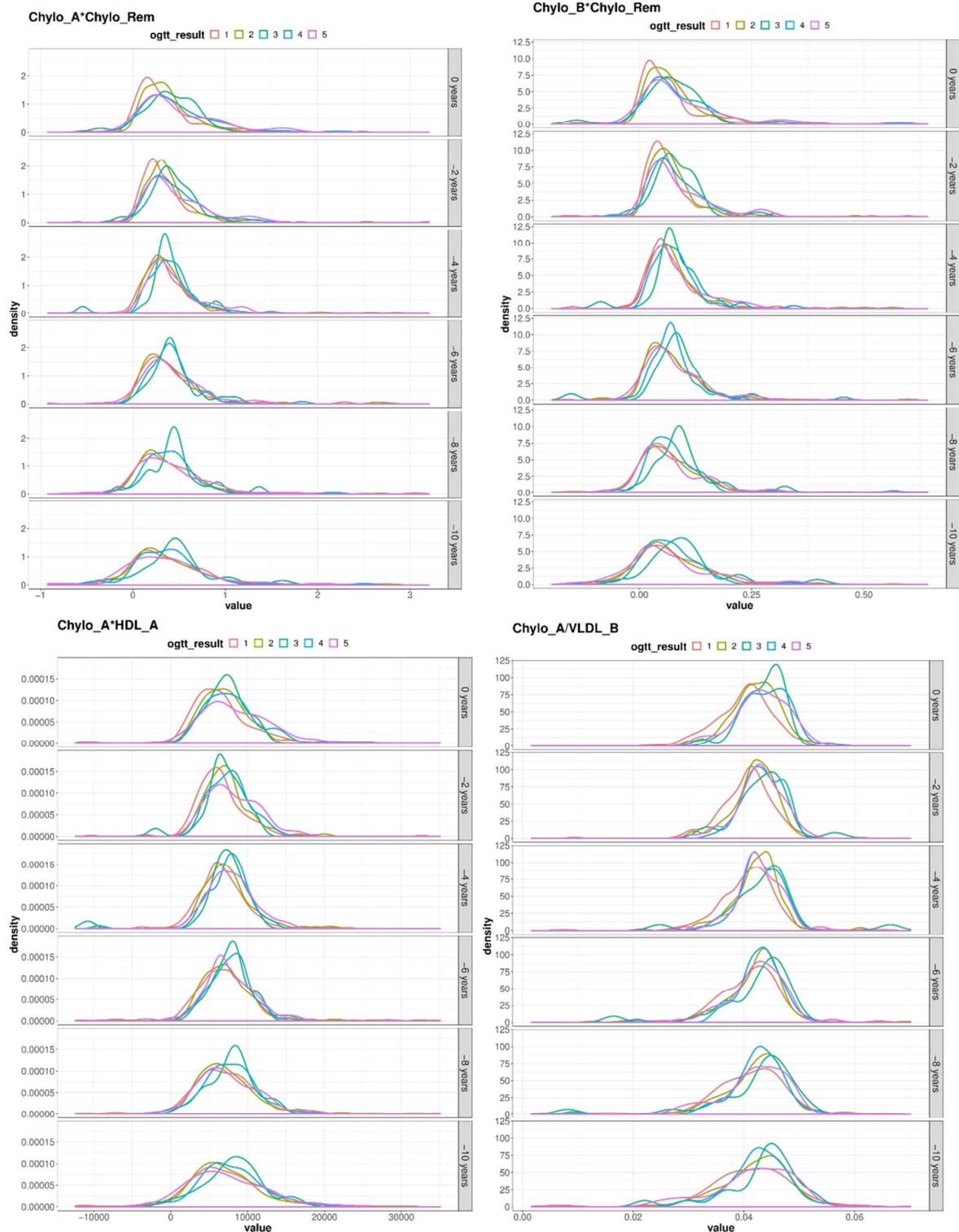


Abbildung 3.8.3. Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung von den Produkten und Quotienten der Konzentrationen verschiedener Lipoproteingruppen für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. Chylo: Chylomikronen; density: Kerndichte der Kernel Funktion; *Multiplikation; /Division; ogtt result: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest. Gruppe 1 (□): Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose; Gruppe 3 (□): Probanden mit gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 4 (□) Probanden mit gestörter Nüchternglukose und gestörter Glukosetoleranz; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

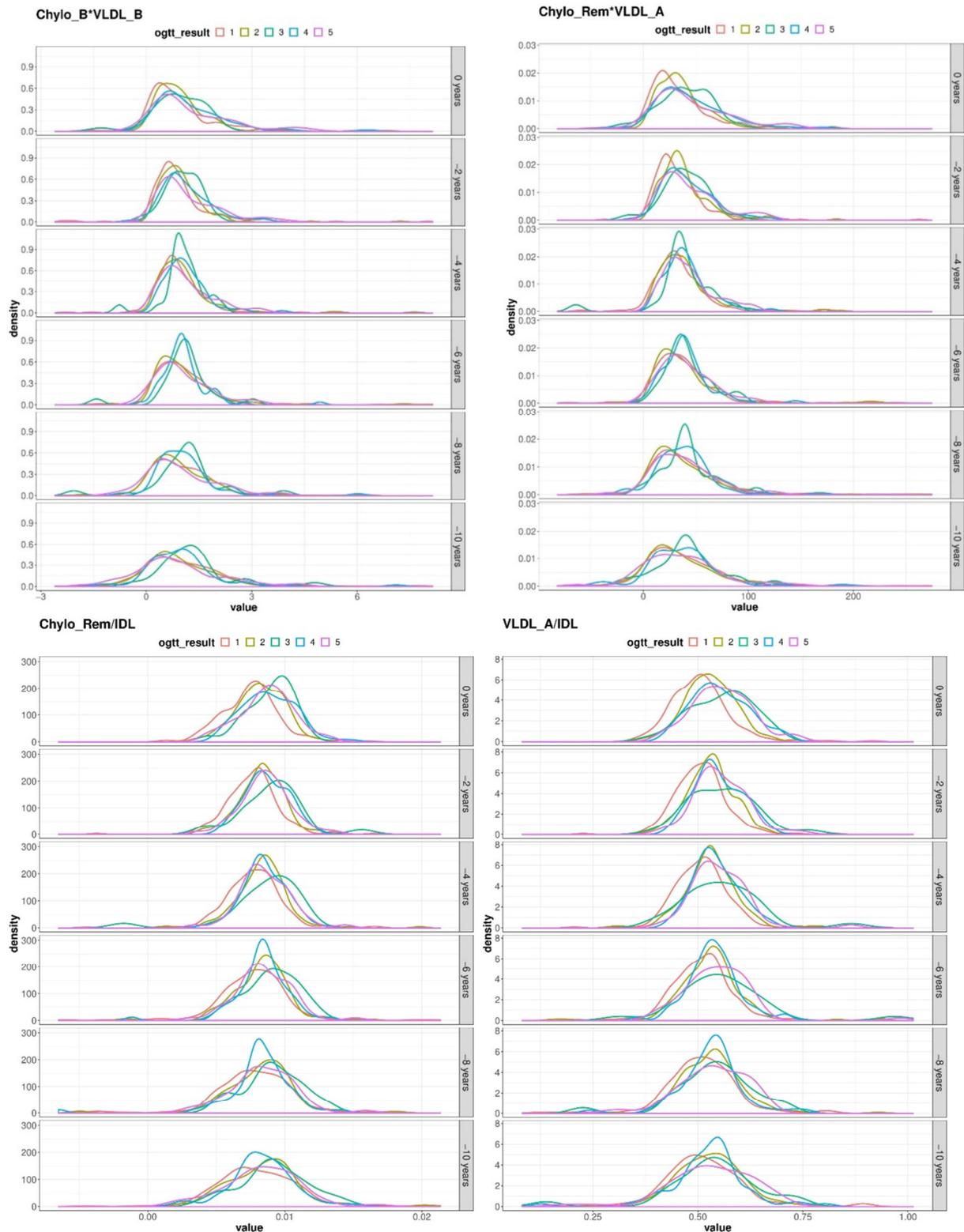


Abbildung 3.8.4. Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen von den Produkten und Quotienten der Konzentrationen verschiedener Lipoproteingruppen für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. Chylo: Chylomikronen; density: Kerndichte der Kernel Funktion; *Multiplikation; /Division; ogtt result: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest. Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit IFG; Gruppe 3 (□) Probanden mit IGT; Gruppe 4 (□) Probanden mit IFG+IGT; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

