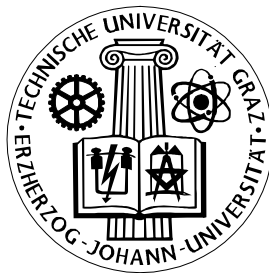


# Messung der Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel

Diplomarbeit

vorgelegt von  
Maurer Michael



**Institut für Elektro- und Biomedizinische Technik**  
**Technische Universität Graz**

Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Gert Pfurtscheller  
Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Zlatko Trajanoski  
Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Zlatko Trajanoski

Graz, Jänner 2000

**Für meine Eltern**

## Messung der Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel

**Ziel:** Evaluierung von „state-of-the-art“ Methoden und Design eines Experiments zur Messung der Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel.

**Hintergrund:** Fettleibigkeit (Adipositas) ist in den meisten Industrieländern schon zu einer chronischen Krankheit geworden, die viele Folgekrankheiten mit sich zieht. 1997 wurden die Proteine UCP2 und UCP3 (uncoupled protein) entdeckt. Aufgrund ihres Vorkommens und ihrer Ähnlichkeit zu UCP1, das die Thermogenese im braunen Fettgewebe reguliert, könnten UCP2 und UCP3 für die Thermogenese im Skelettmuskel verantwortlich sein. Es wurde auch postuliert, daß UCP3 für die Regulation der Lipolyse verantwortlich ist. Die Rolle der UCP's in der Pathogenese der Adipositas ist zur Zeit noch nicht geklärt.

**Methoden:** Die Thermogenese von vier gesunden Probanden wurden im Nüchternzustand mit Ephedrin stimuliert. Mit einem indirekten Kalorimeter wurde der Energieumsatz aufgezeichnet und gleichzeitig die intramuskuläre Temperatur mit einem Hypodermiesensor im *musculus gastrocnemius* gemessen. Eine Infrarot-Kamera zeichnete die Oberflächentemperatur des Unterschenkels auf. Mittels offener Mikroperfusion kann durch das Sammeln der interzellulären Flüssigkeit im Muskel auf die lokale Lipolyse geschlossen werden. Intra- und extramyozelluläre Lipide wurden mit <sup>1</sup>H MR Spektroskopie ermittelt. Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA) wurde für die Messung der Fettmasse herangezogen.

**Resultate:** Die intramuskuläre Temperatur folgt etwas zeitlich versetzt dem Energieumsatz. Es ist jedoch eine starke individuelle absolute Temperaturdifferenz feststellbar. Die relativen Temperaturdifferenzen sind ebenfalls individuell verschieden. Sowohl interstitielle als auch extra- und intramyozelluläre Fette konnten mit den verwendeten Methoden gemessen werden.

**Schlußfolgerung:** In dieser Arbeit wurde ein Protokoll basierend auf „state-of-the-art“ Methoden entwickelt, mit dem es möglich ist, den Einfluß der Thermogenese auf den Metabolismus in menschlichen Skelettmuskel zu untersuchen. Die dabei entwickelten Methoden könnten auch in Zukunft in der klinischen Routine zur Diagnose der malignen Hyperthermie eingesetzt werden.

**Schlüsselworte:** Thermogenese, Skelettmuskel, Temperatur, indirekte Kalorimetrie, DXA, <sup>1</sup>H Spektroskopie, offene Mikroperfusion, Mikro dialyse

## Assessment of thermogenesis in human skeletal muscle

**Objective:** To evaluate state-of-the-art methods and to design a new protocol to measure thermogenesis in the human skeletal muscle.

**Background:** Obesity is highly prevalent in the industrialised countries and many chronic diseases are associated with this disease. In 1997 two novel proteins, named UCP2 and UCP3 (uncoupling protein), were discovered. Because of their high expression in several human tissues and their homology to UCP1 (which plays a pivotal role in the control of the thermogenesis in brown adipose tissue) they could be responsible for controlling the thermogenesis in human skeletal muscle. Another hypothesis is that UCP3 regulates the lipolysis. The role of these UCP's in the pathogenesis of obesity is still unclear.

**Methods:** Experimental studies on four healthy volunteers stimulated with ephedrin (a potent thermogenic drug) were carried out. Energy expenditure was measured using indirect calorimetry and intramuscular temperature in the *m. gastrocnemius* was measured with a hypodermic sensor. The surface temperature was recorded using an infrared camera. Sampling intercellular fluids within the muscle with an open microperfusion system was applied for estimating lipolysis. Intra and extra myocellular lipids were determined using <sup>1</sup>H- MR spectroscopy. Body composition was assessed by dual energy X-ray absorptiometry.

**Results:** Intramuscular temperature followed the energy expenditure within a small time lag. There was an intraindividual variation in the absolute and relative temperature differences. Interstitial, intra and extra myocellular lipids could be measured using these methods.

**Conclusion:** A protocol based on state-of-the-art methods was developed and by using this protocol it was possible to assess the thermogenesis in human skeletal muscle. These methods could also be used in clinical routine for diagnosis of malignant hyperthermia.

**Keywords:** thermogenesis, skeletal muscle, temperature, indirect calorimetry, DXA, <sup>1</sup>H Spectroscopy open microperfusion, microdialysis

**Inhaltsverzeichnis:****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS: III****1. EINLEITUNG 1**

<b>1.1. HINTERGRÜNDE:</b>	<b>1</b>
<b>1.2. THERMOGENESE</b>	<b>3</b>
1.2.1 NONSHIVERING THERMOGENESE:	4
1.2.2 SHIVERING THERMOGENESE:	7
1.2.3 OBLIGATORY THERMOGENESE:	7
1.2.4 FACULTATIVE THERMOGENESE:	7
1.2.5 DIE ROLLE DER UNCOUPLED PROTEINE (UCP)	8
<b>1.3. AUFGABENSTELLUNG:</b>	<b>11</b>

**2. METHODEN 12**

<b>2.1. EINLEITUNG:</b>	<b>12</b>
<b>2.2. PROBANDEN</b>	<b>12</b>
<b>2.3. INDIREKTE KALORIMETRIE</b>	<b>14</b>
2.3.1 EINLEITUNG:	14
2.3.2 GRUNDLAGEN:	14
2.3.3 SOFTWARE:	16
<b>2.4. DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY</b>	<b>18</b>
2.4.1 EINLEITUNG	18
2.4.2 GRUNDLAGEN:	18
<b>2.5. INFRAROT KAMERA</b>	<b>21</b>
2.5.1 EINLEITUNG:	21
2.5.2 GRUNDLAGEN:	21
2.5.3 SOFTWARE ZUR BILDAUSWERTUNG:	22
<b>2.6. NADEL THERMOMETER</b>	<b>24</b>
2.6.1 EINLEITUNG:	24
2.6.2 TEMPERATURMEßGERÄT	24
2.6.3 TEMPERATURSENSOR	24
2.6.4 SOFTWARE:	25

<b>Messung der Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel</b>	<b>II</b>
<b>2.7. MIKRODIALYSE:</b>	<b>26</b>
<b>2.8. MIKROPERFUSION:</b>	<b>27</b>
<b>2.9. <sup>1</sup>H SPEKTROSKOPIE</b>	<b>28</b>
2.9.1 EINLEITUNG:	28
2.9.2 GRUNDLAGEN:	28
<b>2.10. VERSUCHSABLÄUFE</b>	<b>30</b>
2.10.1 DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY (DXA)	30
2.10.2 IR-KAMERA – TEMPERATURSONDE – INDIREKTE KALORIMETRIE – MARKIERTES GLYCEROL	30
2.10.3 <sup>1</sup> H SPEKTROSKOPIE	35
<b>2.11. STATISTISCHE ANALYSE</b>	<b>35</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
<b>4. DISKUSSION:</b>	<b>53</b>
<b>ANERKENNUNG</b>	<b>57</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS:</b>	<b>58</b>
<b>ANHANG</b>	<b>62</b>
<b>DATEI DATEX DELTATRAC II</b>	<b>62</b>
<b>DATEI YSI 4600</b>	<b>63</b>
<b>DATEI IN EXCEL FORMAT VON MATLAB</b>	<b>64</b>
<b>GLYCEROL ZERTIFIKAT</b>	<b>65</b>
<b>PROBANDENAUSWERTUNG G001</b>	<b>66</b>
<b>PROBANDENAUSWERTUNG G002</b>	<b>67</b>
<b>PROBANDENAUSWERTUNG G003</b>	<b>68</b>
<b>PROBANDENAUSWERTUNG Y001</b>	<b>69</b>

**Abkürzungsverzeichnis:**

ATPD	Ambient Temperature Pressure Dry
BAT	Braunes Fettgewebe
BMI	Body Mass Index
BMR	Basal Metabolic Rate
BP	Blutdruck
BTPS	Body Temperature Pressure Saturated
CIT	Cold – induced – Thermogenesis
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
EE	Energieumsatz
EMCL	Extramyozelluläre Lipide
FFA	Freie Fettsäuren
FFM	Freie Fettmasse
FT	Facultative Thermogenesis
GOR	Glucose Oxidationsrate
HF	Hochfrequenz
HR	Herzrate
ICF	Interzelluläre Flüssigkeit
IMCL	Intramyozelluläre Lipide
IR	Infrarot
LOR	Lipid Oxidationsrate
MR	Magnetresonanz
mRNA	Messenger-RNA
MRS	Magnetresonanz Spektroskopie
MSNA	Muskelsympathische Aktivität
NEFA	Nicht esterifizierte Fettsäuren
NIDDM	Typ II Diabetes mellitus
NST	Non-shivering Thermogenesis
OT	Obligatory Thermogenesis
RMR	Resting Metabolic Rate, Ruheenergieumsatz
RNA	Ribonucleinsäure

RQ	Respiratorischer Quotient
SEM	Standard Error of the Mean
ST	Shivering Thermogenesis
STPD	Standard Temperature Pressure Dry
UCP	Uncoupled Protein
WAT	Weißes Fettgewebe

## 1. Einleitung

### 1.1. Hintergründe:

*„The winners in the battle of bulge in our present „obesigenic“ environment were losers during the famines of early humankind“ [50].*

In der Bevölkerung ist weitläufig bekannt, daß es auf der einen Seite Personen gibt die Essen können so viel sie wollen und dabei keinen Gramm zunehmen, es jedoch auf der anderen Seite auch Menschen gibt, die bei „normaler“ Menge an Nahrung Gewicht zulegen. Jedoch wäre es hier zu einfach, nur der Vererbung die Schuld zu geben, da in der heutigen „Luxus“ - Welt Überangebot an Nahrung und mangelnde Bewegung das ihrige zur Fettleibigkeit beitragen. Adipositas (Fettleibigkeit) ist in den meisten Industrieländern schon zu einer chronischen Krankheit geworden. In den USA leidet z.B. jede dritte Personen an Übergewicht [38]. Da die Fettleibigkeit auch noch andere Krankheiten, wie z.B. Herzinfarkte oder Typ II Diabetes mellitus (NIDDM) mit sich bringen kann, können die finanziellen Ausmaße, mit der die Gesundheitsfonds extra belastet werden, nur schwer abgeschätzt werden. Aus diesen Grund ist es daher klar, daß in den letzten Jahrzehnten sehr viel auf diesem Gebiet geforscht wurde. Der Schlüssel zur pathologischen Fettleibigkeit konnte bis jetzt jedoch noch nicht entdeckt werden, obwohl schon sehr viele Mechanismen, die für die Energiebilanz verantwortlich sind, gefunden wurden. Bei Nagetieren ist zum Beispiel das braune Fettgewebe (BAT (Brown adipose tissue)) für einen Großteil der Wärmeproduktion (Thermogenese) verantwortlich, bei erwachsenen Menschen ist jedoch der Anteil des BAT nur mehr marginal an einigen Punkten des Körpers vorhanden. Dieser Unterschied hat die Wissenschaft in den 70ern und 80ern sehr beschäftigt und es wurden sehr viele Versuchsreihen mit den verschiedensten Ergebnissen durchgeführt. Im Laufe der Zeit haben jedoch einige Studien gezeigt, daß ca. 40-70% der Fettleibigkeit auf genetischen Defekten basiert [61]. Mit wenigen Ausnahmen dürften die meisten menschlichen Formen des Adipositas durch ein komplexes Zusammenspiel der defekten Gene beruhen. Diese Defekte dürften für einen geringeren Energieumsatz (EE) verantwortlich sein. Wie schon viele Studien [50,38,51] sehr ausführlich beschrieben haben, kann ein geringerer EE ein Risikofaktor für eine stärkere Gewichtszunahme sein. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß mit der Entdeckung von UCP2 und UCP3 (uncoupled protein) in den frühen Neunzigern wieder einen weiteren Schritt gemacht wurde, um den Energiehaushalt und die Wärmeproduktion besser zu verstehen. Da UCP2 und UCP3, welche im menschlichen Skelettmuskel und weißem Fett

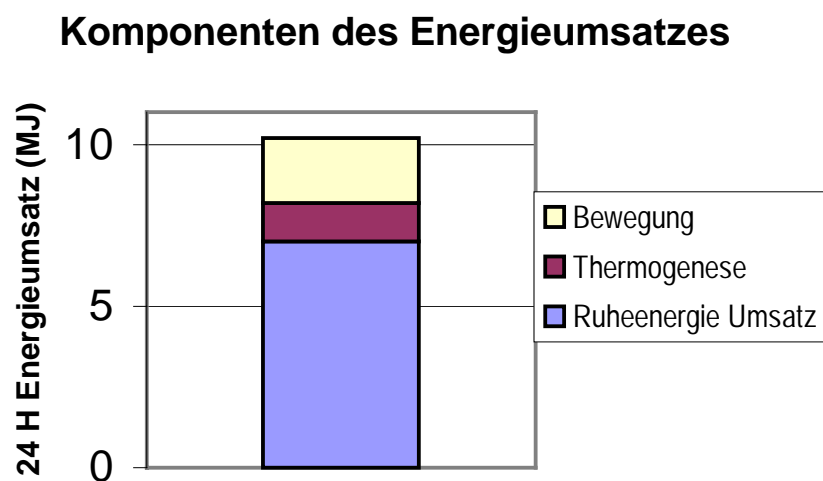


(WAT(white adipose tissue)) zu finden sind, dem UCP1, das im BAT der Nagetiere vorkommt, in ihrer Funktion sehr ähnlich sind [ 22,30,46], beschäftigen sich im Moment daher einige Forscher mit diesen UCP's, deren DNA Sequenz - Variationen und deren regulatorischen Mechanismen. [8]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden zur Messung der Thermogenese sollen helfen, die Einflüsse der UCP's auf den EE einzuschätzen.

## 1.2. Thermogenese

Der tägliche Energieverbrauch eines Menschen kann im wesentlichen in drei Komponenten gegliedert werden [51]:

- Ruheenergieumsatz (Resting Metabolic Rate (RMR))
- Thermogenese (Thermogenesis)
- Bewegung (Physical activity)



**Abb. 1** Zeigt die Komponenten des täglichen Energieverbrauches in MJ

Die RMR ist jene Energie, die verbraucht wird, wenn man am Morgen im nüchternen Zustand unter angenehmen äußeren Bedingungen ruht. Bei den meisten Erwachsenen liegt die RMR bei rund 60-70% des Tagesenergieverbrauchs. Die Thermogenese kann als eine Erhöhung der RMR bezeichnet werden, die durch Stimuli wie Essenseinnahme, Kälte oder Wärme, oder durch psychologische Faktoren wie Streß oder Angst aktiviert werden kann. Es ist auch möglich, die Thermogenese durch Hormone oder Medikamente ( $\beta_3$  Agonisten) zu beeinflussen [57]. Die am meisten veränderliche Komponente des Tagesenergieverbrauchs stellt die Bewegung dar, da sie bei sehr aktiven Personen (z.B.: Bauarbeiter) einen sehr hohen Anteil des Energieverbrauchs ausmachen kann. Bei Personen, die einer sitzenden Beschäftigung nachgehen, beträgt der Energieverbrauch der körperlichen Aktivität nur ca. 20-30% des Tagesenergieverbrauchs [51].