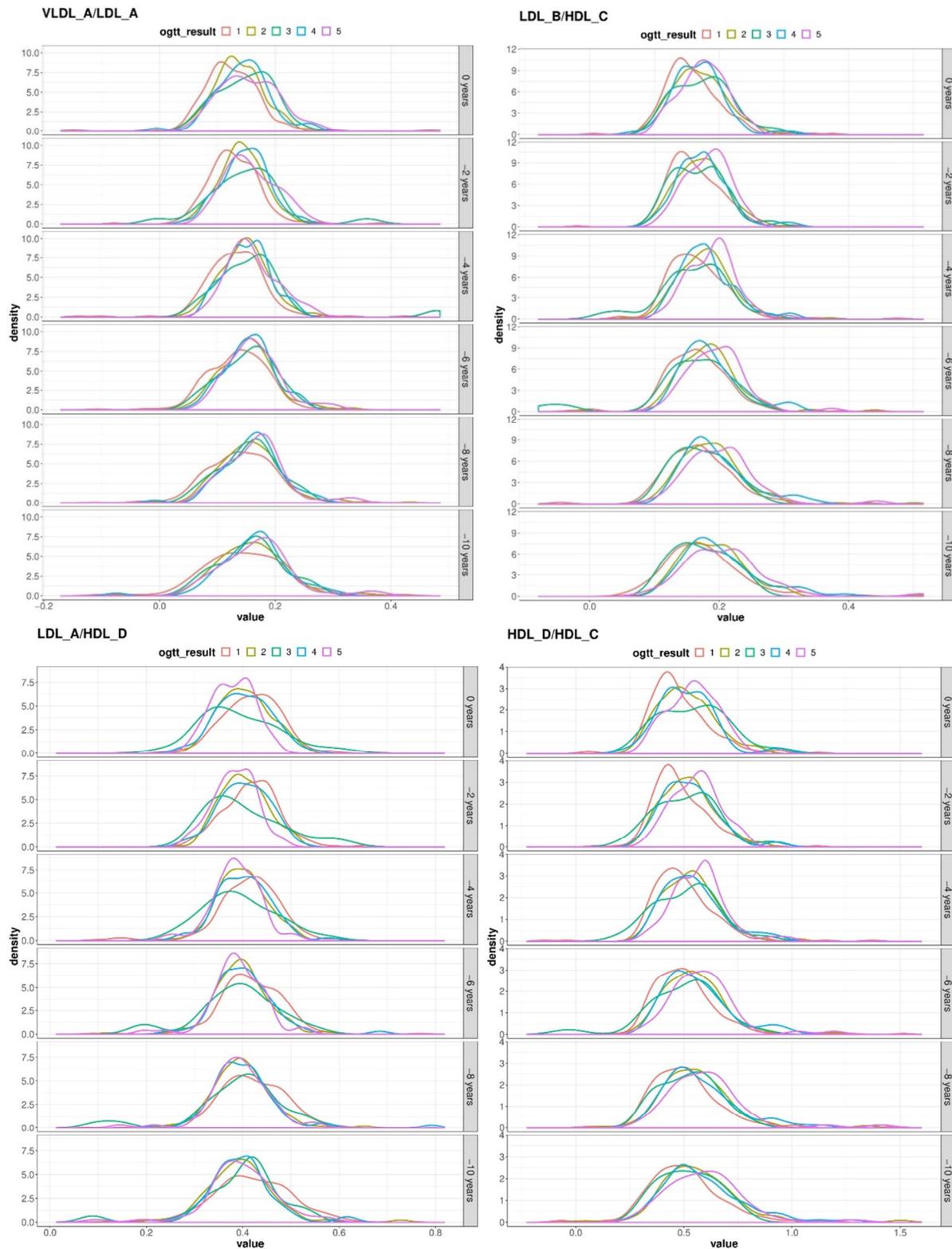


Abb 3.8.5. Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung von den Produkten und Quotienten der Konzentrationen verschiedener Lipoproteingruppen für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. density: Kerndichte der Kernel Funktion; *Multiplikation; /Division; ogtt result: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest. Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit IFG; Gruppe 3 (□) Probanden mit IGT; Gruppe 4 (□) Probanden mit IFG+IGT; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