Folgende Arten der Thermogenese können unterschieden werden:

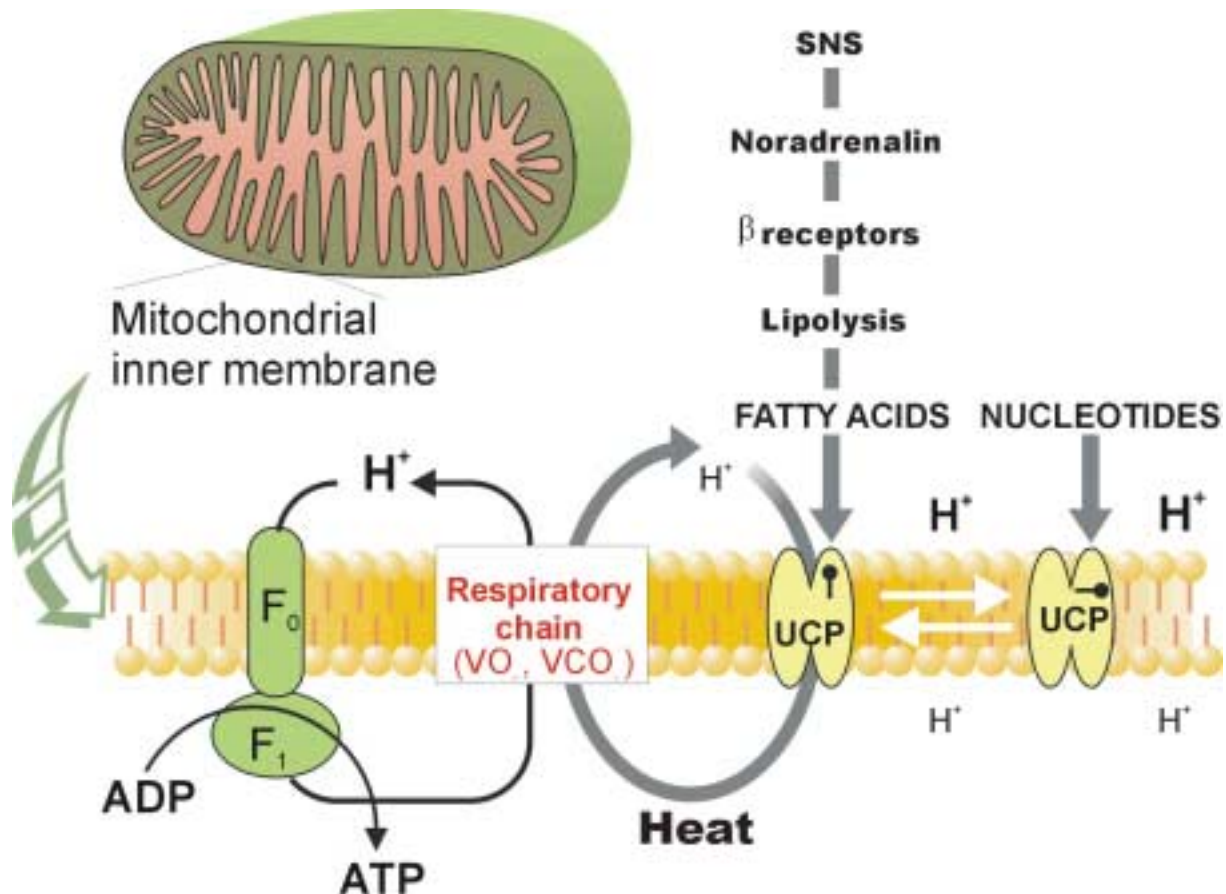
- cold induced thermogenesis (CIT)
  - shivering thermogenesis (ST)
  - non - shivering thermogenesis (NST)
  
- diet induced thermogenesis
  - obligatory thermogenesis (OT)
  - facultative thermogenesis (FT)

Da es in der Literatur noch keine Vereinheitlichung bezüglich der Terminologie gibt, werden im folgenden, in Anlehnung an A. Astrup [4], die oben angeführten Begriffe verwendet, da dessen Artikel ein Standardwerk in der Thermogenese - Forschung ist.

Bei CIT wird ein Lebewesen Kälte ausgesetzt. Als Folge der Kälte wird die Körpertemperatur fallen. Um den Temperaturverlust auszugleichen, erhöht der Körper die metabolische Wärmeproduktion. Diese Wärmeproduktion kann nun entweder durch eine erhöhte Anzahl von Muskelkontraktionen (ST) oder durch die wärmeerzeugende Eigenschaft des BAT (Zitterfreie Wärme Bildung, NST) erfolgen. Die erhöhte Wärmebildung nach der Nahrungsaufnahme wird OT genannt. FT wird in der Literatur auch oft als diet-induced thermogenesis bezeichnet und stellt die Wärmebildung dar, die nach Überfütterung frei wird und nicht auf die Verarbeitung der Nahrung zurückgeführt werden kann.

### 1.2.1. Nonshivering thermogenese:

Bei kalt – akklimatisierten Nagetieren ist BAT hauptsächlich für zitterfreie Wärmebildung (NST) verantwortlich. Die Aktivierung der Thermogenese geschieht über das sympathische Nervensystem mittels Noradrenalin. Das von den Enden des sympathischen Nervensystems freigegebene Noradrenalin bindet sich vorwiegend an  $\beta$  Rezeptoren, inklusive der erst vor kurzen entdeckten  $\beta_3$  Rezeptoren. In den Mitochondrien des BAT kommt es nun zu einem einzigartigen Wärmeerzeugungsmechanismus, da bei der Oxidation der Freien Fett Säuren (FFA) aufgrund der UCP1, Hitze anstatt ATP als metabolische Endprodukt entsteht (siehe Abb. 2) [20,4].



**Abb. 2 Regulation:** Durch Kälte aktivierte UCP lassen Wasserstoffionen durch die innere Mitochondrien Membran wandern, dabei heben sie den Wasserstoffionen - Gradienten auf, der für die ATP Synthese gebraucht wird [22].

Obwohl bei Ratten das BAT nur ca. 2% der Körpermasse ausmachen, wird dieses bei Kälteeinwirkung von ca. 25% des Cardiac Output durchflossen [4]. Daher können Ratten auch bei stärkerer Kälteeinwirkung ihre Körpertemperatur beinahe konstant halten. Diese Fähigkeit wird jedoch mit steigendem Alter der Nagetiere geringer [20]. Das Wärmeproduktions-Potential von BAT ist typischerweise eine Funktion der UCP Konzentration im diesem Gewebe. Je größer die UCP Konzentration, desto größer ist die Fähigkeit, die oxidative Phosphorylierung der Mitochondrien auszukoppeln, um Hitze zu produzieren [20]. Um die Rolle des BAT beim Menschen beurteilen zu können, muß jedoch zuerst untersucht werden, wo und in welchen Mengen BAT vorhanden ist.

Neugeborene besitzen relative viel BAT, das interscapular, um den Nacken, in kleinen Teilen hinter dem Sternum und rund um das Rückgrad und der Niere angesiedelt ist. Die totale BAT Masse wird auf ca. 2-5% des Körpergewichtes geschätzt. Dadurch sind Neugeborene in der Lage, zitterfreie Wärme durch erhöhte Sauerstoffaufnahme zu erzeugen [4]. Es verschwindet jedoch im Laufe des 1. Lebensjahres. Beim Erwachsenen findet sich

BAT vorwiegend perirenal und interscapular. Bei Versuchspersonen wurde mit Ephedrin, ein Sympathomimetikum mit zentral erregender Wirkung [37], stimuliert, um das thermogene Potential des interscapularen BAT zu untersuchen. Ein Ergebnis dieser Studie war, daß die interscapuläre Wärmeemission nicht durch BAT Thermogenese ausgelöst wurde, sondern durch die vaskuläre Wirkung des Ephedrin.

Daher wurde anfangs vermutet, daß das BAT beim Menschen nicht durch das Sympathische Nervensystem stimuliert werden kann. Bei der Suche nach anderen Auslösern von BAT Thermogenese wurde bei in vitro Experimenten festgestellt, daß nicht esterifizierte Fettsäuren (NEFA) die intrazellulären Boten sind, die die BAT Mitochondrien „uncouplen“ [4]. Nach unzähligen weiteren Versuchen mit Ephedrin kam man zum Schluß, daß das thermische Potential des menschlichen BAT von kleinerer Bedeutung ist. Daher muß ein anderes Organ für die Thermogenese im menschlichen Organismus verantwortlich sein.

Der Einfluß des Skelettmuskels auf die Wärmeerzeugung (NST) ist bei den Nagetieren sehr gering, da er bei ca. 9-18% der Antwort des Körpers auf eine Norardenalin – Infusion liegt. Beim Menschen wurden Versuche mit Ephedrin durchgeführt, die zeigten, daß der Sauerstoffverbrauch des Fußes erhöht war. Außerdem erhöhte Ephedrin die Konzentration von Laktat im Plasma. Dies deutet auf eine Stimulation der anaeroben Thermogenese hin. Da es offensichtlich ist, daß die Skelettmuskel Thermogenese durch die  $\beta$ -Adrenorezeptoren, welche ihrerseits mittels Catecholamine oder Sympathomimetica stimuliert werden, aktiviert werden kann, ist die Rolle des sympathischen Nervensystems von einiger Bedeutung. Es wurde in verschiedenen Studien gezeigt, daß der EE mit der muskelsympathischen Aktivität (muscle sympathetic nerve activity (MSNA)) korreliert [17]. Es gibt jedoch Studien die der Sympathischen Aktivität nur eine kleinere Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes zuschreiben [18]. Wenn man sich aber auf [4] bezieht, kann diese Aussage insofern relativiert werden, da die Funktion der sympathischen Aktivität nur gewährleistet ist, wenn eine gewisse Anzahl von intakten sensitiven  $\beta$  Rezeptoren gibt. Aufgrund der großen Skelettmuskelmasse (~40% des Körpergewichtes) kann daher vermutet werden, daß der Skelettmuskel - Metabolismus einen wesentlichen Einfluß auf den Energieumsatz hat [65,4,2,18,20,50,38,64,11]. Beim Säugling wird angenommen, daß das BAT die Funktion des noch nicht vollständig ausgebildeten Skelettmuskel Apparates übernimmt [20].

### 1.2.2. Shivering Thermogenese:

Die Wärmeproduktion mittels ST ist wichtig, um eine konstante Kerntemperatur zu halten. Sie entspricht etwa bis zu 10% der totalen Wärmeerzeugung bei Kälteeinwirkung. Mit zunehmendem Alter wird ST immer wichtiger, da die Wärmeerzeugung mit NST abnimmt. Wie bei älteren Personen festgestellt wurde ist die Glucoseaufnahme und der Stoffwechsel des Muskels sehr wichtig für die durch Kälte herbeigeführte ST, da eine beeinträchtigte Glucoseaufnahme zu einer verminderten Wärmeproduktion führen kann. Neben der Glucoseaufnahme ist auch der Lipidstoffwechsel wichtig. Valleand und Jacobs [4,Ref 176] haben in ihren Studien beobachtet, daß die durch Kälte induzierte Wärmeproduktion mit einer Steigerung des Kohlenhydrat- und des Lipidstoffwechsels verbunden war. In [2] wurde jedoch aufgrund der unveränderten Plasmalevel der NEFA's und des Glycerols angenommen, daß die Lipolyserate während der Thermogenese nicht erhöht wird.

### 1.2.3. Obligatory Thermogenese:

Die thermogene Zunahme nach der Nahrungsaufnahme durch Verdauung, Absorption, Umwandlung und Speicherung der Nährstoffe wird Obligatory Thermogenese genannt. Die Relevanz bezüglich der Fettleibigkeit wird meistens als gering eingeschätzt, da die OT in den meisten Fällen konstant und nur gering von der Nahrungsmenge abhängig ist. Es wurde in keinen der Studien eine Korrelation bezüglich Fett Zunahme und der OT festgestellt [38].

### 1.2.4. Facultative Thermogenese:

Bei Überfütterung kommt es zu einer zusätzlichen Wärmebildung, die von der Verarbeitung der Nährstoffe unabhängig ist. Die Facultative Thermogenese (FT) kann in 2 Phasen geteilt werden: „Cephalic phase“ und „postprandial phase“ Dabei wird der „cephalic phase“ beim Menschen eine geringere Bedeutung zugesprochen. In [15] wurde jedoch gezeigt, daß es doch so etwas wie eine cephalic phase geben muß, da alleine das Sehen und Riechen der Speisen genügt, um die FT zu erhöhen. Die „postprandiale phase“ dürfte ebenfalls, wie die NST über das Sympathische Nervensystem übermittelt werden [51]. Es wurde auch gezeigt, daß die FT zumindest teilweise durch die von Insulin herbeigeführte Aktivierung des sympathischen Nervensystems geschieht, welche im weiteren die  $\beta$  Rezeptoren aktivieren [3,6]. In [3] wird vermutet, daß die anatomische Position der facultativen Thermogenese im Skelettmuskel ist, und daher eine Rolle in der Regulation des Körpergewichtes spielt.

"Consequently, differences in facultative thermogenesis may contribute to explain why some individuals are prone to weight gain and become obese, while others remain weight-stable despite consuming considerable amounts of energy" [6,S263]

Die Quelle der FFA, welche bei der Oxidation während der FT verbraucht werden, dürften die intramuskulären Triglycerid Speicher sein [20]. Diese Annahme kann durch Abb. 3, die bei der Messung der intra- und extramyozellulären Lipide mit Hilfe  $^1\text{H}$  Spektroskopie, gewonnen wurde, bestätigt werden.

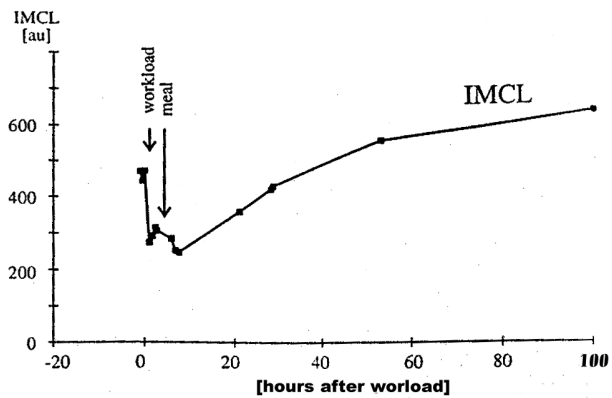


Abb. 3 Intramyocelluläre Lipide gemessen mit  $^1\text{H}$

Über die Relevanz der Spektroskopie [13] facultativen Thermogenese können jedoch auch Aussagen der Wissenschaftler gefunden werden, die ihr eher einen geringeren Stellenwert zuordnen [51].

### 1.2.5. Die Rolle der Uncoupled Proteine (UCP)

Wie schon in 1.2.1. erklärt wurde, können Nagetiere mit Hilfe von UCP1 Wärme anstatt ATP als metabolisches Endprodukt erzeugen. Das auch als Thermogenin bekannte UCP1 wurde schon 1976 entdeckt. Da es jedoch nur im BAT vorkommt und dies aber im menschlichen Körper nur mehr marginal vorhanden ist, kann es beim Menschen als Ursache für Adipositas ausgeschlossen werden [46,8]. 1997 wurden die Proteine UCP2 und UCP3 entdeckt. UCP2 ist zu 59% identisch mit dem 33 kDa Protein UCP1. Seine mRNA konnte im Herzmuskel, BAT, WAT, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Placenta, Milz und im Gewebe des Immunsystems, in dem Leukozyten und Makrophagen eingeschlossen sind, gefunden werden. UCP2 und UCP3 treten beim Menschen häufiger als UCP1 auf. Es kann daher angenommen werden, daß diese eine größere Rolle im Energieverbrauch spielen [46]. Auch wenn die UCP2 Aktivität durch eine fettreiche Kost aktiviert werden kann, ist es (bei Swiss mice) nicht möglich, mit Hilfe von Kälteeinwirkung oder durch Stimulation der  $\beta_3$  Rezeptoren deren Aktivität zu steigern. Das zeigt wiederum, daß UCP1 und UCP2 verschieden gesteuert werden. Da UCP2 nicht durch Noradrenalin geregelt werden kann, wird vermutet, daß es

durch Leptin, einem im Fettgewebe synthetisierten Genprodukt des Adipositas-Gens (ob-gene) das in enger Beziehung zur Adipositas steht (Leptin ist im Plasma übergewichtiger Personen erhöht), geregelt wird [30,35]. In neueren Studien wird Leptin jedoch als ein „Fat Messenger“ und nicht als ein „Fat Controller“ beschrieben [49].