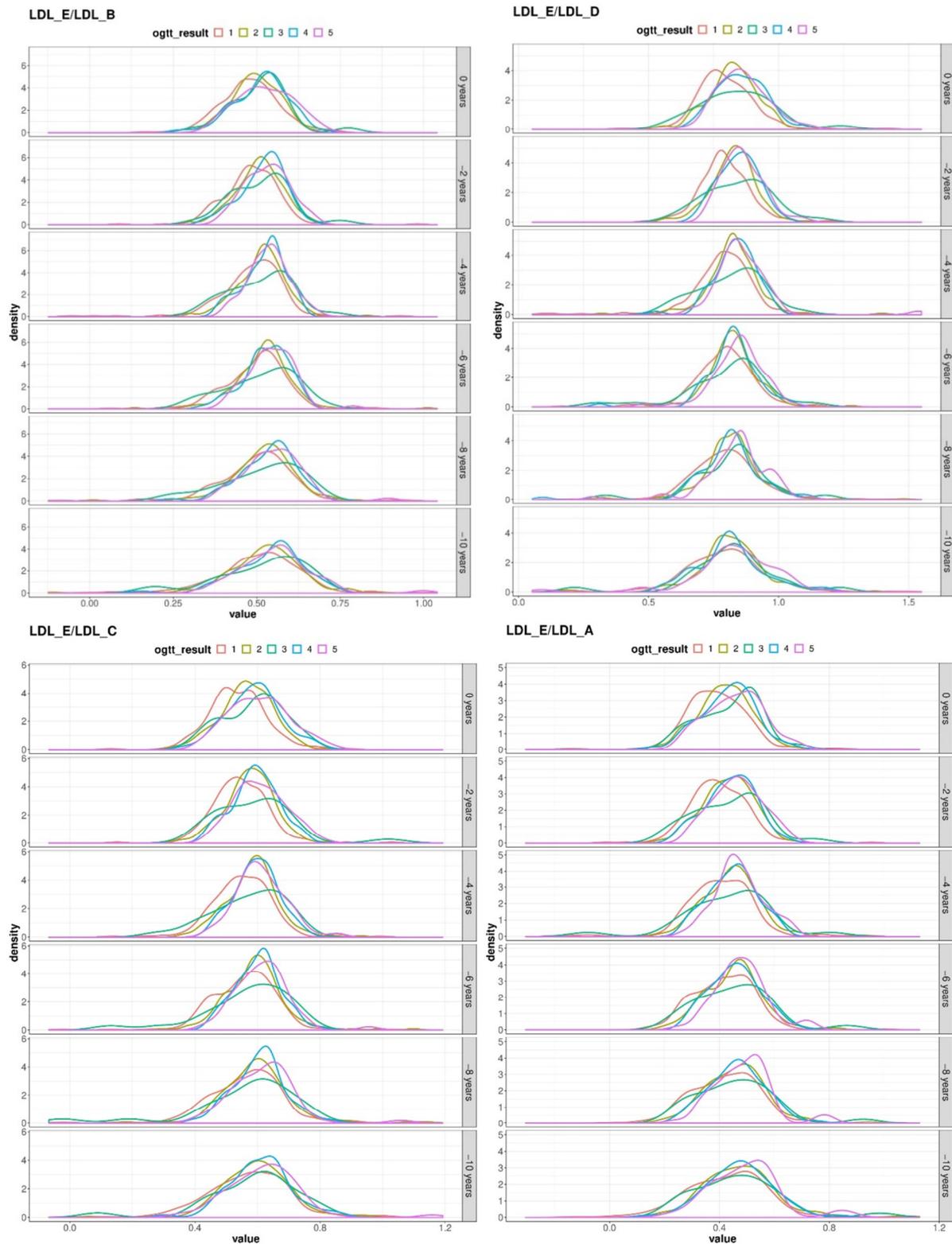


Abbildung 3.8.6. Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung von den Produkten und Quotienten der Konzentrationen verschiedener Lipoproteingruppen für 0 Jahre (Zeitpunkt der Einteilung in Gesunde und (Prä-)Diabetiker durch oGTT), sowie zwei, vier, sechs, acht und zehn Jahre vor Durchführung des oGTTs. density: Kerndichte der Kernel Funktion; *Multiplikation; /Division; ogtt result: Gruppeneinteilung nach oralen Glukosetoleranztest. Gruppe 1 (□) Gesunde; Gruppe 2 (□) Probanden mit IFG; Gruppe 3 (□) Probanden mit IGT; Gruppe 4 (□) Probanden mit IFG+IGT; Gruppe 5 (□) Diabetiker.

4 Diskussion

4.1 Das untersuchte Patientenkollektiv

Die in dieser Studie untersuchten Probanden stammten aus einem Kollektiv regelmäßiger bayerischer Blutspender im Alter von durchschnittlich 54.1 Jahren und einem durchschnittlichen BMI von 28.8. 37% der Probanden waren adipös. Die Gruppe der Diabetiker war etwas älter (3.5 Jahre) und hatte einen etwas höheren BMI (2.3) als die Gruppe der Gesunden. Es ist nicht zu erwarten, dass diese relativ kleinen Unterschiede in Alter und BMI die beobachteten Unterschiede in den Lipoproteinkonzentrationen zwischen den Gruppen erklären können. Die Blutspender in Bayern gehören mehrheitlich der kaukasischen Rasse an. Unterschiede zeigen sich im Vergleich mit anderen Studien, welche ebenfalls den Zusammenhang von mit NMR-Spektroskopie gemessenen Lipoproteinen und Diabetes mellitus Typ 2 untersuchten:

Probanden der Studie von Hodge et al. (2009) wurden in der australischen Metropole Melbourne rekrutiert. Es wurden verstärkt südeuropäische Immigranten für größere genetische Variabilität in die Studie eingeschlossen: Neben Australiern wurden viele in Italien oder Griechenland Geborene untersucht. Der Median des Alters lag für die Kontrollgruppe bei 56 Jahren und für Diabetiker bei 59 Jahren. Gesunde hatten einen BMI von 26,6 kg/m², Diabetiker einen BMI von 30,5 kg/m².

Die Studie von Festa et al (2005) wurde im Rahmen der Insulin Resistance Atherosclerosis Study durchgeführt. Ethnisch wurden in etwa gleich viele Hispanics, Non-Hispanic Whites und Afro-Americans für die Studie rekrutiert. Das Alter der Probanden, welche später Diabetes entwickeln sollten, lag bei durchschnittlich 65 Jahren, das der Gesunden bei 54 Jahren. Zukünftige Diabetiker hatten einen durchschnittlichen BMI von 30,9 kg/m², Gesunde einen BMI von 27,8 kg/m².

Bei der von Mora et al. (2010) mit den Probanden der Women's Health Study durchgeführten Studie wurden anders als bei den anderen Studien nur Frauen untersucht. Sie arbeiteten alle in den USA als medizinische Fachkräfte. Zum Studieneintritt hatten sowohl zukünftige Diabetiker als auch gesunde ein Alter von 54,6 Jahren. Der Nachbeobachtungszeitraum betrug 13 Jahre. Zukünftige Diabetiker hatten einen durchschnittlichen BMI von 30.6 kg/m², gesunde einen BMI von 25.4 kg/m². Rekrutiert wurden die Probanden über die Pflegekammern aller US-Staaten (mit Ausnahme von Hawaii) und Puerto Rico. Ebenso wurden Informationen zur

Teilnahme an der Studie Mitgliedern weiterer Berufsvereinigungen des medizinischen Bereichs weitergegeben.

Die Probanden der Studie von Wang et al. (2012) waren finnische Männer. Das Alter von Gesunden, Prädiabetikern und Diabetikern unterschied sich kaum: Es betrug 57 Jahre für Gesunde und Probanden mit IFG, 60 Jahre Probanden mit IGT, 59 Jahre bei Probanden mit kombinierter IFG und IGT und bei Diabetikern. Der BMI betrug durchschnittlich 25.7 kg/m² bei Gesunden, 27.0 kg/m² bei Probanden mit IFG, ebenso 27.0 kg/m² bei Probanden mit IGT, 28.9 kg/m² bei Probanden mit sowohl IGT als auch IFG, 29.7 kg/m² bei neu diagnostizierten Diabetikern.

Die Probanden der Studie von Sokooti et al. (2021) wurden in den Niederlanden rekrutiert. Die 265 Probanden, die im Verlauf der Studie Diabetes entwickelten (Nachbeobachtungszeitraum 7,3 Jahre) waren im Schnitt 57 Jahre alt, 38% von Ihnen waren weiblich, und hatten einen durchschnittlichen BMI von 29,8. Die 4563 Probanden, die im Nachbeobachtungszeitraum keinen Diabetes entwickelten, hatten durchschnittlich einen BMI von 26.2, waren 52,5 Jahre alt und zu 51 % weiblich.

In die US-amerikanischen Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, welche unter anderem von Mackey et al. (2015) verwendet wurde, wurden Probanden verschiedener Herkünfte im Alter von 45 bis 84 Jahren eingeschlossen: Weiße (42%), African-Americans (25%), Hispanics (21%), und Asiaten (12%) welche größtenteils aus China stammten. Das Alter von Diabetikern mit 61 Jahren glich dem durchschnittlichen Alter der Probanden, die innerhalb der durchschnittlichen Nachbeobachtungszeit von 7,7 Jahren kein Diabetes entwickelten, von 62 Jahren. Nicht-Diabetiker hatten einen durchschnittlichen BMI von 27.6, Diabetiker von 31.1.

Während sich also andere Studien in Bezug auf durchschnittliches Alter und BMI der Probanden nicht stark von unserem Kollektiv unterscheiden, untersuchen alle Studien unterschiedliche Ethnien und Nationalitäten.