*"The leptin system clearly has a role in the regulation of energy balance. .... However, energy expenditure regulation and the potential link between leptin and thermogenic activity, is still largely not known."* [46, S938]

Bei Nagetieren wird vermutet, daß Leptin das Sympathische Nervensystem zentral aktiviert und dadurch zu einer Stimulation der Wärmeerzeugung mit Hilfe der UCP1 kommt. Obwohl sich BAT und WAT einige Charakteristische Eigenschaften teilen (z.B.: die Fähigkeit Triglyzeride zu synthetisieren und zu speichern und NEFA's freizugeben) werden sie doch als physiologische Gegensätze betrachtet, da WAT Energie speichert und BAT Energie freigibt, um Wärme zu erzeugen. Bei Mäusen kann das Fehlen von BAT Hyperphagie und Adipositas auslösen. Fasten hingegen erhöhte auch die UCP2 Aktivität im Skelettmuskel, was der Uncoupling Theorie der Thermogenese widerspricht. Diese durch Fasten induzierte Erhöhung der mRNA konnte jedoch nicht im BAT und im Herzen festgestellt werden [46]. Im weiteren wurde von [47] festgestellt, daß krankhaft Fettleibige Personen eine signifikant geringere UCP2 Expression im Intraparietal Fettgewebe haben, was eine pathologische Relevanz darstellen könnte. Es wurde auch keine Verbindung zwischen der Plasma Insulinkonzentration und der UCP2 mRNA expression gefunden, die im subcutanen Fettgewebe gemessen wurde.

Aufgrund des Vorkommens in Geweben, das Reich an Makrophagen ist, kann weiters nicht ausgeschlossen werden, daß das UCP2 eine Rolle in der Immunologie und auch in der Thermoregulation bezüglich Infektionen, spielt [46].

Zusätzlich zu diesen Theorien kann es auch nicht ausgeschlossen werden, daß UCP2 ein Teil des Feedback-Mechanismus des Gehirns auf das Fettgewebe ist. In diesem Zusammenhang ist es auch sehr interessant zu erwähnen, daß UCP2 auch im Gehirn gefunden wurde [8].

UCP3 ist zu 57% mit UCP1 und zu 73% mit UCP2 identisch und kommt hauptsächlich im BAT und Skelettmuskel vor und könnte daher ein potentieller Kandidat für die durch Adrenalin induzierte Muskel NST sein [30]. UCP3 dürfte nach einer Art ein/aus Regulation



funktionieren, jedoch sind die Regulatoren noch nicht bekannt. Die UCP3 mRNA expression im Muskelgewebe unterscheidet sich nicht bei dicken und schlanken Personen [46].

Eine weitere Theorie besagt, daß die UCP3 nicht für die Regulation der Thermogenese verantwortlich ist, sondern für die Regelung der Lipide als „fuel substrate“ [54].

### 1.3. Aufgabenstellung:

**Hypothese:** Der Skelettmuskel ist thermogenetisch aktiv und diese Aktivität ist bei Personen mit pathologischem Übergewicht erniedrigt.

Wie in der Einleitung schon ersichtlich wurde, sind die Daten, Ergebnisse und Theorien der verschiedenen Studien oft widersprüchlich. Aus diesem Grund sollen ausgehend von der oben angeführten Hypothese, „state-of-the-art“ Methoden gefunden und evaluiert werden, um die Thermogenese im Skelettmuskel von schlanken und übergewichtigen Personen zu messen. Es soll auch versucht werden, die Thermogenese mit nicht invasiven Methoden zu ermitteln. Die gewonnenen Daten sollen ausgewertet und mit denen der Literatur verglichen werden.

## 2. Methoden

### 2.1. Einleitung:

In diesem Abschnitt wird auf die Grundlagen und Funktionsprinzipien der verschiedenen Methoden kurz eingegangen und danach der Meßaufbau und die Datenaufbereitung erklärt. Auf die detaillierte Beschreibung der Grundlagen wird verzichtet, und statt dessen auf die bestehende Literatur verwiesen. Zuvor wird das Probandenkollektiv beschrieben. Am Ende dieses Abschnittes werden die Versuchsabläufe genau erläutert und die verwendeten statistischen Analyse Verfahren beschrieben.

### 2.2. Probanden

Fünf Probanden aus Graz haben an dieser Studie teilgenommen. Alle wurden über mögliche Risiken informiert und gaben ihr freiwilliges Einverständnis zu den Versuchen und der anonymen Veröffentlichungen der Ergebnisse. Die Studie ist ein Teil der Studie „Thermogenesis in human skeletal muscle“ (09-088 ex 98/99), die von der örtlichen Ethikkommission bewilligt wurde. Aus den fünf untersuchten Probanden konnten jedoch nur vier in die Ergebnisse einbezogen werden, da sich das Versuchsprotokoll etwas veränderte. Alle Probanden waren in guter körperlicher und geistiger Verfassung. Sie waren Nichtraucher, übten keinen Leistungssport aus und hatten kein Typ I Diabetes mellitus in ihrer Familie. Der Body Mass Index (BMI) wurde wie folgt berechnet:

$$BMI = \frac{W}{H^2} \quad (1)$$

W      Gewicht [kg]

H      Größe [m]

Die Body Surface Area wurde nach DuBois berechnet:

$$BSA = W^{0.425} * H^{0.725} * C_D \quad (2)$$

W      Gewicht [kg]

H      Größe [cm]

C<sub>D</sub>    Konstante 71.84

Die Basalmetabolicrate (BMR) wurde nach Harris Benedict berechnet

$$\text{BMR} = 66 + 13.8W + 5H - 6.8A \quad (\text{Männlich}) \quad (3)$$

W      Gewicht [kg]

H      Größe [cm]

A      Alter [J]

Die Parameter der Körperbeschaffenheit, wie die freie Fettmasse (FFM) und der prozentuelle Anteil des Körperfettes zum Gesamtgewicht (Body Fat), wurden mit Hilfe eines DXA, HOLOGIC QDR – 4500A, (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) auf dem LKH Graz, Med. Univ Klink ermittelt.

#### Probandendaten:

	<i>AGE</i> [J]	<i>Height</i> [m]	<i>Weight</i> [kg]	<i>BMI</i> [kg/m <sup>2</sup> ]	<i>BSA</i> [m <sup>2</sup> ]	<i>BMR</i> [kcal/24h]	<i>Body Fat</i> [%]	<i>FFM</i> [g]
G001	27	1,81	95,0	29	2,16	2098	24,2	22725
G002	22	1,86	81,3	23,5	2,06	1968	17,1	13364
G003	29	1,8	147,3	45,46	2,59	2801	42,7	57669
Y001	26	1,98	90,0	22,96	2,25	2121	14	11862

<b>n=4</b>	<i>Mean</i>	<i>SEM</i>
<i>AGE [J]</i>	26	1,47
<i>Height [m]</i>	1,86	0,04
<i>Weight [kg]</i>	103,4	14,90
<i>BMI [kg/m<sup>2</sup>]</i>	30,23	5,26
<i>BSA [m<sup>2</sup>]</i>	2,265	0,12
<i>BMR [kcal/24h]</i>	2247	187,71
<i>Body Fat [%]</i>	24,5	6,43
<i>FFM [g]</i>	26405	10694,81

## 2.3. Indirekte Kalorimetrie

### 2.3.1. Einleitung:

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit der Messung der Indirekten Kalorimetrie, welche eine sehr einfache Methode ist, um mit Hilfe des Sauerstoffverbrauches, der CO<sub>2</sub> Produktion und der Stickstoffausscheidung, den Energieumsatz (EE) und die Netto-Verbrauchsraten von Glucose, Fett und Proteine zu bestimmen. Der Ausdruck indirekt bedeutet, daß die Wärme, welche durch chemische Prozesse freigesetzt wird, indirekt vom VO<sub>2</sub> Verbrauch berechnet wird. Daher wird im folgenden auch kurz auf die Berechnungen der Oxidationsraten und des EE eingegangen. Zuvor wird jedoch die Funktionsweise des verwendeten Kalorimeter erklärt.

### 2.3.2. Grundlagen:

Zur Messung des Energieumsatzes mit dem Deltatrac II (Datex Division Instrumentarium Corp, Helsinki, Finnland) wird der Kopf des Probanden mit einer durchsichtigen Kunststoffhaube bedeckt. Der Deltatrac II erzeugt einen konstanten, von Gerät zu Gerät verschiedenen, Luftstrom von ca. 40 l/min durch diese Haube. Die gesamte ausgeatmete Luft wird in diesem Flow gesammelt. Aus den Gaskonzentrationen im Flow können dann V<sub>O<sub>2</sub></sub>, V<sub>CO<sub>2</sub></sub> und der respiratorische Quotient (RQ) wie folgt ermittelt werden.

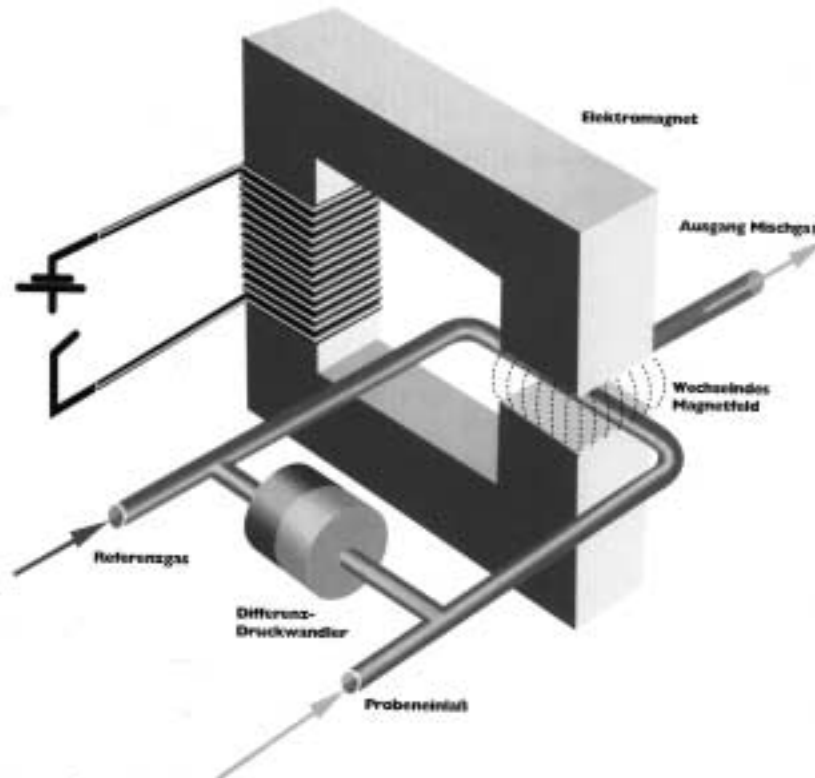
$$V_{CO_2} = Q * F_{DCO_2} \quad (4)$$

$$V_{O_2} = \frac{Q}{1 - F_{IO_2}} * F_{DO_2} - F_{IO_2} * F_{DCO_2} \quad (5)$$

$$RQ = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}} \quad (6)$$

mit:	V <sub>O<sub>2</sub></sub>	O <sub>2</sub> Verbrauch [ml/min] ATPD
	V <sub>CO<sub>2</sub></sub>	CO <sub>2</sub> Produktion [ml/min] ATPD
	RQ	Respiratorische Quotient [ ]
	F <sub>DCO<sub>2</sub></sub>	Mittelwert von F* <sub>CO<sub>2</sub></sub> -F <sub>ICO<sub>2</sub></sub> der letzten Minute
	F <sub>DO<sub>2</sub></sub>	Mittelwert von F <sub>IO<sub>2</sub></sub> – F <sub>EO<sub>2</sub></sub> der letzten Minute
	F* <sub>CO<sub>2</sub></sub>	CO <sub>2</sub> Konzentration im konstant Flow
	F <sub>ICO<sub>2</sub></sub>	Inspiratorische CO <sub>2</sub> Konzentration
	F <sub>IO<sub>2</sub></sub>	=0,2093 Eingeatmete O <sub>2</sub> Konzentration konstant 20,93%
	F <sub>EO<sub>2</sub></sub>	Expiratorische O <sub>2</sub> Konzentration
	Q	Flow [ml/min]

Für die  $O_2$  Messung verwendet der Deltatrac II das Prinzip eines paramagnetischen  $O_2$  Sensors. Dabei wird das Probengas des Atemstroms zusammen mit dem Referenzgas in ein elektromagnetisches Wechselfeld gebracht. Aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften der Sauerstoffmoleküle entsteht ein oszillierender Differenzdruck, der von einem Differenzdruckwandler aufgenommen wird. Dieses Signal ist proportional zum  $O_2$  Partialdruck.



**Abb. 4** Schematische Darstellung des paramagnetischen  $O_2$  Sensors

Die  $CO_2$  Messung erfolgt mittels eines Infrarot  $CO_2$  Sensors. Ein Mikroprozessor sorgt für die Baseline - Checks und die genauen Meßsequenzen. In der klinischen Praxis werden die expiratorischen Minutenvolumina normalerweise in BTPS angegeben. Daher müssen die berechneten  $VO_2$  und  $VCO_2$  im internen Mikroprozessor von ATPD auf STPD und weiters auf BTPS umgerechnet werden, da aufgrund der beim Deltatrac II verwendeten Schläuche trockenes Gas bei Umgebungstemperatur und -druck angenommen wird. Der Umgebungsdruck wird nach dem Einschalten ermittelt, die Temperatur des ausgeatmeten Gases wird ständig hinter dem Flowgenerator gemessen

Aus den gemessenen Daten können die Glucose, Fett und Protein Oxidationsraten berechnet werden [29].

$$G[\text{g}/\text{min}] = 4,62 \text{ VCO}_2 - 3,28 \text{ VO}_2 - 3,64 \text{ N} \quad (7)$$

$$L[\text{g}/\text{min}] = 1,706 \text{ VO}_2 - 1,706 \text{ VCO}_2 - 1,76 \text{ N} \quad (8)$$

$$P[\text{g}/\text{min}] = 6,25 \text{ N} \quad (9)$$

Die Koeffizienten dieser Gleichung werden aufgrund des verbrauchten O<sub>2</sub> und des erzeugten CO<sub>2</sub> pro Gramm Substrat (Glucose, Fett und Protein) ermittelt, wobei angenommen wurde, daß der mittlere Stickstoffgehalt 16% der Proteinmasse darstellt.

Der Energieumsatz berechnet sich weiters aus

$$\text{EE}[\text{kJ}/\text{min}] = 16,4 \text{ VO}_2 + 4,5 \text{ VCO}_2 - 3,4 \text{ N} \quad (10)$$

VO<sub>2</sub> O<sub>2</sub> Verbrauch [l/min] STPD

VCO<sub>2</sub> CO<sub>2</sub>Produktion [l/min] STPD

N Stickstoffausscheidung im Urin [g/min]

[29,19,59]

### 2.3.3. Software:

Die von einem sehr einfachen Terminalprogramm (UNICOMAL MacharSoft, Wigtownshire, Scotland, UK) minütlich aufgezeichneten Daten des Deltatrac II werden in Matlab® [Version 5.1.0 oder höher ] (The Matlabs Inc.) zur Mittelwertbildung eingelesen. Zuvor muß jedoch im einzulesenden File in jener Zeile, in der die Stimulation mit Ephedrin erfolgte (siehe Zeit in erster Spalte), in der zweiten Spalte, die 000 gegen 001 ersetzt werden. Alle vor dieser Markierung (001) gespeicherten Werte werden verwendet, um den Basalwert zu ermitteln. Die darauffolgenden Werte werden einer Mittelung unterzogen, wobei der Zeitraum zur Mittelung am Beginn des Programms eingestellt werden kann. Um Artefakte der Messungen zu eliminieren, werden für die Berechnungen des Basalwertes sowie der gemittelten Werte nur Daten verwendet, bei denen der RQ zwischen 1.00 und 0.7 liegt. Alle

anderen Werte werden als unphysiologisch angesehen und daher in der Berechnung nicht berücksichtigt. Gleichzeitig werden die Glucose und Fett Oxidationsraten und der Energieumsatz aus den gemittelten Werten, wie in Glg. 7-10 angegeben, berechnet. Die daraus erhaltenen Ergebnisse werden in einem von EXCEL® (Microsoft Coporation) lesbaren Format abgespeichert. Die genauere Beschreibung der Files ist dem Anhang zu entnehmen.



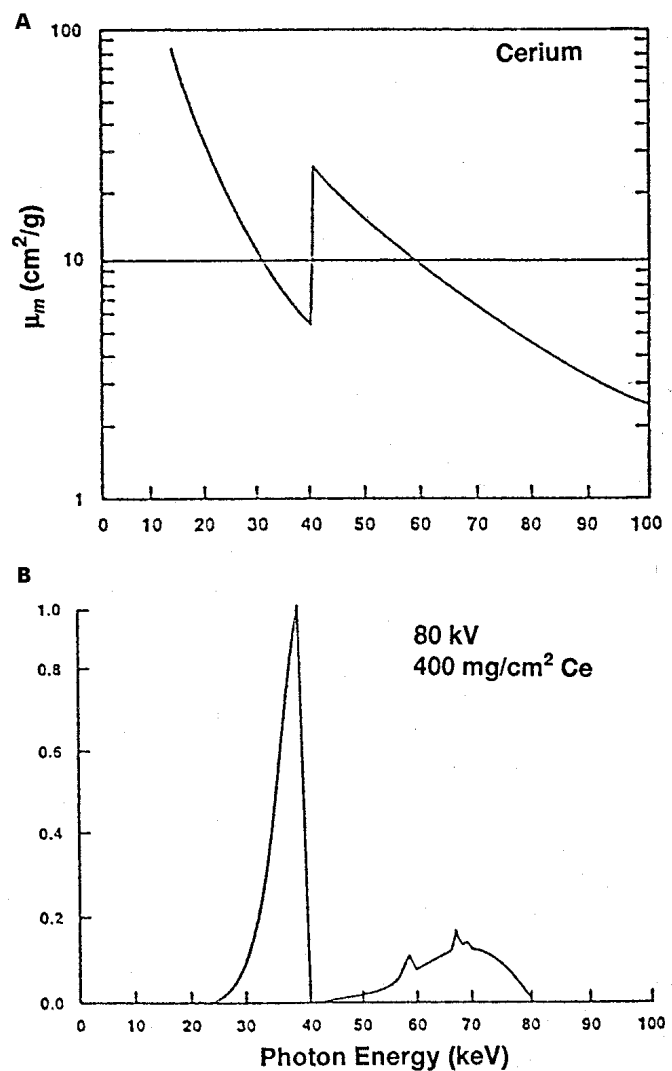
## 2.4. Dual Energy X-ray Absorptiometry

### 2.4.1. Einleitung

Um die Fettmasse der Probanden bestimmen zu können, wurde die Methode der Double Energy X-Ray Absorptiometrie (DXA) gewählt, da diese zu den genauesten Methoden zählt. Daher werden im folgenden Abschnitt die Grundlagen des DXA erklärt.

### 2.4.2. Grundlagen:

Das Konzept hinter der DXA ist die Abschwächung der Photonen als Funktion der Gewebe Zusammensetzung. Als Photonenquelle wird Röntgenstrahlung verwendet. Diese breitbandige Strahlung (~15keV – 80keV) ist jedoch nicht von vornherein für DXA verwendbar, und muß daher, um die für DXA erforderlichen zwei Strahlungsmaxima (energy peaks) zu erzeugen, gefiltert werden. Die am häufigsten verwendete Methode zur Erzeugung der peaks ist die Verwendung eines k-edge – Filters aus den in der Natur seltenen vorkommenden Materialien Cer (Ce) oder Samarium (Sm). Wie aus dem Bohr'schen Atommodell bekannt, sind die Elektronen eines Atoms in konzentrischen Schalen um den Kern angeordnet, wobei die k -te Schale die innerste ist. Die Elektronen dieser Schale können herausgeschleudert werden, wenn die Photonenenergie mindestens der Bindungsenergie in der k -ten Schale des Materials ist. Das heißt, daß die Photonen, deren Energie gleich der Bindungsenergie der k -ten Schale des Materials ist, durch



**Abb. 5** **A:** berechneter Massenabschwächungskoeffizient ( $\mu_m$ ) für Cer; **B:** Cer gefiltertes Spektrum bei 80 kV [48]

diese Wechselwirkung geschwächt werden. Daher kann eine Absorptionskante wie in Abb. 5A für Ce dargestellt werden. Die polyenergetischen Röntgenstrahlen können aufgrund dieser Filterung in 2 main peaks geteilt werden, wobei der erste bei 38-40 keV und der zweite bei ca. 70keV liegt. (Abb 5B)

Beim durchdringen der Photonen durch einen Körper treten physikalische Wechselwirkungen auf, welche die Strahlung schwächen. Diese Abschwächungsphänomene können auf die Compton Streuung und auf den photoelektrischen Effekt zurückgeführt werden. Unter der Annahme, daß eine monoenergetische Strahlung der Intensität  $I_0$  von einem homogenen Absorber abgeschwächt wird, kann die resultierende Strahlung wie folgt berechnet werden.

$$I = I_0 * e^{-\mu \times L} \quad (11)$$

$\mu$  linearer Abschwächungskoeffizient [ $m^{-1}$ ]

$L$  Durchdringungslänge [m]

$I$  gemessene Photonen Intensität [ $m^{-2}s^{-1}$ ]

$I_0$  abgestrahlte Photonen Intensität [ $m^{-2}s^{-1}$ ]

Da  $\mu$  von der Dichte  $\rho$  abhängig ist und sich diese von Gewebe zu Gewebe unterscheidet, wird der Massenabschwächungskoeffizient  $\mu_m$  berechnet

$$\mu_m = \frac{\mu}{\rho} \quad (12)$$

Die Gleichung für die in vivo Messung kann nun folgendermaßen angegeben werden

$$I = I_0 \times e^{\sum(-f_i \times \mu_{mi} \times M)} \quad (13)$$

$f_i$  mass fraction der  $i$ -ten Komponente;  $f=1$  für homogenen Absorber [1]

$I$  gemessene Photonen Intensität [ $m^{-2}s^{-1}$ ]

$I_0$  abgestrahlte Photonen Intensität [ $m^{-2}s^{-1}$ ]

$M$  Absorber Masse [ $kg m^{-2}$ ]

$\mu_m$  Massenabschwächungskoeffizient [ $m^2kg^{-1}$ ]

Grundsätzlich betrachtet wird die Abschwächung jedoch kleiner, wenn die Photonenenergie steigt und sie wird größer für Substanzen mit größerem  $\mu_m$ . Bei jeder

beliebigen Photonenenergie ist  $\mu_m$  eines Elements konstant und aus experimentellen Studien bekannt. Wichtig ist, daß  $\mu_m$  bei höherer Photonenenergie kleiner wird. Aufgrund dieser Tatsache kann ein Verhältnis R zwischen höherer und niedrigerer Energie berechnet werden:

$$R = \frac{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)_L}{\ln\left(\frac{I}{I_0}\right)_H} = \frac{\sum(-f_i \times \mu_m \times M)_L}{\sum(-f_i \times \mu_m \times M)_H} = \frac{\sum(-f_i \times \mu_{mi})_L}{\sum(-f_i \times \mu_{mi})_H} \quad (14)$$

Aufgrund der für jedes Element spezifischen  $\mu_m$  kann R ebenfalls als bekannt vorausgesetzt werden. Elemente mit höherer Atomanzahl haben kleinere R Werte als Elemente mit geringerer Atomanzahl

R	Gewebe	Elemente
1.21	Triglycerid	H, C, O
1.37 –1,38	Intra,- Extra zellulär Flüssigkeit	Na, K, Cl
2,68	Knochen	Ca

Da jedes Element ein spezifisches R hat, kann nun aus dem gemessenen R das Element identifiziert werden. Für die Ermittlung der Körperzusammensetzung wird angenommen, daß der Körper aus 3 Komponenten besteht, die von der Röntgenabschwächung unterscheidbar sind: Fett, Knochen, fettfreies Gewebe. Obwohl zur Identifikation von 3 Komponenten 3 verschiedene Photonenenergien benötigt werden, ist es aufgrund von ausgeklügelten Algorithmen, Modellannahmen und Imageprocessing möglich, diese Aufgabe mit nur zwei verschiedenen Photonenergien zu lösen.

Das verwendete DXA, HOLOGIC QDR – 4500A (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) benötigt zum scannen des ganzen Körpers ca. 180 Sekunden, wobei die Strahlung, die der Proband ausgesetzt ist laut Hersteller bei zirka 1 mRem/h (0.01mSv/h) liegt

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es mit Hilfe von DXA eine relativ kostengünstige und risikolose Möglichkeit gibt, Knochendichte und Körper-Zusammensetzung in der klinischen Routine zu messen [48,21].

## 2.5. Infrarot Kamera

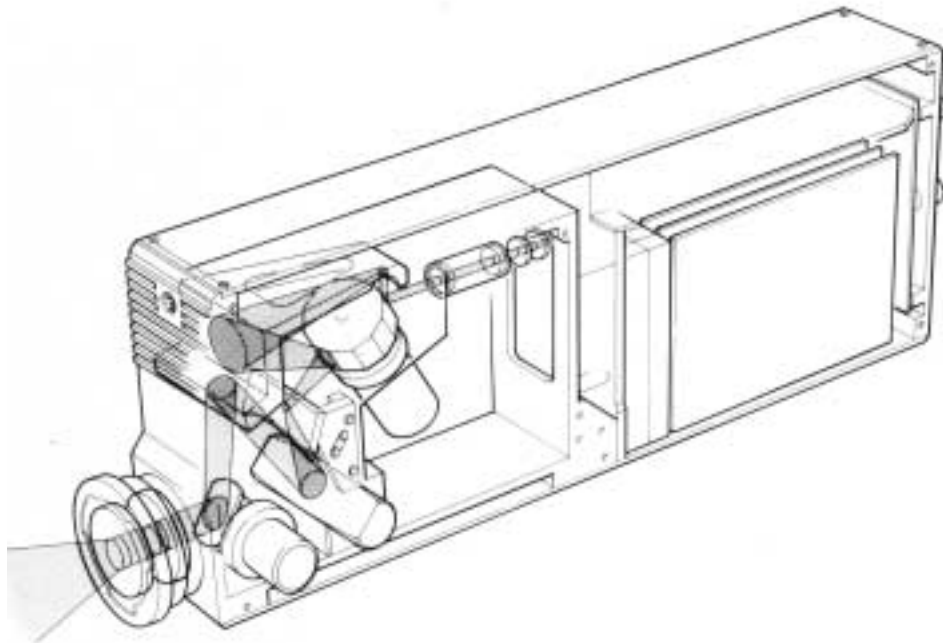
### 2.5.1. Einleitung:

Der folgende Abschnitt beleuchtet die Grundlagen der Temperaturmessung mit Hilfe der verwendeten Infrarot (IR) - Kamera. Im weiteren wird die auf Matlab entwickelte Software dargestellt.

Die IR-Kamera bietet die Möglichkeit einer nichtinvasiven und berührungslosen Oberflächen-Temperaturmessung. Durch Speicherung der Bilder können diese off-line ausgewertet, und somit Temperaturverläufe berechnet werden. Der Proband sollte sich während einer Meßreihe nicht bewegen, da es sonst zu Fehlern in der Auswertung kommen kann.

### 2.5.2. Grundlagen:

Die IR-Kamera AGEMA 470 (Agema Infrared Systems AB, Danderyd, Sweden) wandelt elektromagnetische Wärmestrahlung in ein elektronisches Signal um, welches anschließend verstärkt wird und mittels eines Videoprocessorchips ein Bild im Sucher darstellt. Dieses kann dann auf eine Diskette übertragen werden. Die vom Objekt abgestrahlte elektromagnetische Energie wird von infrarot Linsen auf einen rotierenden Spiegel fokussiert. Dieses optische Signal wird über 3 weitere fix montierte Spiegel auf das horizontale Spiegel Polygon fokussiert, welches sich mit 24000 U/min dreht. Der oszillierende Spiegel und das horizontale Spiegelpolygon sind synchronisiert, so daß sie ein Bild mit 140\*140 Pixel mit einer Bildwiederholfrequenz von 20 Hz erzeugen. Der vom horizontalen Spiegelpolygon reflektierte Strahl wird dann über einen wählbaren Aperture Teil zum Filter gelenkt und gelangt schließlich fokussiert zum Punktdetektor. Dieser infrarot sensitive Detektor besteht aus Mercury Cadmium Telluride, das auf einem Saphir – Substrat befestigt ist.



**Abb. 6** Schematischer Aufbau der Infrarot Kamera Agema 470

Der Meßbereich der Kamera liegt zwischen  $-20^{\circ}\text{C}$  und  $500^{\circ}\text{C}$  mit einer Auflösung von  $0.1^{\circ}\text{C}$  bei  $30^{\circ}\text{C}$ . Die Genauigkeit dieses Systems beträgt  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Daher wurde bei unseren Messungen nur die Differenztemperaturen berechnet. Das Bild wird auf Diskette in einem speziellen von AGEMA definiertem Format gespeichert. Nach einem 846 Byte langem Header folgen die Bildinformationen in 2 Halbbildern, wobei die Auflösung für einen Bildpunkt 8 Bit beträgt.

### 2.5.3. Software zur Bildauswertung:

Um die von der IR - Kamera gespeicherten Bilder auswerten zu können, wurde ein MatLab® [Version 5.1.0 oder höher ] (The Matlabs Inc.) Programm entwickelt. Nach dem Starten des Programms kann zwischen 3 Unterprogrammen gewählt werden :

1. Patient Mode
2. Show Difference
3. Show Single IR Picture

Im PATIENT MODE werden die während eines Versuches aufgenommenen Bilder am Bildschirm angezeigt, die Temperaturverlaufskurve dargestellt und diese in einem von

EXCEL lesbaren Format mit der Endung .dat gespeichert. Der Menüpunkt SHOW DIFFERENCE zeigt die Temperaturdifferenz zweier zeitlich folgender IR-Bilder. Der Menüpunkt SHOW SINGLE IR PICTURE ermöglicht das Betrachten eines einzelnen IR-Bildes, wobei hier die Farbcodierung verändert werden kann.

Der Programmablauf für den PATIENT MODE kann wie folgt beschrieben werden: Nachdem Auslesen der ersten von der Kamera gespeicherten Datei, wird der Header von den Bildinformationen getrennt. Die im interlaced Verfahren gespeicherten Halbbilder werden nun in einer Matrix zusammengesetzt. Diese Matrix wird kopiert und in ein 1 Bit Format verwandelt. Durch verschieben der Zeilen nach oben und unten wird das aufgenommene Objekt etwas vergrößert. Auf diese Matrix wird nun der schon in Matlab® implementierte Edge – Detection Algorithmus von Roberts angewendet, welcher eine Hüllkurve um das Objekt erzeugt. Die Pixel innerhalb dieser Hüllkurve werden summiert und anschließend durch deren Anzahl dividiert und mit Hilfe der am Anfang eingegebenen  $T_{\min}$  und  $T_{\max}$ , die aus dem Sucher der Kamera bei jedem Versuch mitzuprotokollieren sind, die Temperatur berechnet ( siehe (14)). Durch die zuvor erfolgte Vergrößerung kann sich das Objekt innerhalb dieser Hüllkurve bewegen, ohne daß Berechnungsfehler auftreten.

$$T_{Obj} = \frac{\sum_{i=1}^N P_i}{N} (T_{\max} - T_{\min}) \quad (15)$$

$T_{Obj}$  = Temperatur des Objektes

$P_i$  = Wert der Bildpunktes

$N$  = Anzahl der Bildpunkte innerhalb der Hüllkurve

$T_{\max}$  = Maximaler von der Kamera Aufgezeichneter Temperaturwert

$T_{\min}$  = Minimaler von der Kamera Aufgezeichneter Temperaturwert

( $T_{\max}$  und  $T_{\min}$  sind von der Kamera abzulesen und dürfen während eines Versuches nicht mehr verändert werden.)