Von den untersuchten Probanden unserer Studie gibt es Rückstellproben über einen Zeitraum von bis zu 10 Jahren, für 80 % der Probanden für mindestens 6 Jahre. Bei allen Probanden wurde der diabetische Status mit Hilfe des Goldstandards oraler Glukosetoleranztest (oGTT) definiert, der im nüchternen Zustand durchgeführt wird. Für die Probanden mit T2D war vor dem oGTT kein Diabetes bekannt gewesen und somit wurden auch keine Antidiabetika eingenommen. Leider wurden nicht bei allen

Probanden Serumproben für die NMR-Analyse direkt vor dem oGTT genommen, so dass im nüchternen Zustand die Lipoproteinanalytik nur bei einer Gruppe von 432 Blutspendern durchführbar war.

Gewöhnlich kommen die Blutspender nach der Arbeit zum Blutspenden, haben also meist ein Mittagessen zu sich genommen, welches einige Stunden zurückliegt. Um Variationen, die vom Zeitpunkt der Mahlzeiten abhängen zu reduzieren, wurden die Lipoproteinmuster für den Zeitpunkt $t = 0$ aus den Rückstellproben linear extrapoliert.

4.2 Unterschiede der Lipoproteinmuster im nüchternen und nichtnüchternen Zustand.

In den meisten Studien, bei denen der Zusammenhang zwischen mit NMR-Spektroskopie gemessenen Lipoproteinen und Diabetes untersucht wurde, wurden Nüchternblutproben verwendet. In den über die nicht-nüchternen Rückstellproben gemittelten Werten waren, anders als bei den nüchtern gemessenen, die triglyceridhaltigen Lipoproteine Chylomikronen A, Chylomikronen Remnants und VLDL A in allen Gruppen der Prädiabetiker und der Diabetiker gegenüber gesunden Testpersonen signifikant erhöht (Tabelle 3.6.1). Die Erhöhung der Chylomikronen B ist nur bei der Gruppe mit IGT nicht signifikant, die Summe der Chylomikronen ist bei allen bis auf die Gruppe mit IFG signifikant erhöht. Bei der Gruppe IGT + IFG überschreitet auch der Anstieg der VLDL B-Partikelzahlen unsere Signifikanzgrenze. Eine tendenzielle Erhöhung der entsprechenden Partikelzahlen wird auch in allen restlichen Prädiabetikergruppen und bei Diabetikern beobachtet, die allerdings nicht das von uns definierte Signifikanzniveau von $p \leq 0.05$ erreicht. Diese Erhöhung der größeren, triglyceridreichen Teilchen lässt sich durch die bereits bekannte postprandiale Hypertriglyceridämie bei Diabetikern erklären. Hingegen sind bei den nüchternen Probanden anstelle der größeren triglyceridreichen Lipoproteine eher die kleineren Lipoproteine (HDL und LDL) signifikant verändert. Insgesamt sind im nüchternen Zustand weniger Veränderungen zu sehen. Bei den nüchternen Patienten war neben den großen Lipoproteinen auch HDL A bei Diabetikern, nicht aber bei Prädiabetikern signifikant erhöht. Eine sogar noch stärkere Erhöhung findet sich bei den nicht-nüchternen Probanden, die aber trotzdem das Signifikanzniveau nicht erreicht. Bei den Diabetikern ist zusätzlich LDL E stark erhöht, allerdings wird hier das Signifikanzniveau nur bei den nicht-nüchternen Probanden erreicht. Bei den nüchternen Probanden findet man eine signifikante Erniedrigung der LDL A- und

HDL C-Partikelzahlen in den Gruppen mit IFG und T2D. Qualitativ ähnliche Ergebnisse findet man auch für die nicht-nüchternen Probanden, allerdings ist die Abnahme nur für Probanden mit erhöhter Nüchtern glukose für HDL C signifikant. Auch HDL B ist bei IFG und T2D erniedrigt, aber nur für IFG wird eine hinreichende Signifikanz erreicht.

Da inzwischen klar ist, dass jedes LDL- und VLDL-Partikel genau ein Apo-B100-Molekül gebunden hat, kann man die Apo-B100 Konzentration aus der Summe der Partikelzahlen beider Lipoproteinklassen direkt berechnen. Unter der Annahme einer molaren Masse von 511 779 g/mol (nicht glykosyliertes Protein) erhält man eine Konzentration von 0.69 g/L bei den gesunden Probanden. Diese Konzentration erscheint etwas zu klein bei den bekannten Plasmakonzentrationen von Apo-B100 von 2 μ M. In einer neuen Studie konnte Delatour et al. (2018) zeigen, dass die mit NMR gemessene Zahl der nicht-HDL-Partikel sehr gut mit den immunchemisch bestimmten Apo-B100-Konzentrationen korreliert, allerdings ergaben ihre früheren Auswertungen deutlich zu niedrige Apo-B100-Konzentrationen. In der neuesten Version ihres Programms ergab sich eine perfekte lineare 1:1 Korrelation der Apo-B100-Konzentrationen mit den Partikelkonzentrationen, wahrscheinlich weil sie unausgesprochen ihre neuen Werte entsprechend korrigiert haben. Interessanterweise ist dessen Konzentration weitgehend unabhängig von der aktuellen Nahrungsaufnahme (nüchtern oder nicht-nüchtern). Bei Probanden mit IGT und IGT+IFG findet man eine kleine, nicht signifikante Zunahme, hingegen bei Probanden mit IFG oder mit T2D eine nicht signifikante Abnahme der Apo-B100 Konzentrationen, bei nüchternen Probanden mit T2D findet man eine Reduktion um 10 %, die bei nicht-nüchternen Probanden dann im Wesentlichen verschwindet. Die genaue Stöchiometrie von Apo-AI an HDL ist noch nicht geklärt. Strukturuntersuchungen legen nahe, dass 2 Apo-AI-Moleküle/Partikel zu finden sind (Pourmoussa et al., 2018). Unter dieser Annahme kann man wieder aus den HDL-Partikelkonzentrationen die Apo-A1-Konzentration berechnen. Unter der Annahme einer molaren Masse von 27 909 g/mol erhält man für die nüchternen, gesunden Probanden eine Konzentration von 1.21 g/L, ein Wert, der dem Durchschnittswert von 1.45 g/L (51.9 μ M) relativ nah kommt (Monsonis-Centelles, Hoefsloot, Engelsen, Smilde, & Lind, 2019). Auch deren Konzentration scheint nur wenig durch die Nahrungsaufnahme bestimmt zu sein und auch nicht wesentlich durch eine diabetische Stoffwechsellage beeinflusst zu werden.

4.3 Vergleich mit anderen Studien

Unsere Studie wurde mit einer wohldefinierten, leider auch relativ kleinen Gruppe von Probanden durchgeführt. Bei allen Probanden wurde der metabolische Status mit Hilfe eines oGTT definiert und in 5 Gruppen unterteilt, Gesunde, IFG, IGT, IGT + IFG und T2D. Bei diesen Probanden war in der Vergangenheit der Prädiabetes oder Diabetes nicht bekannt und wurde daher auch nicht medikamentös mit Antidiabetika behandelt. Bei einem Teil der Probanden wurde eine NMR-Analyse des Blutplasmas direkt vor dem oGTT, also im nüchternen Zustand gemessen. Bei allen Probanden gibt es NMR-analytierte Rückstellproben (im Schnitt über 5,7 Jahre), die unter „natürlichen“ Ernährungsbedingungen zwischen den Hauptmahlzeiten abgenommen wurden.

Keine der publizierten Studien ist in allen Aspekten vergleichbar. Die meisten anderen Studien wurden mit Serum/Plasma von nüchternen Probanden durchgeführt, nur bei der Studie von Mora et al. (2010) wurden zusätzlich Blutproben von nicht-nüchternen Probanden untersucht. Es ist aber auch hier nicht klar, was hier nicht-nüchtern ist und die Werte sind nur semiquantitativ ausgewertet worden und keine Extrapolation zum Zeitpunkt $t = 0$ durchgeführt, die Schwankungen der Nahrungsaufnahme partiell ausgleichen kann. Zusätzlich sind die Probandenkollektive und deren Größe, die experimentelle Methodik zur Klassifizierung des Diabetes mellitus und die Definition der Lipoproteinsubklassen (siehe auch Tabelle 4.3) von Studie zu Studie unterschiedlich.

In den Studien von Festa et al. (2005), Hodge et al. (2009) und Mora et al. (2010) werden die Lipoproteinsubklassen wie in Freedman et al. (2004) beschrieben definiert. Die erste dieser Studien ist eine prospektive Studie einer relativ kleinen, multiethnischen Gruppe von Frauen, die im Laufe der Jahre Diabetes mellitus entwickeln. Sie zeigen schon Jahre vorher für T2D typische Veränderungen der Lipoproteinprofile. Diese Ergebnisse wurden in einer prospektiven Studie eines großen multiethnischen australischen Kollektivs im Wesentlichen bestätigt. Ähnliche Ergebnisse bringt die prospektive Studie einer großen Gruppe von anfangs gesunden Frauen von Mora et al. (2010). In den Studien von Festa et al. (2005) und Mora et al. (2010) wurde T2D durch oGTT verifiziert, bei Hodge et al (2009) wurde

der Diabetes durch Selbstangaben der Patienten in einem Fragebogen und im Falle einer angeblichen Diabeteserkrankung durch Nachfrage beim jeweiligen behandelnden Arzt verifiziert.

In der multiethnischen, prospektiven Studie von Mackey et al. (2015) wurde Diabetes nur durch eine Glukosekonzentration > 126 mg/mL definiert. Die Definition der Lipoproteinsubklassen unterscheidet sich etwas von den vorher erwähnten Studien, obwohl dieselbe Methodik zur Analyse der NMR-Spektren verwendet wurde. In der Studie von Wang et al. (2012) an einem großen Kollektiv finnischer Männer wurde eine andere, von Ala-Korpela entwickelte Methodik und andere Definitionen der Lipoproteinsubklassen genutzt als in den eben besprochenen Studien. Ähnlich wie in unserer Studie wurden die Probanden über einen oGTT in die auch von uns benutzten Klassen Gesunde, IFG, IGT, IFG+IGT und T2D eingeteilt. Die NMR-Spektren wurden laut Veröffentlichung von Seren nüchterner Patienten aufgenommen.

Wie aus Abbildung 3.7.6 zu ersehen, sind die Häufigkeitsverteilungen der Lipoproteinkonzentrationen relativ breit und die Mittelwerte unterscheiden sich nicht wesentlich. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch in den anderen Studien, wobei wie zu erwarten, die Signifikanz der (oft kleinen) Unterschiede bei einer Erhöhung der Probandenzahlen größer wird. Alle fünf aufgeführten Studien zeigen bei Probanden, die einen Diabetes mellitus entwickeln werden oder bei denen ein Diabetes diagnostiziert wurde, eine Erhöhung der Konzentration der größeren Partikel VLDL und IDL und, falls untersucht, der Chylomikronen. Bei den nicht nüchternen Probanden beobachten wir ähnliche Unterschiede, allerdings sind nur die Konzentrationen der Chylomikronen, der Chylomikronen Remnants und von VLDL A mit statistischer Signifikanz erhöht. Bei den nüchternen Probanden sehen wir tendenziell (nicht signifikant) eine Abnahme aller dieser Konzentrationen mit Ausnahme derjenigen der Chylomikronen Remnants (Tabelle 4.3). Die großen LDL-Partikel waren bei einem Teil der Studien erniedrigt (signifikant) (Hodge et al., 2009 Jan; Mackey et al., 2015; Mora et al., 2010) oder erhöht (nicht signifikant) (Festa et al., 2005; J. Wang et al., 2012). Die kleinen LDL-Partikel (LDL A und B) waren in diesen Studien durchgehend signifikant erhöht, bei uns war LDL A bei nüchternen Probanden signifikant erniedrigt. Die Konzentration der großen HDL-Partikel war wie bei uns in den meisten Studien (Festa et al., 2005; Hodge et al., 2009 Jan; Mackey et

al., 2015; Mora et al., 2010; Sokooti et al., 2021; J. Wang et al., 2012) erniedrigt, diejenige von HDL A war durchgehend erhöht. Bei nüchternen Probanden war diese Erhöhung auch bei uns signifikant. Fasst man die Gruppen der Prädiabetiker zusammen und vergleicht sie mit den Gesunden, so erhält man ein größeres Ensemble und steigert potentiell die Signifikanz. In diesem Fall erreicht ein deutlich größerer Anteil der Lipoproteinkonzentrationsunterschiede ein ausreichendes Signifikanzniveau und die als tendenziell mit den publizierten Daten übereinstimmenden Veränderungen werden jetzt signifikant.

Tab. 4.3. Änderung der Lipoproteinpartikelkonzentrationen bei Diabetes mellitus.^a

	Größe [nm]	n ^b	nn ^b	Größe [nm]	Festa ^c	Mora ^d	Hodge ^e	Größe [nm]	Mackey ^f	Größe [nm]	Wang ^g	Größe [nm]	Sokooti ^h
CM B	>150	-	+							>75	+		
CM A	100 -150	-	+							>75	+		
CM Rem	80-100	+	+							>75	+		
VLDL B	60-80	-	+	>60	+	+	+	>60	+	64.0	+		
VLDL A	40-60	-	+	35-60	+	+	+	42-60	+	53.6, 44.5	+		
IDL	30-40	-	+	27-35		+	+	29-42		31.3, 28.6	+		
LDL E	25-30	-	+	21-23	+	-	-	23-29	-	25.5	+		
LDL D	22-30	-	-	21-23	+	-	-	21-23	-	23.0	+		
LDL C	21-22	-	-	21-23	+	-	-	21-23	-	23.0	+		
LDL B	19-21	-	-	20-21	+	+	+	18-21	+	18.7	+		
LDL A	16-19	-	-	18-20	+	+	+	18-21	+	18.7	+		
HDL D	13-16	-	-	9-13	-	-	-	9-14	-	14.3	-		
HDL C	10-13	-	-	9-13	-	-	-	9-14	-	12.1	-	12	-
											-	10.8	-
											-	10.3	-
HDL B	8.5-10	-	-	8-9	+	-	+	8-9	-	10.9	+	9.5	-
											+	8.7	-
HDL A	7-8.5	+	+	7-8	+	+	+	7-8	+	8.7	+	7.8	+
											+	7.4	-

^a +, -, Zu- und Abnahme der Partikelkonzentrationen bei T2D gegenüber gesunden Probanden, (grün) signifikante Zunahme, (blau) signifikante Abnahme, (gelb) Signifikanz wird erreicht, wenn man alle Gruppen mit diabetischer Störung (IFG, IFG+IGT, T2D) zusammenfasst und damit ein größeres Ensemble erhält. Partikeldefinitionen sind nur bedingt vergleichbar (siehe Spalten „Größe“), die zugehörigen Subklassenbezeichnungen wurden aus Huber et al. (2004) übernommen. ^bn, nüchtern, nn, nicht nüchtern. ^cFesta et al.(2005). ^dMora et al. (2010). ^eHodge et al. (2009). ^fMackey et al. (2015). ^gWang et al. (2012). Hier werden keine Größenbereiche angegeben, sondern nur Mittelwerte der Größen; die Größendefinition von sehr kleinen VLDL passt nicht zu unseren Werten und wurde mit in die Gruppe IDL eingereiht. Die Nomenklatur der Lipoproteinsubklassen wurde von Huber et al., (2005), die Größendefinitionen der anderen Autoren wurden so gut wie möglich angepasst.