Die mit Glg. 15 berechnete Temperatur des ersten Bildes stellt den Basalwert der Meßreihe dar. Nun werden die Bilder nacheinander geladen, die bestehende Hüllkurve darübergelegt und die Temperatur mit Formel (14) berechnet. Von diesem Wert wird der Basalwert subtrahiert. Diese Temperaturdifferenzen werden graphisch auf den Bildschirm ausgegeben und gleichzeitig in ein EXCEL - File für die spätere statistische Auswertung geschrieben.

## 2.6. Nadelthermometer

### 2.6.1. Einleitung:

Dieser Abschnitt erklärt die verwendete Temperaturmessung. Weiters werden die Spezifikationen des verwendeten Messegerätes und des Sensors dargestellt. Abschließend wird die Software die Kommunikation zwischen dem Meßgerät und dem PC beschrieben.

### 2.6.2. Temperaturmeßgerät

Für die Messung der intramuskulären Temperatur wurde aufgrund der hohen Auflösung und der guten Wiederholbarkeit das YSI 4600 (YSI Precision Temperature Group, Daton, Ohio, USA) gewählt. Es verwendet zur Messung der Temperatur Thermistoren. Thermistoren bestehen aus Halbleitern, deren Widerstand sich mit der Temperatur in einem großen Bereich, aber in bekannter Weise, verändert. Das YSI 4600 verwendet Thermistoren mit einem negativem Temperaturkoeffizienten. d.h. bei steigender Temperatur fällt der Widerstand. Ein weiterer Vorteil des YSI 400 ist, daß alle YSI Temperatursensoren der Serie YSI 400 und YSI 500 verwendet werden können. Jedoch muß bei der Verwendung der YSI 500 Serie darauf geachtet werden, daß es für jeden Sensor eine eigene Conversion - Chart gibt.

#### **Technische Daten:**

Sensor	YSI 400 (2252 $\Omega$ @ 25°C)
Meßbereich	-40,00°C - +150,00°C
Auflösung	0,01°C bei -40,00 bis 102,00°C 0,02°C bei 102,00 bis 150,00°C bis zu 0,001°C mit PC Ausgang
Wiederholbarkeit	0,002 bis 0,01°C bei -20 bis 70°C (eine Woche bei konst. Umgebungstemp.)
Genauigkeit:	0,015°C bei 0 bis 50°C Umgebungstemp. 18-28°C

### 2.6.3. Temperatursensor

Als Temperatursensor wurde das YSI 551 gewählt. Diese 80 mm lange Nadel hat einem Durchmesser von 20 ga (0,9mm). Das Thermistorelement befindet sich am Ende der Hypodermienadel und ist elektrisch isoliert. Da der Sensor aufgrund seiner miniaturisierten Bauweise bei 25°C nicht 2252 $\Omega$  hat, muß, wie schon erwähnt, eine von YSI mitgelieferte conversion chart verwendet werden, die für jeden Sensor einzigartig ist. Zur Sterilisation

dürfen die Sonden nicht autoclaviert werden, da es eine Veränderung der Temperaturmessung mit sich bringen könnte. Eine Sterilisation mit Bestrahlung, ETO oder Formaldehydgas ist jedoch möglich. Das Kabel und der Stecker dürfen niemals einer Temperatur über 100°C ausgesetzt werden, da dies zu Beschädigungen führen würde.

Da die Nadel nie ganz in das Gewebe eingeführt werden kann, stellt sich die Frage, wie weit man den Sensor in des Gewebe einführen muß, um Einflüsse der Umgebungstemperatur auf die Messung ausschließen zu können. YSI empfiehlt die Nadel mindestens zehn mal so tief in das Gewebe einzuführen, wie deren Durchmesser ist. In unseren Studien kann daher der Einfluß der Umgebungstemperatur vernachlässigt werden, da die Nadel immer mindestens 5-6 cm in den Unterschenkel eingeführt wird.

#### Technische Daten:

Zeit Konstante	0,2 Sekunden
Meßbereich	0 bis 70°C
Material	Rostfreier Stahl Epoxy ummantelt
Anwendungsgebiete	Subcutan, intramuskulär, intravenös

#### 2.6.4. Software:

Für das Auslesen der Temperatur wurde wie in 2.3.3 ein einfaches Terminalprogramm verwendet. Da jedoch, wie schon erwähnt, jeder Sensor seine eigene Kalibrationstabelle (conversion chart) benötigt, wurde das Programm dahin verändert, daß zuvor die für den Sensor typische Kalibrationsdatei eingelesen wird. Der PC zeigt somit die korrigierten Temperaturen an und speichert diese in den Abständen, die der Benutzer zu Beginn der Aufzeichnung eingegeben hat. Weiters werden noch die Zeit und ein Marker gespeichert, um die statistischen Auswertung später zu erleichtern. Der Aufbau der Datei kann dem Anhang entnommen werden.



### 2.7. Mikrodialyse:

Die Mikrodialyse wurde für das Sammeln von interstitiellem Wasser im Rattengehirn konstruiert und dann für das Sammeln von interstitieller Flüssigkeit in Muskel- und Fettgewebe, sowohl für Ratten als auch für Menschen weiterentwickelt. Die Mikrodialysesonde ist eine Hohlfaser, die wie eine künstliche Kapillare wirkt. Sie kann sowohl in Muskel als auch im Fettgewebe eingesetzt werden und wird mit einer neutralen Flüssigkeit perfundiert. Die effluente Flüssigkeit wird für die Analyse der Substanzen gesammelt. Die Flußraten betragen zwischen 0.3 und 0.5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Bei höheren Flußraten muß jedoch beachtet werden, das nur mehr verdünnte interstitielle Flüssigkeit gesammelt wird. Um die wirklichen Konzentrationen bestimmen zu können, gibt es verschiedene Kalibrationstechniken die in [59] nachgelesen werden können.

Mit Hilfe der Mikrodialyse ist es daher möglich, kleine wasserlösliche Substanzen, wie Aminosäuren, Glukose und Glycerol zu messen. Die Membran hat normalerweise einen Molekularen Cut Off von 20kDa.[59]

In den Versuchen wird eine Mikrodialysesonde ( CMA60,CMA/Microdialysis, Solna, Sweden) für die Messung von Glycerol und in weiterer Folge für die Messung von Noradrenalin im Muskel verwendet. Die Mikrodialysesonde wird mit einer Flußrate von 0.3  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Portable Pumpe CMA106, CMA/Microdialysis) mit einer künstlichen extrazellulär Flüssigkeit (Natriumchlorid 135 mmol/l; Kaliumchlorid 3mmol/l; Magnesiumchlorid 1 mmol/l; Kalziumchlorid 1.2 mmol/l; Ascorbinsäure 200 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ; und Natriumphosphat Buffer 2mmol/l; auf pH 7.4 eingestellt) perfundiert. Bei dieser Flußgeschwindigkeit wird nahezu eine 100% ige interstitielle Flüssigkeit gesammelt.

## 2.8. Mikroperfusion:

Die Mikroperfusion ermöglicht gleich wie die Mikrodialyse das Sammeln von interstitieller Flüssigkeit im Muskel und Fettgewebe. Ein Vorteil der Mikroperfusion ist die Möglichkeit wesentlich größere Moleküle sampeln zu können.

Die Mikrodialyse beruht auf dem Konzept des negativen Druckes. Ein Doppel-Lumen-Katheter wird im Muskel oder Fettgewebe plaziert und der negative Druck wird mit Hilfe einer Rollenpumpe zwischen dem inneren und äußeren Lumen angelegt. Der äußere Lumen wird mit Hilfe eines Excimer Lasers mit 120 0,5 mm perforiert. Die Perfusatlösung, die auch Medikamente enthalten kann, vermischt sich mit der interstitiellen Flüssigkeit und wird über das äußere Lumen zum Sammel-Vial mit einer Flußrate von 0.5-5  $\mu\text{l}$  gepumpt. Wie bei der Mikrodialyse werden auch hier nur Fraktionen der wirklichen interstitiellen Flüssigkeit gesammelt. Daher muß wie bei der Mikrodialyse durch Anwendung von Kalibrationsmethoden auf die absoluten Werte rückgerechnet werden. [59]

Im Versuch wurde die open Flow Mikroperfusionssonde mit einer Flowrate von 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  perfundiert. Das Perfusat, welches sich in einem Säckchen befand, bestand aus einer künstlichen extrazellulär Flüssigkeit (Natriumchlorid 135 mmol/l; Kaliumchlorid 3mmol/l; Magnesiumchlorid 1 mmol/l; Kalziumchlorid 1.2 mmol/l; Ascorbinsäure 200 $\mu\text{mol}/\text{l}$ ; und Natriumphosphat Buffer 2mmol/l; auf pH 7.4 eingestellt). Dieses Säckchen war mit dem innerem Lumen des Mikroperfusionskatheters verbunden. Der Auslaß des Katheters war mit der Rollenpumpe (Minipuls 3 Gilson, Middleton, Wis., USA) verbunden, an dem die interstitielle Flüssigkeit mit einem Eppendorf Vial gesammelt wurde.

Nachteilig sind die aufgrund der langen Schläuche hohen Totzeiten. Es ist daher mit dieser Methode nicht möglich Noradrenalin zu sampeln.

## 2.9. <sup>1</sup>H Spektroskopie

### 2.9.1. Einleitung:

Im folgenden Abschnitt wird die Messung der intramyocellulären Fette (IMCL) und der extramyocellulären Fette (EMCL) mit Hilfe der Protonen Kernresonanz Spektroskopie (<sup>1</sup>H NMR) (nuclear magnetic resonance) beschrieben. Da eine detaillierte Einführung in die Theorie der Kernresonanz Spektroskopie den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wird an dieser Stelle auf bestehende Arbeiten verwiesen [53,56]

### 2.9.2. Grundlagen:

Magnetresonanz Spektroskopie (MRS) wird schon seit Jahren sehr erfolgreich bei der nicht - invasiven Messung von metabolischen Produkten eingesetzt. <sup>31</sup>P MRS wurde verwendet, um den Energie Metabolismus (Energereiche Phosphate) und die <sup>13</sup>C MRS um das muskuläre Glycogen zu untersuchen. Beim <sup>1</sup>H MRS des menschlichen Muskels wurde angenommen, daß nur wenige Peaks von Metaboliten, die von einer Vielfalt an Lipid Resonanzen überlagert sind, zu erkennen wären. Schick et al. haben die Lipid Resonanzen im Waden Muskel und im Fett verglichen und haben dabei zwei Compartments von Triglyceriden mit einer chemischen Verschiebung von 0.2 ppm entdeckt. Sie haben die Resonanz bei 1.5 ppm bezüglich den CH<sub>2</sub> Protonen der Lipide in den Fettzellen zugeordnet und nahmen an, daß es sich bei der verschobenen Resonanz bei 1.3 ppm um Lipide innerhalb der Muskelzellen handle. Diese Annahmen wurden durch verschiedene Studien bestätigt. Die <sup>1</sup>H MRS hat sich in der Zwischenzeit als sensitives und genaues Werkzeug für die Messung des Lipid Metabolismus behauptet.[36,13,58]

Die Frequenz der HF Strahlung, die von einem bestimmten Kern absorbiert wird, wird stark von dessen chemischer Umgebung beeinflusst – d.h. von den sich in der Nähe befindlichen Elektronen und Kernen. Die Ursache liegt in den von den Elektronen erzeugten kleinen Magnetfeldern. Sie sind normalerweise entgegen dem angelegten Feld orientiert. Dadurch sind die Kerne einem etwas kleineren effektiven Feld ausgesetzt. Die Größe des intern aufgebauten Feldes ist direkt proportional dem von außen angelegten Feld.

Daher gilt:

$$B_0 = B_{\text{appl}} - \sigma B_{\text{appl}} = B_{\text{appl}}(1 - \sigma) \quad (16)$$

Die Absorptionsfrequenz erhält man somit durch:

$$\nu_0 = \frac{\gamma}{2\pi} * B_0(1 - \sigma) \quad (17)$$

mit:

$B_{\text{appl}}$	angelegtes Feld [T]
$B_0$	resultierendes Feld [T]
$\sigma$	Abschirmungskonstante[1]
$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis [rad*T <sup>-1</sup> *s <sup>-1</sup> ]
$\nu_0$	Absorptionsfrequenz [Hz]

Die Abschirmungskonstante  $\sigma$  ist von der Elektronendichte und -verteilung abhängig. d.h. die Elektronendichte ist abhängig von der Struktur der Verbindung, die den Kern umgibt. Für einen ungebundenen Wasserstoffkern ist die Abschirmungskonstante Null [53]. Das gyromagnetische Verhältnis ist vom jeweiligen Kern abhängig und beträgt bei <sup>1</sup>H  $2,68 * 10^8$  [rad\*T<sup>-1</sup>\*s<sup>-1</sup>]. Da die Theorie der chemischen Verschiebung weitaus komplizierter ist als hier erläutert werden kann, muß für Interessierte auf die Spezialliteratur verwiesen werden [56,53].

Die Spektroskopie wurde auf einem 1.5T Ganzkörpersystem (Philips ACS-NT, Powertrak 6000 (self shielded gradients  $G_{\text{max}}=23\text{mT}$ )) mit einer PRESS sequence ( TR=5s, TE= 25/50ms, 1024 samples, 16 phase rotation steps, 32 averages, no water suppression) durchgeführt. Das <sup>1</sup>H Spektrum wurde aus einem 3.375 ml Volumen im *musculus tibialis anterior* aufgenommen. Für die Messung des Signal wurde eine Knie – Coil (bird cage resonator) verwendet.

## 2.10. Versuchsabläufe

### 2.10.1. Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA)

Einige Tage nachdem die Probanden an dem Versuch mit der Temperatursonde teilgenommen hatten wurden sie ein weiteres mal in das LKH Graz gebeten. Sie mußten auf einer Patientenliege Platz nehmen. Danach wurden ihre Zehenspitzen mit Klebeband zusammengeklebt, um keine Bewegungsartefakte in der drei Minuten dauernden Messung zu erhalten. Nachdem die Messung automatisch durchgeführt wurde, mußten im Benutzerprogramm die einzelnen Personenparameter noch angepaßt werden. Danach wurde vom Programm HOLOGIC QDR – 4500A (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) sämtliche in Punkt 3 dargestellten Ergebnisse berechnet.