4.4 Zeitabhängige Änderungen der Lipoproteinkonzentrationsverteilungen

Der Vergleich der Konzentrationsverteilungen, die für verschiedene Zeitpunkte aus den Rückstellproben berechnet wurden, erlaubt eine Aussage darüber, ob sich im Mittel schon Jahre vor der Ausbildung des Prädiabetes oder Diabetes schon von dieser Erkrankung abhängige Veränderungen des Lipidstoffwechsels nachweisen lassen. Wenn man 6 oder 10 Jahre zurückgeht, sind die Verteilungen der normierten Konzentrationen für die Gruppe der Gesunden (kein Prädiabetes oder Diabetes diagnostiziert), der Probanden mit erhöhter Nüchtern glukose und der Diabetiker für alle Partikel außer HDL B und HDL C nahezu deckungsgleich. Diabetiker haben schon zu diesen frühen Zeitpunkten erniedrigte HDL B und HDL C Partikelzahlen. Eine Verringerung dieser HDL Partikelzahlen findet man auch später beim vollentwickelten Diabetes, allerdings ist diese Erniedrigung hier nur für HDL C bei nüchternen Blutspendern signifikant.

Die Gruppen der Probanden mit gestörter Glukosetoleranz (IGT, IGT+IFG) zeigen schon 6 und 10 Jahre vor der Diagnosestellung Unterschiede der Partikelkonzentrationen im Vergleich zu Gesunden, aber auch zu Diabetikern, insbesondere der Konzentrationen der großen Partikel (IDL und größer). Diese Konzentrationen sind auch bei Diagnosestellung gegenüber Gesunden signifikant erhöht, aber in der Regel auch größer als bei Diabetikern selbst. Dies würde nahelegen, dass womöglich die gestörte Glukosetoleranz einem andern Pathomechanismus als die Entwicklung von Diabetes mellitus selbst folgt.

Wie in Abschnitt 3.1 erklärt, wurden mithilfe der Rückstellproben der einzelnen Probanden Geraden berechnet. Aus diesen Geraden wiederum wurden für jeden Probanden Werte für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) sowie die Steigung der Geraden berechnet. In Abschnitt 3.3. wurden diese berechneten Werte auf signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und an Prädiabetes und Diabetes erkrankten verglichen. Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben wurden Steigung und Wert zum Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests (oGTT) nochmal für die mit der Gesamtlipoproteinkonzentration gewichteten Konzentrationen berechnet. Vergleicht man dabei die Steigung mit den berechneten Werten für den Zeitpunkt des oralen Glukosetoleranztests (oGTT), würde man eigentlich erwarten, dass überall dort bei den (Prä)diabetikern die Lipoproteine zum Zeitpunkt des oGTTs

erhöht sind, bei den (Prä)diabetikern auch eine positivere Steigung der Geraden zu finden sein müsste. Denn würde man annehmen, dass die Mehrheit der (Prä)diabetiker im Beobachtungszeitraum ihren (Prä)diabetes entwickelt haben, müssten sich in dieser Zeit auch die Lipoproteine in Richtung eines für (Prä)diabetiker typischen Lipoproteinprofils entwickeln. Bei den Gesunden sollten theoretisch die Lipoproteine über die Zeit eher gleichbleiben, weil diese in der Zeit vor der Diagnosestellung keinen Diabetes entwickelt haben. Vergleicht man allerdings die signifikant unterschiedlichen Steigungen, fällt auf, dass diese kaum mit den für Diabetiker gefundenen typischen Lipoproteinprofil übereinstimmen: Bei HDL B, HDL C und HDL D war die Steigung signifikant erhöht, jedoch waren aus den Geraden berechneten Werte für den Zeitpunkt des oGTTs keine dieser Lipoproteinkonzentrationen signifikant erhöht, tatsächlich war HDL C sogar signifikant erniedrigt. Auch bei LDL B war die Konzentration für den Zeitpunkt des oGTTs nicht signifikant erniedrigt, die Steigung hingegen war negativ. Ein Grund dafür könnte sein, dass Lipoproteinkonzentrationen von vielen Faktoren abhängig sind wie beispielsweise Ernährung (Schaefer, 2002), Training im aeroben Bereich (Y. Wang & Xu, 2017), Einnahme von Hormonen (Suk Danik, Rifai, Buring, & Ridker, 2008) und Rauchen (Gossett et al., 2009). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Veränderungen der Lipoproteine, die aufgrund eines Fortschreitens des Diabetes entstanden, von den Einflüssen anderer Faktoren überlagert wurden. Ein weiterer Grund ist vermutlich, dass nicht bei allen Probanden während des Beobachtungszeitraums ein Fortschreiten des Diabetes zu erwarten ist. Die jährliche Inzidenz von Diabetes bei Prädiabetikern liegt bei 5 bis 10 Prozent (Gerstein et al., 2007). Bei 80% der Probanden liegen Rückstellproben von über 5 Jahren vor, es wäre also zu erwarten, dass sich bei einigen die Stoffwechsellage verschlechtert hat, jedoch nicht bei allen ein negativer Trend stattgefunden hat. Außerdem ist das Voranschreiten eines Diabetes sehr stark vom Lebensstil abhängig (Knowler et al., 2002). Vermutlich werden einige der Probanden während des Beobachtungszeitraums ihren Zuckerstoffwechsel durch beispielsweise Gewichtsverlust oder mehr körperliche Aktivität sogar verbessert haben. Auch die Verläufe dieser Probanden würden es schwerer machen, in den Daten den für Diabetes typischen Trend zu erkennen.

4.5 Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen von möglicherweise korrelierten Konzentrationspaaren

Falls die Veränderungen zweier Lipoproteinsubklassenkonzentrationen A und B bei Individuen einer Gruppe miteinander positiv korreliert sind, sollten A*B höhere Signifikanz zeigen, wenn sie negativ korreliert sind, A/B. Wir haben dies für alle 210 möglichen Kombinationen dieser Konzentrationen für unsere Rückstellproben durchgeführt und die Werte analysiert. Wie zu erwarten, findet man große Unterschiede für die verschiedenen Probandengruppen für Paare von Werten, die auch als einzelne Werte große (signifikante) Unterschiede zeigen, d. h. bei Kombinationen der Konzentrationen der großen Lipoproteine. Abbildung 3.9.1 zeigt einen Ausschnitt, der die Unterschiede der Mediane der 210 möglichen Kombinationen relativ zu denen der Gesunden zeigt. Es scheint spezifische Muster, die typisch für die verschiedenen Formen des Prädiabetes und des Diabetes sind, zu geben. In Abbildung 3.9.2 sind nur noch die Daten gezeigt, bei denen in einer der Gruppen der Unterschied der Mediane zu Gesunden mindestens 20 % beträgt. Sie unterscheiden sich teilweise erheblich. Unterschiede zu den Gesunden betragen teilweise mehr als 50 %. Nimmt man nur die Kombinationen, bei denen die Unterschiede mindestens 20 % groß sind, bleiben immerhin 100 Kombinationen übrig (Abb. 3.9.2). Neben den Kombinationen mit den großen Lipoproteinen (IDL und größer), findet man auch noch große Unterschiede zu den gesunden Probanden für die Verhältnisse von HDL C/HDL A (T2D), HDL C/HDL D (IGT, T2D), LDL E/HDL C (IGT), LDL E/LDL A (IGT). Wie aus Abb. 3.9.3 bis 3.9.5 zu ersehen, sind die zugehörigen Verteilungen teilweise relativ gut voneinander separiert, so dass man diese Werte durch eine Perzentilenanalyse potentiell zur Diagnostik nehmen könnte. Allerdings ist hier unsere Datenbasis zu klein, um zu ausreichend definierten Ergebnissen zu kommen.

Die zeitabhängigen Veränderungen einzelner Konzentrationskombinationen zeigen deutlichere Veränderungen mit der Zeit als die der einzelnen Komponenten. Sie könnten prinzipiell besser zu prognostischen Zwecken genutzt werden. Besonders aussichtsreich erscheinen hier LDL E / LDL A, Chylo A/ VLDL B.

5 Literaturverzeichnis

- Baenkler, H.-W., Goldschmidt, H., & Hahn, J.-M. (2015). *Kurzlehrbuch Innere Medizin* (3. Aufl.). s.l.: Georg Thieme Verlag KG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1055/b-003-104354>
- Baumstark, D., Kremer, W., Boettcher, A., Schreier, C., Sander, P., Schmitz, G., . . . Kalbitzer, H. R. [Hans Robert] (2019). 1h NMR spectroscopy quantifies visibility of lipoproteins, subclasses, and lipids at varied temperatures and pressures. *Journal of Lipid Research*, *60*(9), 1516–1534. <https://doi.org/10.1194/jlr.M092643>
- Bergmann, A., Li, J., Wang, L., Schulze, J., Bornstein, S. R., & Schwarz, P. E. H. (2007). A simplified Finnish diabetes risk score to predict type 2 diabetes risk and disease evolution in a German population. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, *39*(9), 677–682. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985353>
- Brindle, J. T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J. K., Bethell, H. W. L., . . . Grainger, D. J. (2002, November 25). Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabolomics. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/nm802>
- Curtin, A., Deegan, P., Owens, D. [D.], Collins, P., Johnson, A., & Tomkin, G. H. [G. H.] (1996). Elevated triglyceride-rich lipoproteins in diabetes. *Acta Diabetologica*, *33*(3), 205–210. <https://doi.org/10.1007/BF02048544>
- Deelen, J., Kettunen, J., Fischer, K., van der Spek, A., Trompet, S., Kastenmüller, G., . . . Slagboom, P. E. (2019, August 20). A metabolic profile of all-cause mortality risk identified in an observational study of 44,168 individuals. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11311-9>
- Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE - Deutsche Diabetes Hilfe (2019). Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2019: Die Bestandsaufnahme.
- Duvillard, L., Pont, F., Florentin, E., Galland-Jos, C., Gambert, P., & Vergès, B. (2000 Aug). Metabolic abnormalities of apolipoprotein B-containing lipoproteins in non-insulin-dependent diabetes: A stable isotope kinetic study. *European Journal of Clinical Investigation*, *30*(8), 685–694.
- Duvillard, L., Pont, F., Florentin, E., Gambert, P., & Vergès, B. (2000). Inefficiency of insulin therapy to correct apolipoprotein A-I metabolic abnormalities in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*, *152*(1), 229–237.
- Eid, M., Gollwitzer, M., & Schmitt, M. (2015). *Statistik und Forschungsmethoden: Mit Online-Materialien* (5., korrigierte auflage). Weinheim, Basel: Beltz.
- Fan, T. W.-M., Lane, A. N., & Higashi, R. M. (2012). *The Handbook of Metabolomics*. Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-618-0>
- Feingold, K. R., Grunfeld, C., Pang, M., Doerrler, W., & Krauss, R. M. (1992). Ldl subclass phenotypes and triglyceride metabolism in non-insulin-dependent diabetes. *Arteriosclerosis and Thrombosis : A Journal of Vascular Biology*, *12*(12), 1496–1502.
- Festa, A., Williams, K., Hanley, A. J. G., Otvos, J. D., Goff, D. C., Wagenknecht, L. E., & Haffner, S. M. (2005). Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Circulation*, *111*(25), 3465–3472. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.512079>
- Garvey, W. T., Kwon, S., Zheng, D., Shaughnessy, S., Wallace, P., Hutto, A., . . . Liao, Y. (2003). Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes*, *52*(2), 453–462.

- Gerstein, H. C., Santaguida, P., Raina, P., Morrison, K. M., Balion, C., Hunt, D., . . . Booker, L. (2007). Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: A systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 78(3), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.05.004>
- Ginsberg, H. N. (1987). Very low density lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 3(2), 571–589. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610030209>
- Gordon, S. M., Davidson, W. S., Urbina, E. M., Dolan, L. M., Heink, A., Zang, H., . . . Shah, A. S. (2013). The effects of type 2 diabetes on lipoprotein composition and arterial stiffness in male youth. *Diabetes*, 62(8), 2958–2967. <https://doi.org/10.2337/db12-1753>
- Gossett, L. K., Johnson, H. M., Piper, M. E., Fiore, M. C., Baker, T. B., & Stein, J. H. (2009). Smoking Intensity and Lipoprotein Abnormalities in Active Smokers. *Journal of Clinical Lipidology*, 3(6), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2009.10.008>
- Grundey, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), e13-8. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000111245.75752.C6>
- Häring, H.-U., & Artunc, F. (Eds.) (2011). *Diabetologie in Klinik und Praxis* (6., vollst. überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart: Thieme. <https://doi.org/10.1055/b-002-25601>
- Hodge, A., Jenkins, A., English, D., O'Dea, K., & Giles, G. (2009 Jan). Nmr-determined lipoprotein subclass profile predicts type 2 diabetes. *Diabetes Research & Clinical Practice*, 83(1), 132–139.
- Hogue, J.-C., Lamarche, B., Tremblay, A. J., Bergeron, J., Gagné, C., & Couture, P. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1336–1342. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600548-JLR200>
- Huber, F., Kalbitzer, H. R. [Hans Robert], & Kremer, W. US7927878, Process for the determination of lipoproteins in body fluids.
- Huber, F., Kalbitzer, H. R. [Hans Robert], & Kremer, W. AU2005250571, Process for the determination of lipoproteins in body fluids.
- Huber, F., Kalbitzer, H. R. [H. R.], & Kremer, W. DE 10 2004 026 903 B4, Verfahren zur Bestimmung von Lipoproteinen in Körperflüssigkeiten und Messanordnung dafür.
- Kita, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Murayama, T., Sano, H., . . . Yokode, M. (2001). Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 947, 199-205; discussion 205-6.
- Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A., & Nathan, D. M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England Journal of Medicine*, 346(6), 393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512>
- Lobenhofer, K. (2014). *NMR-basierte Metabolomik in der Diabetes-Früherkennung und Hochdruck-NMR-Spektroskopie an Lipoproteinen*.
- Mackey, R. H., Mora, S., Bertoni, A. G., Wassel, C. L., Carnethon, M. R., Sibley, C. T., & Goff, D. C. (2015). Lipoprotein Particles and Incident Type 2 Diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Diabetes Care*, 38(4), 628–636. <https://doi.org/10.2337/dc14-0645>
- Makita, T., Tanaka, A., Nakano, T., Nakajima, K., & Numano, F. (1999). Importance of glycation in the acceleration of low density lipoprotein (LDL) uptake into macrophages in