### 2.10.2. IR-Kamera – Temperatursonde – Indirekte Kalorimetrie – markiertes Glycerol

Die Probanden fanden sich um 8.00 Morgens, nach einem 12 - stündigen Fasten, im LKH auf der Neurologie ein. Sie wurden gebeten, 3 Tage bevor ihre Untersuchung stattfand, keinen Alkohol zu sich zu nehmen und ihren Speiseplan auf Kohlenhydrat reiche Nahrung umzustellen. Außerdem sollten sie keinen Extremsport in diesen Tagen betreiben. Nachdem sie umfassend über den Ablauf der Studie aufgeklärt wurden und sie ihre Einverständnis zu diesen Versuchen gegeben hatten, nahmen Sie auf der Liege Platz. Es wurden 2 Katheter 18G (1,2mm) x 40mm (TriCath GODAN, Espergaerde, Dänemark) in die Venen der Unterarme (Kubitalvene) gesetzt, um auf der einen Seite das Glycerol mit Hilfe einer Sprizenzpumpe (Becton Dickinson, Programm 2, Ser.Nr. 15030332, Becton Dickinson, Rutherford, USA) zu infundieren. Der Katheter in der gegenüberliegenden Kubitalvene wurde für die Abnahme der Blutsamples verwendet. Diese Samples wurden mit 3ml Vacutainer® (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Meylan Cedex, France; Ref.Nr367748), welche 60 I.U. Lithium Heparin und 1.5mg Jodacetat enthielten, zu den Zeitpunkten –125, -120, -60, 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 abgenommen und sofort in Eis aufbewahrt. Um die Durchgängigkeit des Katheters zu bewahren, wurde dieser zwischen den Blutabnahmen mit einer physiologischen Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gespült. Danach wurde, um im Unterschenkel des Probanden die intramuskuläre Temperatur und die Intrazellulärflüssigkeit (ICF) messen zu können, in diesem der Hypodermie Temperatursensor (YSI 551, P048, YSI Precision Temperature Group, Daton, Ohio, USA) und die Mikroperfusionsnadel appliziert. Beide wurden parallel in eine Winkel von ca. 45° zum Unterschenkel eingeführt und sollten sich im

*musculus gastrocnemius* befinden. Der Versuch startet mit der Glycerol Bolus Infusion. Zuvor wurden 10g des Deuterierte Glycerol (1,1,2,3,3-D<sub>5</sub>,98%) (Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA (siehe Anhang)) mit 100ml NaCl verdünnt. Für die Herstellung des Infusats wurden 4ml der zuvor hergestellten Lösung in 100 ml 0.9% Kochsalzlösung gegeben und nach gutem Vermischen in zwei 50cc Spritzen gefüllt. Für die Berechnung der Infusionsraten wurden folgende Formeln verwendet:

**Bolus Infusion:** (2 µmol/kg ; 200µg/kg)

$$Rate(ml / min) = \frac{Gewicht(kg)}{20} \quad (18)$$

**Kontinuierliche Infusion:** (0.2 µmol/kg/min; 20µg/kg/min)

$$Rate(ml / min) = \frac{Gewicht(kg)}{200} \quad (19)$$

30 Minuten vor Stimulation mit Ephedrin wurde die Messung der Indirekten Kalorimetrie (Deltatrac II; Datex) und die der Temperatursonde gestartet und das Sammeln der ICF begonnen. Beim Kalorimeter muß am Morgen jedes Versuches eine Kalibration der CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> Sensoren gestartet werden. Kurz vor der Verabreichung von Ephedrin wurden der Blutdruck und Puls am Handgelenk mit dem Omron R3 (OMRON Medizintechnik Handelsgesellschaft mbH, Mannheim, Deutschland) gemessen und das 1. Infrarotbild mit der AGEMA 470 (Agema Infrared Systems AB, Danderyd, Sweden) aufgezeichnet. Danach erfolgte die Stimulation mit Ephedrin (Apotheke LKH Graz). Dem Probanden wurde Ephedrin oral mit einer Dosis von 1mg/kg Körpergewicht verabreicht, wobei aufgrund der Verpackung der Tabletten (a 20mg) immer gerundet wurde. Nun erfolgten in Abständen von 5 Minuten die Aufzeichnung von Blutdruck und Puls und das Speichern der IR – Bilder. Die Samples der ICF wurden über eine halbe Stunde genommen. Wichtig zu beachten ist, daß es bei der Mikroperfusion aufgrund der Schlauchlänge und der Pumprate zu einer Verzögerung von 30 Minuten kommt. Die Raumtemperatur wurde am Anfang und am Ende des Versuches protokolliert und sollte sich während eines Versuches nicht mehr als 1°C ändern.

Nach Beendigung des Versuches wurden das in den Vakutainern befindliche Blut bei 4°C mit 3000 U/min 10 Minuten zentrifugiert und das Plasma mit Pipetten von den Zellen getrennt.



**Abb. 7** Versuchsaufbau: Links oben : Indirekte Kalorimetrie mit Datenaufzeichnung.  
Darunter Perfusorpumpe für markiertes Glycerol



**Abb. 8** Messung mit IR- Kamera



**Abb. 9** Temperatursonde YSI 551 und Mikrodialyse im Unterschenkel



## Versuchsprotokoll:

09-088 ex 98/99 Thermogenesis in skeletal muscle						
Time	Action	bloodsamples			Volume	Micro-perfusion
		Glycerol	Insulin, Leptin	FFA		
min		3.0 ml LTT	3.0 ml LTT	3.0 ml LTT		
-125	First sampling, insert probes	X	X	X	12 ml	
-120	start infusion	X	X	X	12 ml	
-60		X	X	X	12 ml	
-30						Nr. 1
0	Ephedrine, bloodpress., IR pict.	X	X	X	12 ml	Nr. 2
5	Bloodpress. IR – picture.					
10	Bloodpress. IR – picture.					
15	Bloodpress. IR – picture.					
20	Bloodpress. IR – picture.					
25	bloodpress. IR – picture.					
30	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	Nr. 3
35	bloodpress. IR – picture.					
40	bloodpress. IR – picture.					
45	bloodpress. IR – picture.					
50	bloodpress. IR – picture.					
55	bloodpress. IR – picture.					
60	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	Nr. 4
65	bloodpress. IR – picture.					
70	bloodpress. IR – picture.					
75	bloodpress. IR – picture.					
80	bloodpress. IR – picture.					
85	bloodpress. IR – picture.					
90	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	Nr. 5
95	bloodpress. IR – picture.					
100	bloodpress. IR – picture.					
105	bloodpress. IR – picture.					
110	bloodpress. IR – picture.					
115	bloodpress. IR – picture.					
120	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	Nr. 6
125	bloodpress. IR – picture.					
130	bloodpress. IR – picture.					
135	bloodpress. IR – picture.					
140	bloodpress. IR – picture.					
145	bloodpress. IR – picture.					
150	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	Nr. 7
155	bloodpress. IR – picture.					
160	bloodpress. IR – picture.					
165	bloodpress. IR – picture.					
170	bloodpress. IR – picture.					
175	bloodpress. IR – picture.					
180	bloodpress. IR – picture.	X	X	X	12 ml	
totals		30 ml	30 ml	30 ml	120 ml	

**Infusionen**

Glycerol: prime 2 mmol/kg, 0.2 mmol/kg/min (e.g. 4 mg/ml, 70 kg 0.35 ml/min)

**Katheter**

- 1 \* Thermoelement
- 1 \* Mikroperfusion
- 1 \* Venöse Infusion (bloodsamples)
- 1 \* Venöse Infusion (glycerol(1,1,2,3,3-D5,98%))

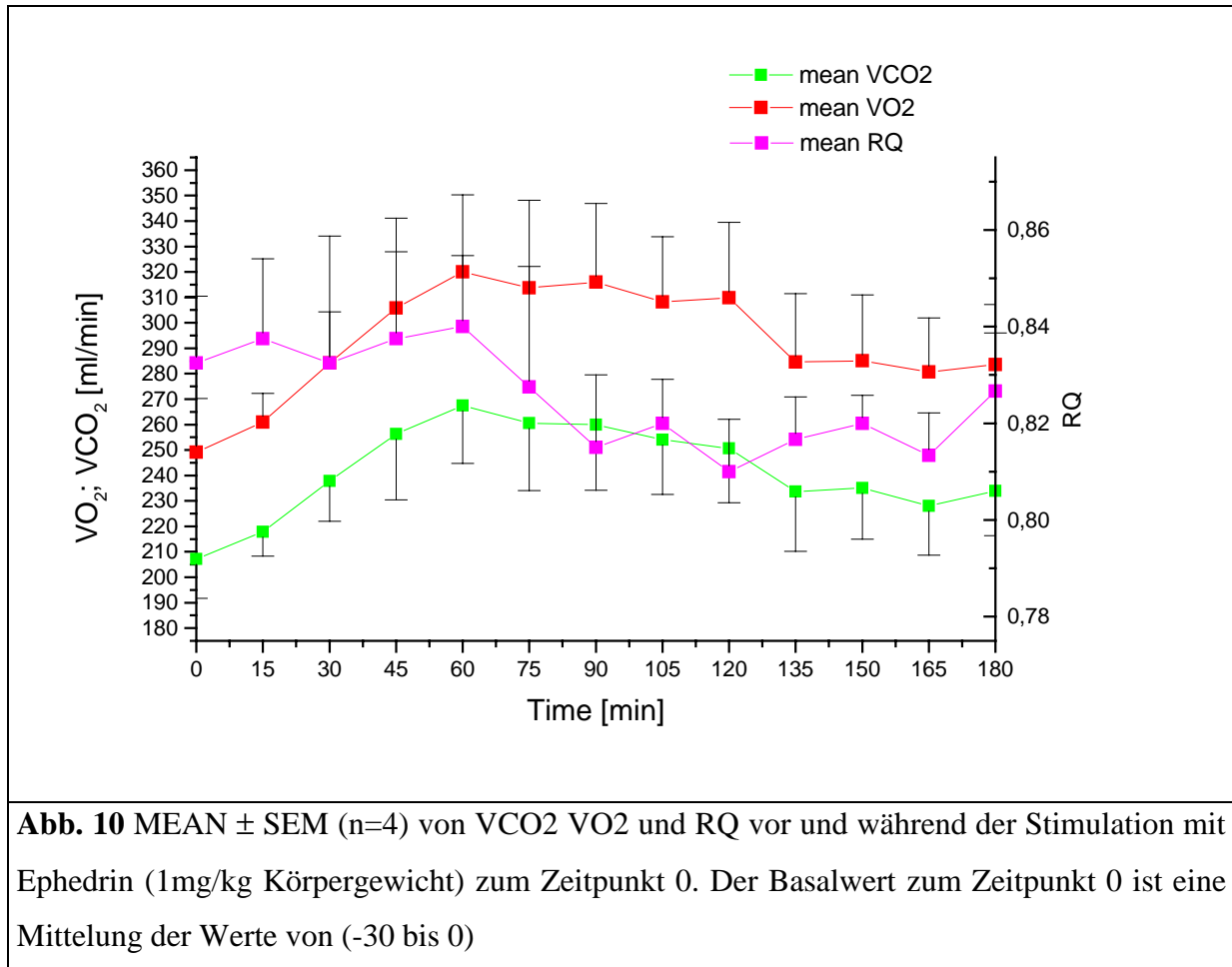
### 2.10.3. <sup>1</sup>H Spektroskopie

Die Probanden fanden sich nach einem 4 stündigen Fastenintervall, im LKH auf der Röntgenabteilung ein. Nachdem sie umfassend über den Ablauf der Studie aufgeklärt wurden und Sie ihre Einverständnis zu diesen Versuche gegeben hatten, nahmen Sie im MR platz. Es wurde in Abständen von 5 Minuten der Puls und Blutdruck aufgenommen. Die zu den Zeitpunkten -10 und - 5 aufgenommenen Werte wurden für die Berechnung des Basalwert herangezogenen. Danach wurde mit Ephedrin stimuliert ( Zeitpunkt 0 ). Die Messungen der IMCL und EMCL folgten in Abständen von 15 Minuten. Methodische Details zur Messung von IMCL und EMCL sind aus [13] zu entnehmen.

### 2.11. Statistische Analyse

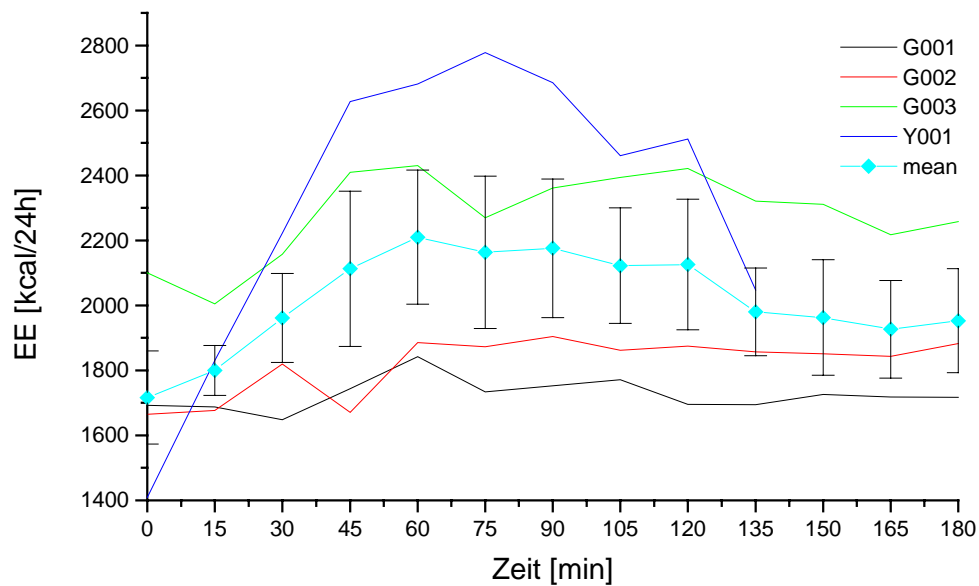
Die Ergebnisse der Versuche wurden jeweils, falls nicht anders erläutert, in Mittelwert und Standardabweichung (MEAN± SEM) angegeben. Die Lineare Regression ( $y=kx+d$ ) wurde nach dem Prinzip des kleinsten Fehlerquadrates bestimmt. Der Stichproben – Korrelationskoeffizient  $r$  gibt dabei die Stärke und Richtung eines inearen Zusammenhanges an. [52] Die statistischen Berechnungen wurden mit ORIGIN (Microcal Software Inc, Northhampton, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse



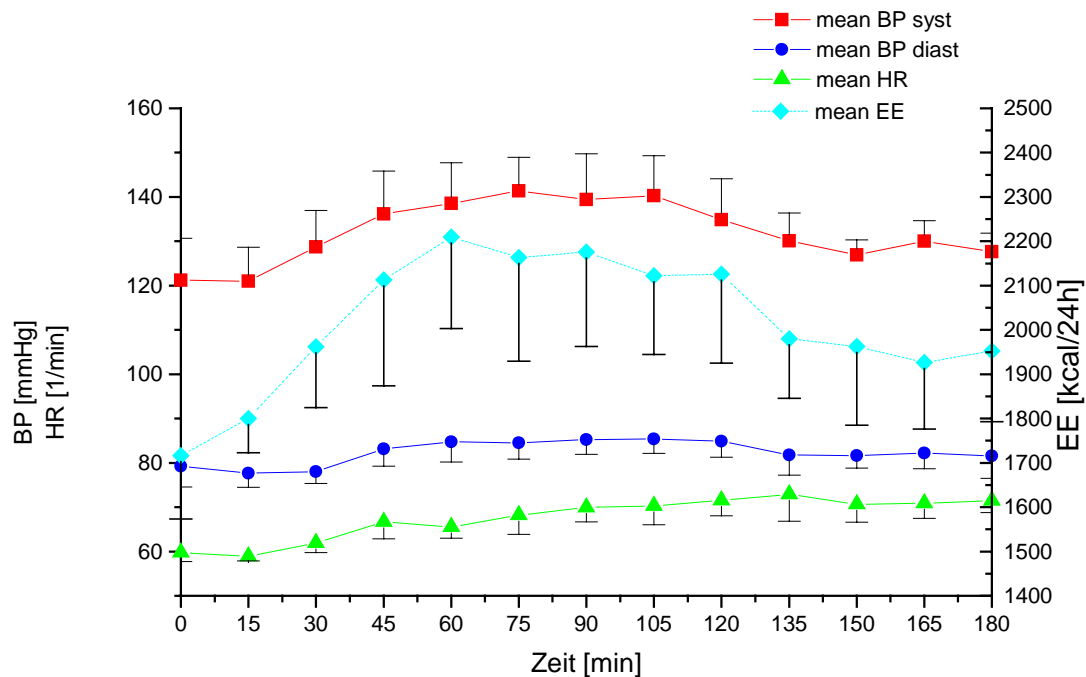
**Abb. 10** MEAN  $\pm$  SEM (n=4) von VCO<sub>2</sub> VO<sub>2</sub> und RQ vor und während der Stimulation mit Ephedrin (1mg/kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0. Der Basalwert zum Zeitpunkt 0 ist eine Mittelung der Werte von (-30 bis 0)

Sauerstoffverbrauch, Stickstoffausatmung und der RQ werden in Abb. 10 dargestellt. Die Werte zum Zeitpunkt Null sind die arithmetisch gemittelten Werte vom Zeitpunkt -30 bis zur Stimulation mit Ephedrin zum Zeitpunkt Null. Der Sauerstoffverbrauch und die Stickstoffausscheidung stiegen in den ersten 60 Minuten stark (ca. 28% ) an. Der RQ fiel über die Dauer des Versuches gesehen leicht ab.