- patients with diabetes mellitus. *International Angiology : A Journal of the International Union of Angiology*, 18(2), 149–153.
- Malmstrom, R., Packard, C. J., Caslake, M., Bedford, D., Stewart, P., Yki-Jarvinen, H., . . . Taskinen, M.-R. (1997 Apr). Defective regulation of triglyceride metabolism by insulin in the liver in NIDDM. *Diabetologia*, 40(4), 454–462.
- Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- Mickiewicz B., e. a. Metabolic profiling of serum samples by 1H NMR spectroscopy as a potential diagnostic approach for septic shock.
- Monsonis-Centelles, S., Hoefsloot, H. C. J., Engelsen, S. B., Smilde, A. K., & Lind, M. V. (2019). Repeatability and reproducibility of lipoprotein particle profile measurements in plasma samples by ultracentrifugation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 58(1), 103–115. <https://doi.org/10.1515/ccm-2019-0729>
- Mora, S., Otvos, J. D., Rosenson, R. S., Pradhan, A., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2010). Lipoprotein particle size and concentration by nuclear magnetic resonance and incident type 2 diabetes in women. *Diabetes*, 59(5), 1153–1160. <https://doi.org/10.2337/db09-1114>
- Otvos, J. D., Shalaurova, I., Wolak-Dinsmore, J., Connelly, M. A., Mackey, R. H., Stein, J. H., & Tracy, R. P. (2015). Glyca: A Composite Nuclear Magnetic Resonance Biomarker of Systemic Inflammation. *Clinical Chemistry*, 61(5), 714–723. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.232918>
- Palmas, M., & Vogel, H. The Future of NMR Metabolomics in Cancer Therapy: Towards Personalizing Treatment and Developing Targeted Drugs? *Metabolites*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3901278/>
- Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., & Santanam, N. (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 610, 403–417. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_24
- Pehlke-Rimpf, A. (1993). *1H-NMR-Spektroskopie als Methode zur Analyse des humanen Cervicalmucus: Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg*.
- Phillips, C., Mullan, K., Owens, D. [Daphne], & Tomkin, G. H. [Gerald H.] (2006). Intestinal microsomal triglyceride transfer protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects: The relationship to triglyceride-rich postprandial lipoprotein composition. *Atherosclerosis*, 187(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.08.020>
- Pont, F., Duvillard, L., Florentin, E., Gambert, P., & Vergès, B. (2002 Oct 01). Early kinetic abnormalities of apoB-containing lipoproteins in insulin-resistant women with abdominal obesity. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 22(10), 1726–1732.
- Pourmousa, M., Song, H. D., He, Y., Heinecke, J. W., Segrest, J. P., & Pastor, R. W. (2018). Tertiary structure of apolipoprotein A-I in nascent high-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20), 5163–5168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721181115>
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing [Computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing: R Foundation for Statistical Computing.
- Rabbani, N., Chittari, M. V., Bodmer, C. W., Zehnder, D., Ceriello, A., & Thornalley, P. J. (2010 Apr). Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*, 59(4), 1038–1045.

- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., & Deutzmann, R. (2016). *Biochemie* (4. Auflage). *Duale Reihe*. Stuttgart: Thieme.
- Schaefer, E. J. (2002). Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *75*(2), 191–212. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.2.191>
- Shalurova, I., Connelly, M. A., Garvey, W. T., & Otvos, J. D. Lipoprotein insulin resistance index: a lipoprotein particle-derived measure of insulin resistance. - PubMed - NCBI. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959989>
- Simonen, P. P., Gylling, H. K., & Miettinen, T. A. (2002). Diabetes contributes to cholesterol metabolism regardless of obesity. *Diabetes Care*, *25*(9), 1511–1515.
- Sokooti, S., Flores-Guerrero, J. L., Kieneker, L. M., Heerspink, H. J. L., Connelly, M. A., Bakker, S. J. L., & Dullaart, R. P. F. (2021). Hdl Particle Subspecies and Their Association With Incident Type 2 Diabetes: The PREVEND Study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *106*(6), 1761–1772. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab075>
- Ståhlman, M., Pham, H. T., Adiels, M. [M.], Mitchell, T. W., Blanksby, S. J., Fagerberg, B. [B.], . . . Borén, J. (2012). Clinical dyslipidaemia is associated with changes in the lipid composition and inflammatory properties of apolipoprotein-B-containing lipoproteins from women with type 2 diabetes. *Diabetologia*, *55*(4), 1156–1166. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2444-6>
- Steinbrecher, U. P., & Witztum, J. L. (1984). Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes*, *33*(2), 130–134.
- Suk Danik, J., Rifai, N., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2008). Lipoprotein(a), Hormone Replacement Therapy and Risk of Future Cardiovascular Events. *Journal of the American College of Cardiology*, *52*(2), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.04.009>
- Taskinen, M.-R., Nikkilä, E. A., Kuusi, T., & Harmo, K. (1982). Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia*, *22*(1), 46–50.
- Umaerus, M., Rosengren, B., Fagerberg, B. [Björn], Hurt-Camejo, E., & Camejo, G. (2012). Hdl2 interferes with LDL association with arterial proteoglycans: A possible athero-protective effect. *Atherosclerosis*, *225*(1), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.040>
- Vakkilainen, J., Steiner, G., Ansquer, J.-C., Aubin, F., Rattier, S., Foucher, C., . . . Taskinen, M.-R. (2003). Relationships between low-density lipoprotein particle size, plasma lipoproteins, and progression of coronary artery disease: The Diabetes Atherosclerosis Intervention Study (DAIS). *Circulation*, *107*(13), 1733–1737. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057982.50167.6E>
- Vergès, B. (2005 Nov). New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*, *31*(5), 429–439.
- Vergès, B. (2015). Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: Where are we? *Diabetologia*, *58*(5), 886–899. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3525-8>
- Vergès, B., Adiels, M. [Martin], Boren, J., Barrett, P. H., Watts, G. F., Chan, D., . . . Taskinen, M.-R. (2014). Interrelationships between the kinetics of VLDL subspecies and HDL catabolism in abdominal obesity: A multicenter tracer kinetic study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(11), 4281–4290. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2365>
- Wang, J., Stančáková, A., Soininen, P., Kangas, A. J., Paananen, J., Kuusisto, J., . . . Laakso, M. (2012). Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of

- glucose tolerance: A population-based study of 9399 Finnish men. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 562–572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02562.x>
- Wang, Y., & Xu, D. (2017). Effects of aerobic exercise on lipids and lipoproteins. *Lipids in Health and Disease*, 16. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0515-5>
- Zimmerman, D. W., & Zumbo, B. D. [Bruno D.] (1992). Parametric Alternatives to the Student T Test under Violation of Normality and Homogeneity of Variance. *Perceptual and Motor Skills*, 74(3), 835–844. <https://doi.org/10.2466/pms.1992.74.3.835>
- Zimmermann, D. W., & Zumbo, B. D. [B. D.] (1993). relative power of the Wilcoxon test, Friedman test, and repeated measures ANOVA on ranks. *Journal of Experimental Education*. (62), 75–78.

6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Werner Kremer danke ich für die Betreuung dieser Dissertation und Herrn Prof. Dr. Wolfram Gronwald danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Markus Beck-Erlach für seine Unterstützung bei R.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Claudia Munte für ihre Hilfe bei Excel und Dr. Tobias Harsch für seine Unterstützung bei Auremol. Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft.

Die ursprüngliche Lipoproteinmessung und Primärauswertung der Daten waren Teil der Doktorarbeit von Dr. Kristina Lobenhofer. Vielen Dank für das zur Verfügung stellen der Daten zur weiteren Auswertung.

Der ganzen Gruppe danke ich für die schönen Kaffeepausen und das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die andauernde Unterstützung und Motivation. Ohne Euch hätte ich diese Arbeit nicht zustande gebracht.

8 Anhang

- Die Dissertation wurde von Prof. Dr. Werner Kremer angeregt und überwacht.
- Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.