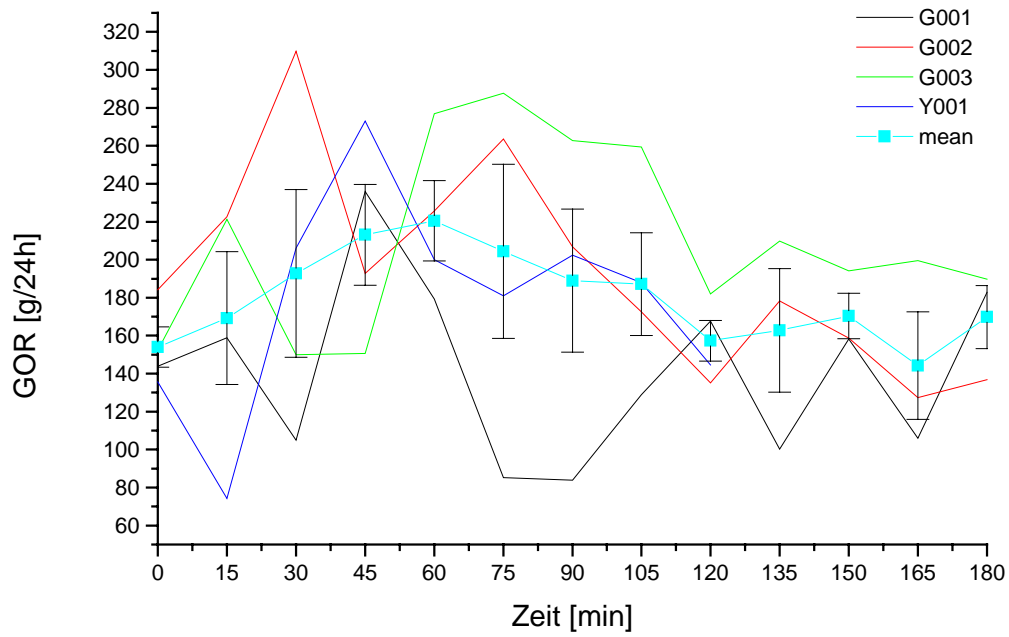
**Abb. 11:** Energieumsatz (EE) von 4 gesunden Probanden nach der Stimulation mit Ephedrin (1mg/kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt 0. Dargestellt sind die individuellen Kurvenverläufe und deren MEAN  $\pm$  SEM (n=4)

Abb. 11 zeigt die Energieumsätze der einzelnen Probanden im zeitlichen Ablauf des Versuches. Um die Wirkung des Ephedrin besser zu erkennen, wurde der Mittelwert über den Energieverbrauch eingezeichnet. Dadurch ist deutlich der durch Ephedrin induzierte Anstieg des Energieumsatzes (EE) erkennbar. Die durch Ephedrin herbeigeführte Erhöhung des systolischen Blutdruckes (BP) von 120 mmHg auf 140 mmHg in den ersten 75 Minuten kann aus Abb. 12 entnommen werden. Die damit verbundene Erhöhung des diastolischen Blutdruckes ist jedoch nicht so deutlich erkennbar. Die Herzrate(HR) stieg während der Versuche kontinuierlich an.

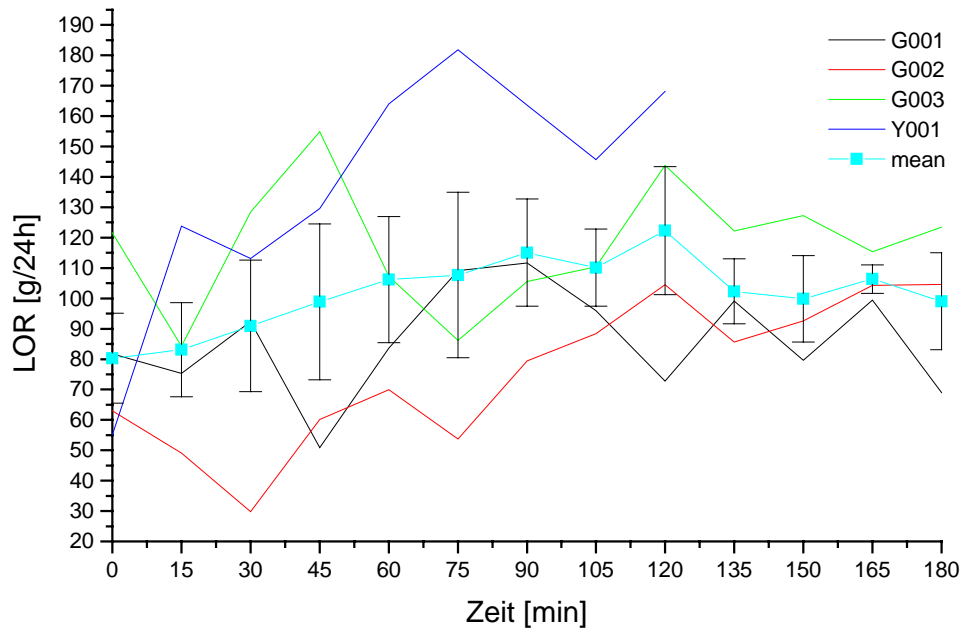


**Abb. 12** Arterieller Blutdruck, Puls und Energieumsatz(EE) zum Zeitpunkt und nach der Einnahme von Ephedrin. Die dargestellten Werte sind MEAN  $\pm$  SEM (n=4)

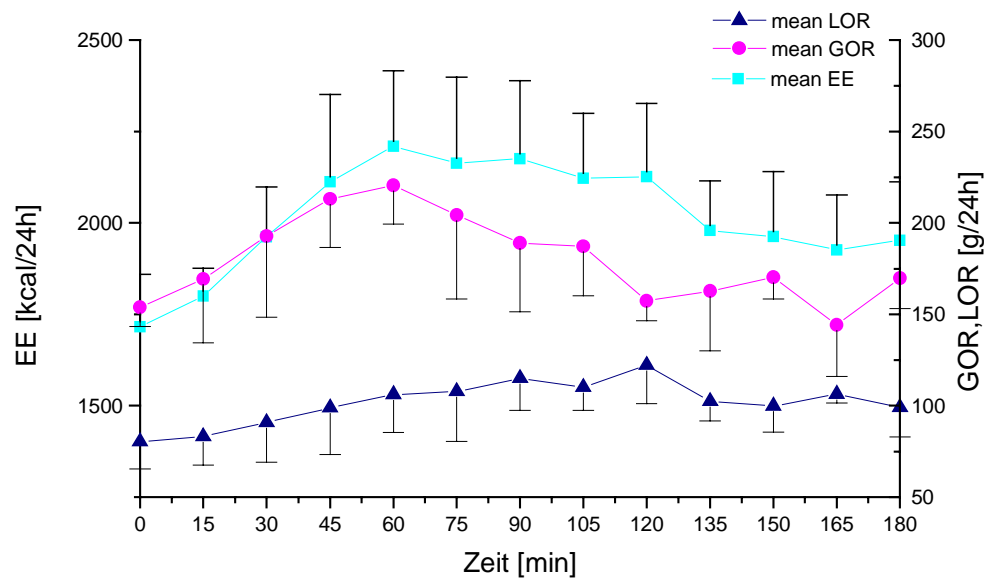
Abbildung 13 und 14 zeigen die individuellen Unterschiede der Glukoseoxidationsrate (GOR) und der Lipidoxidationsrate (LOR). An den Mittelwerten ist auch der durch Ephedrin induzierte Anstieg ersichtlich. Es fällt jedoch auf, daß die Glukoseoxidationsrate eine viel stärkeren Anstieg aufweist. Diese Mittelwerte der Oxidationsraten wurden gemeinsam mit dem ermittelten EE in Abbildung 15 eingetragen. Es ist zu erkennen, daß der Energieumsatz, trotz stärkerem Abfall der Glukoseoxidationsrate, (nachdem diese ihr Maximum erreicht hat) aufgrund der noch immer steigenden Lipidoxidationsrate, weitgehend konstant bleibt.



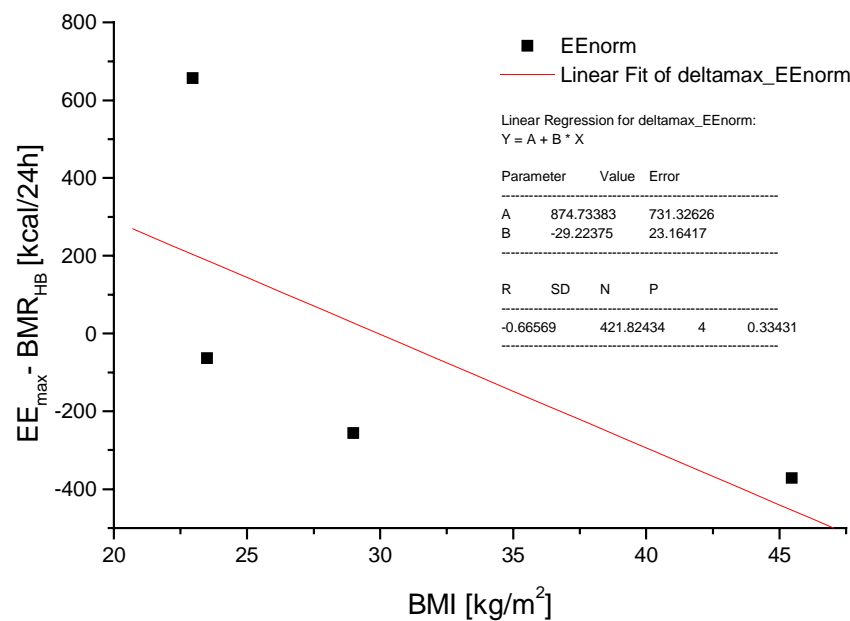
**Abb. 13** Glukoseoxidationsrate der einzelnen Probanden vor und nach der Stimulation mit Ephedrin. Des weiteren werden MEAN ± SEM (n=4) dargestellt.



**Abb. 14** Lipidoxidationsrate der einzelnen Probanden vor und nach der Stimulation mit Ephedrin. Des weiteren werden MEAN ± SEM (n=4) dargestellt.



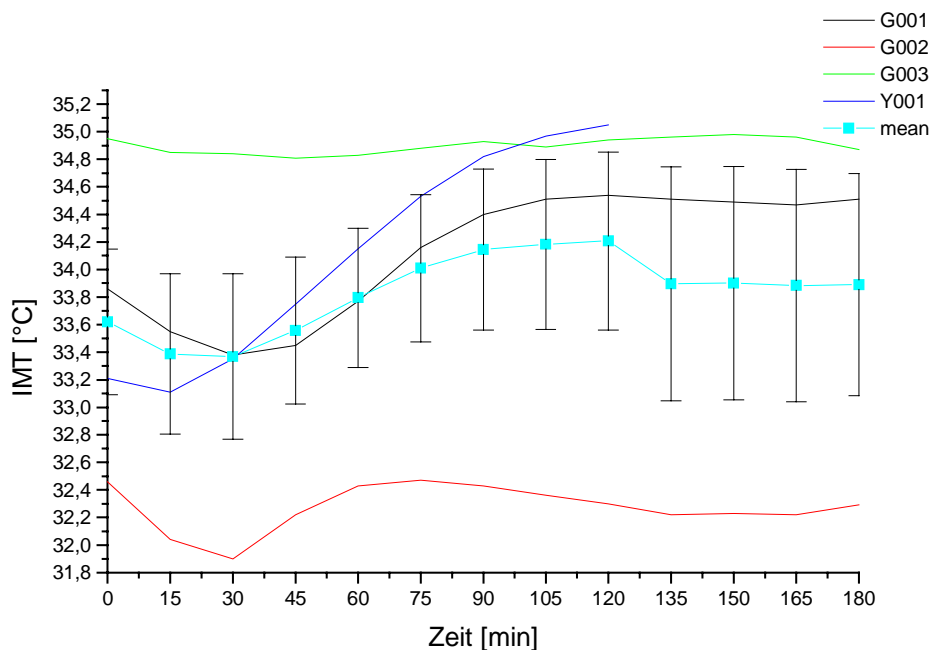
**Abb. 15** MEAN ± SEM (n=4) vom Energieumsatz und der Glukose- (GOR), Lipidoxidationsrate (LOR) zum Zeitpunkt und nach der Stimulation mit Ephedrin



**Abb. 16** Die Differenz zwischen dem maximal erreichten und dem basalen Energieumsatz wird über dem Body Mass Index (BMI) aufgetragen. Der basale Energieumsatz wurde mit der Formel von Harris Benedict Glg. (3) berechnet. Durch die geringe Anzahl der Probanden (n=4) gab es keine signifikante Korrelation.

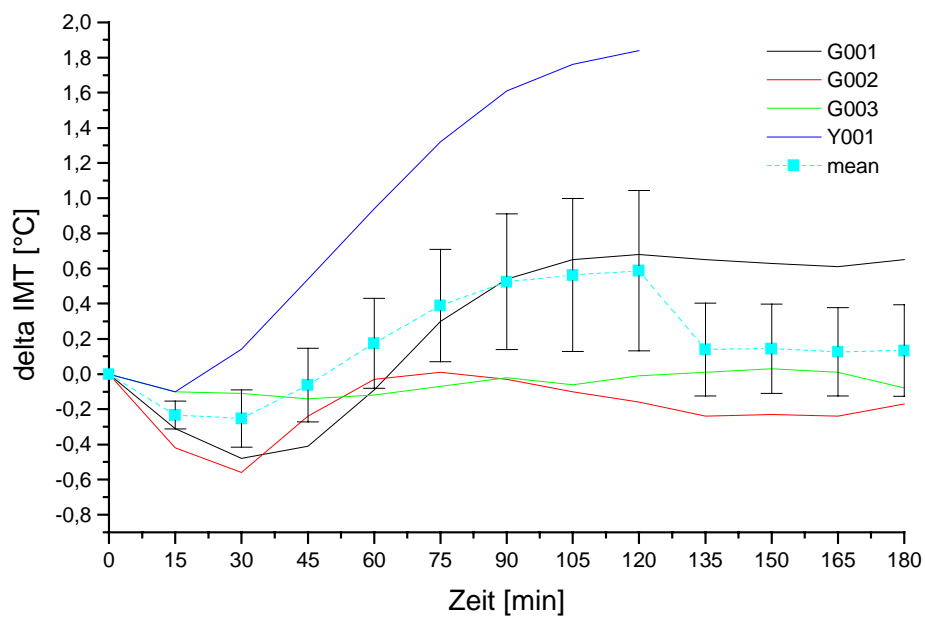
In Abb. 16 wird der im Versuch maximal erzielte Energieumsatz vom Basalenergieumsatz, welcher nach Harris Benedict (3) errechnet wird, subtrahiert und über den BMI aufgetragen. Aufgrund der geringen Anzahl an Probanden gab es jedoch keine Korrelation. Man sieht jedoch, daß eine Abhängigkeit der durch Ephedrin induzierten Erhöhung des Energieumsatzes zum BMI besteht.

Abb. 17 und 18 zeigen die mit der Temperatursonde im *musculus gastrocnemius* gemessenen absoluten bzw. relativen Temperaturen. In beiden Abbildungen kann man anhand des berechneten Mittelwertes einen deutlichen Anstieg des Temperaturverlaufes sehen. Interessant ist, daß sich der Temperaturverlauf von G003 (BMI > 40) kaum ändert und absolut gesehen wesentlich höher ist, als die Kurven der übrigen Probanden. In Abb. 18 ist weiters der überaus starke relative Temperaturanstieg des Probanden Y001 (BMI < 25) erkennbar. Diese Unterschiede könnten eine pathologische Relevanz darstellen.



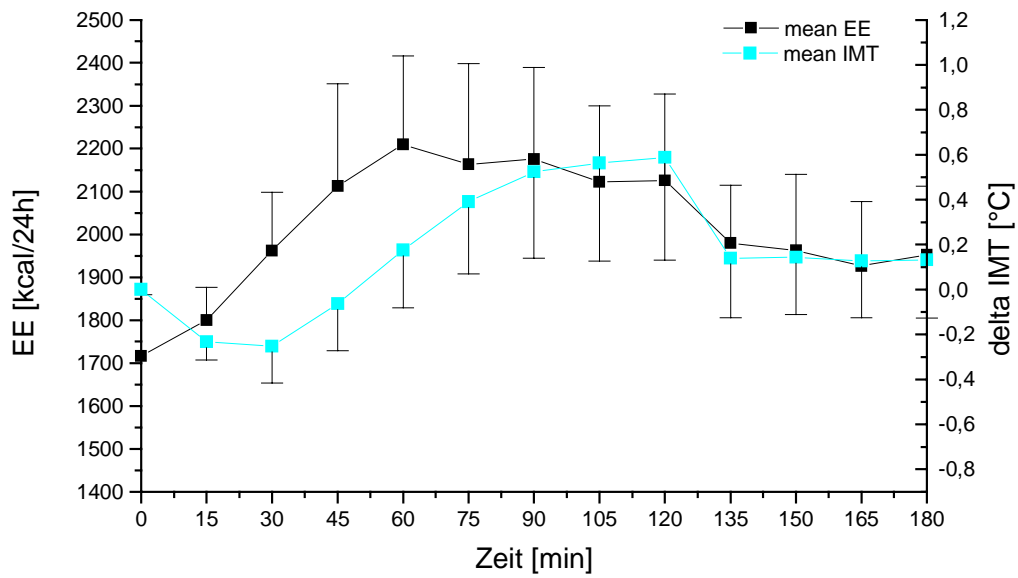
**Abb. 17** Absolut gemessene Temperaturen im *musculus gastrocnemius* vor und nach Stimulation mit Ephedrin. Weiters sind MEAN  $\pm$  SEM (n=4) der intramuskulären Temperatur (IMT) dargestellt.



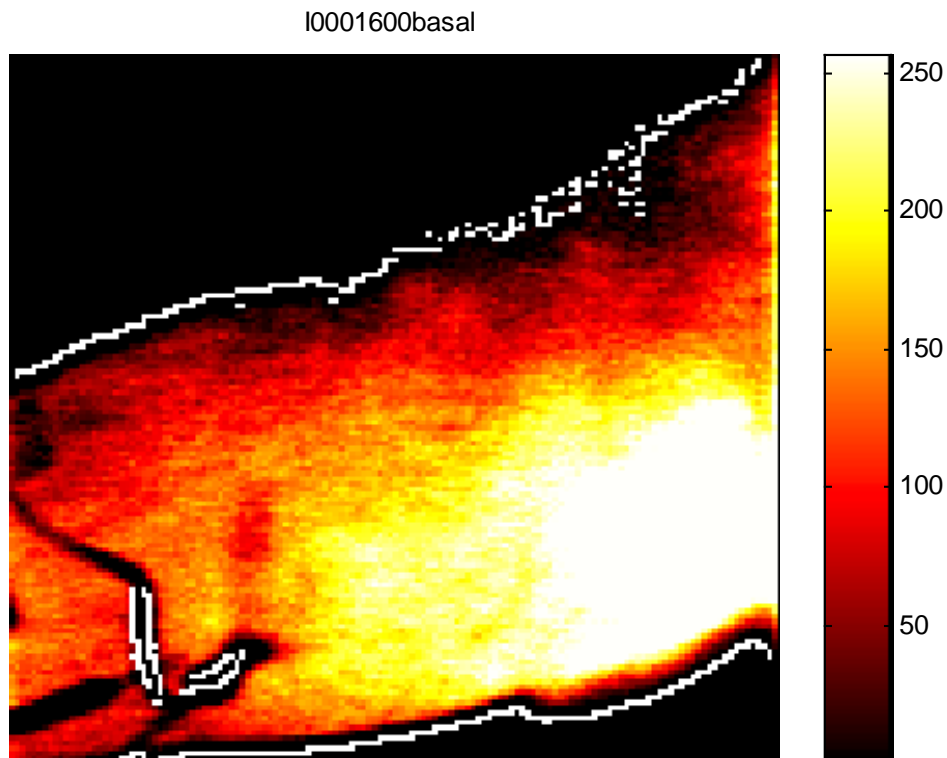


**Abb. 18** Temperaturdifferenz bezüglich des Basalwertes der intramuskulären Temperatur (IMT). Es werden MEAN  $\pm$  SEM (n=4) und die Kurven der einzelnen Probanden dargestellt.

Wird nun wie in Abb. 19 der Mittelwert des gemessenen Energieumsatzes und der intramuskulären Temperatur in einem Diagramm dargestellt, kann man erkennen, daß die intramuskuläre Temperatur des m. gastrocnemius dem Energieverlauf etwas zeitlich verzögert folgt.



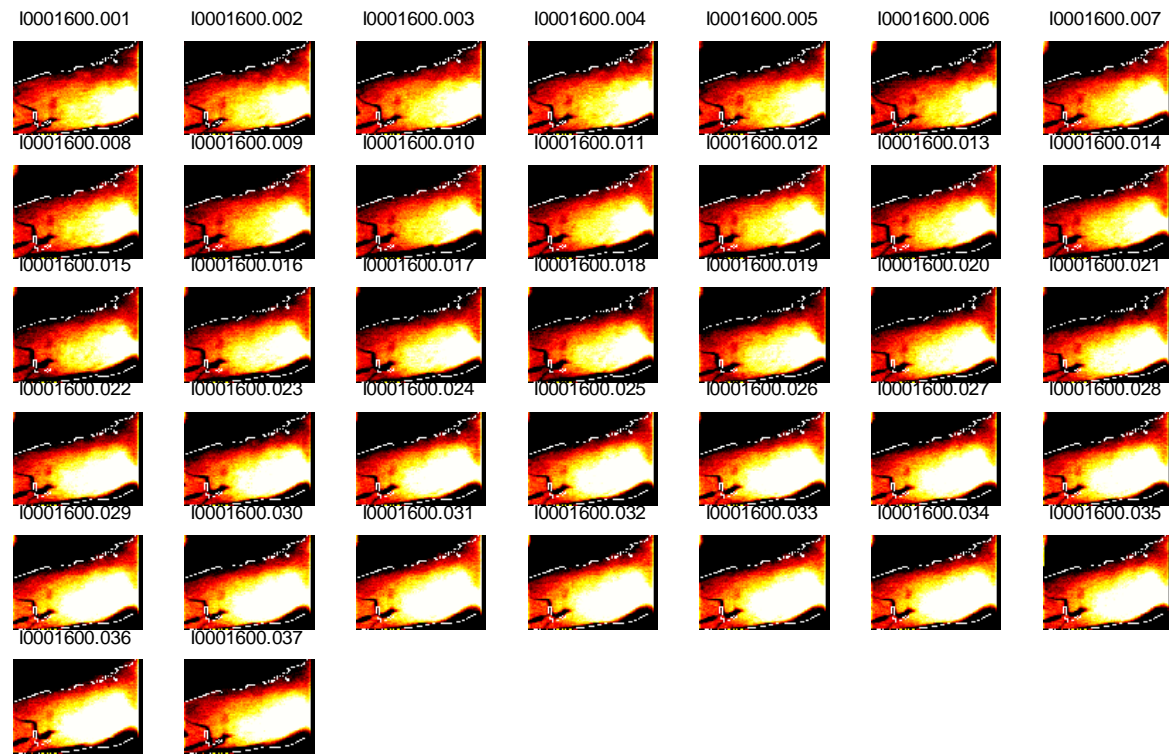
**Abb. 19** MEAN  $\pm$  SEM (n=4) vom Energieumsatz (EE) und der intramuskulären Temperaturdifferenz vor und während der Einnahme von Ephedrin.



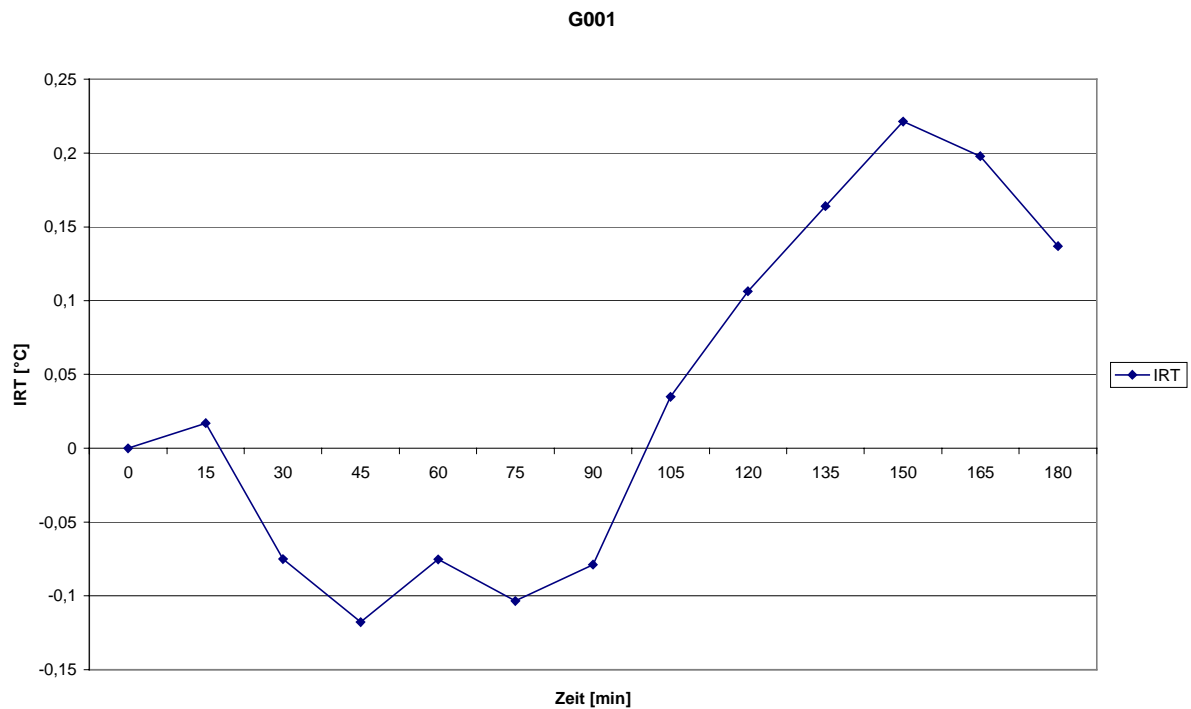
**Abb. 20** IR Bild zum Zeitpunkt 0 des Probanden G001. Weiße Linie skizziert die Region in der die Temperatur berechnet wird.

---

Abb. 20 zeigt das Infrarotbild des Probanden G001 zum Zeitpunkt 0. Die weißen Linien, die den Unterschenkel einschließen, sollen den Bereich für die Berechnung der Temperatur aus dem gespeicherten Bildes skizzieren. Des weiteren helfen diese Linien eine Positionsveränderung des Fußes des Probanden und die damit verbundenen Berechnungsfehler zu visualisieren. Rechts vom IR Bild wird die Temperaturskala angezeigt. Die dunklen Bereiche im linken Teil des Bildes werden durch die Temperatursonde und die Mikroperfusionsnadel verursacht. In Abb. 21 werden nun alle in einem Abstand von 5 Minuten aufgenommene IR. Bilder dargestellt. Es ist aus den einzelnen Bildern eine Veränderung der Oberflächentemperatur des Unterschenkels eindeutig zu erkennen. Um jedoch diese Änderungen besser darzustellen, wurden die aus den Bildern berechneten Temperaturen als Differenz zum ersten IR – Bildes im Graphen in Abb. 22 dargestellt.



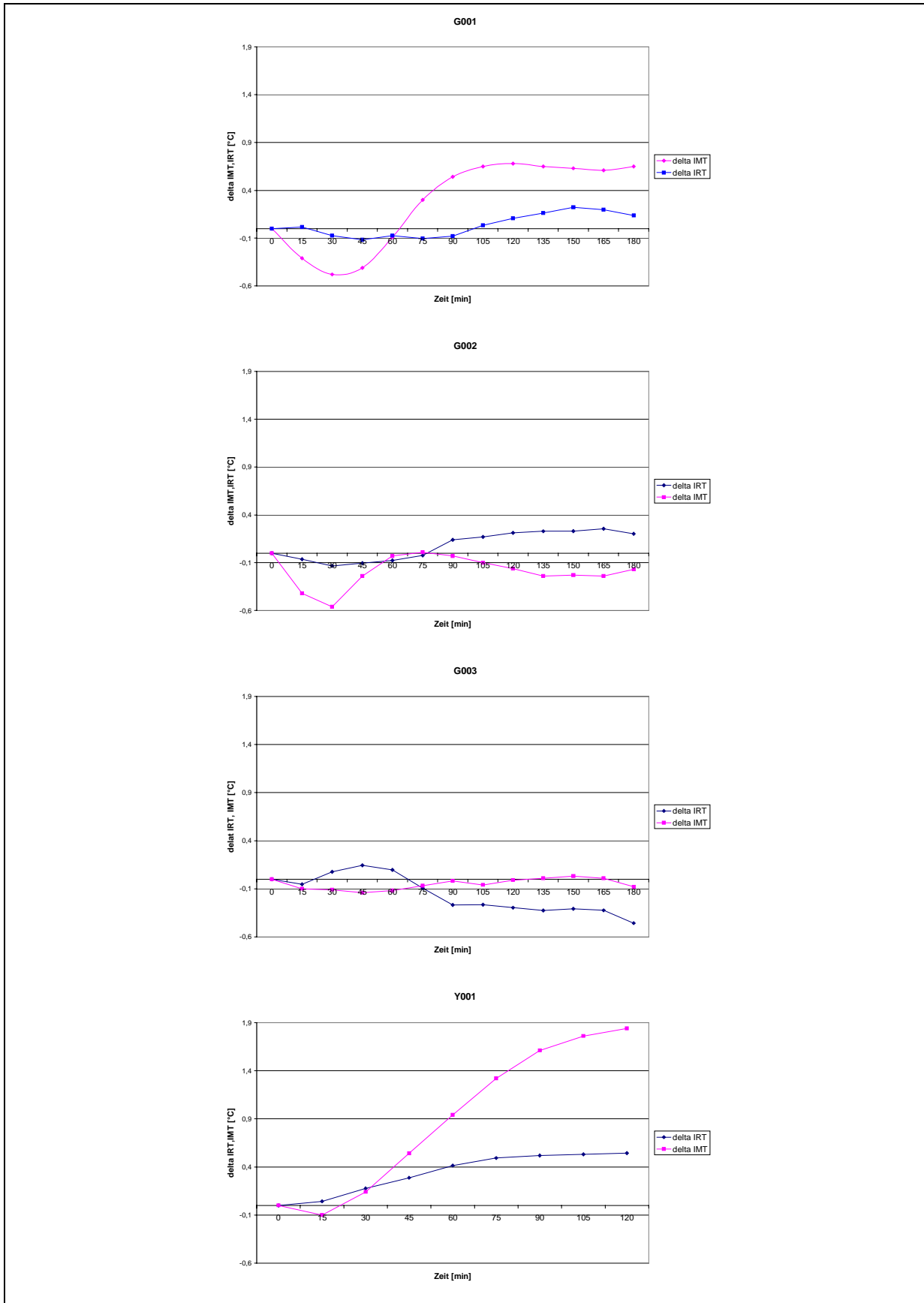
**Abb. 21** Aufgezeichneten IR Bilder des Probanden G001 in ihrer zeitlichen Abfolge von links nach rechts



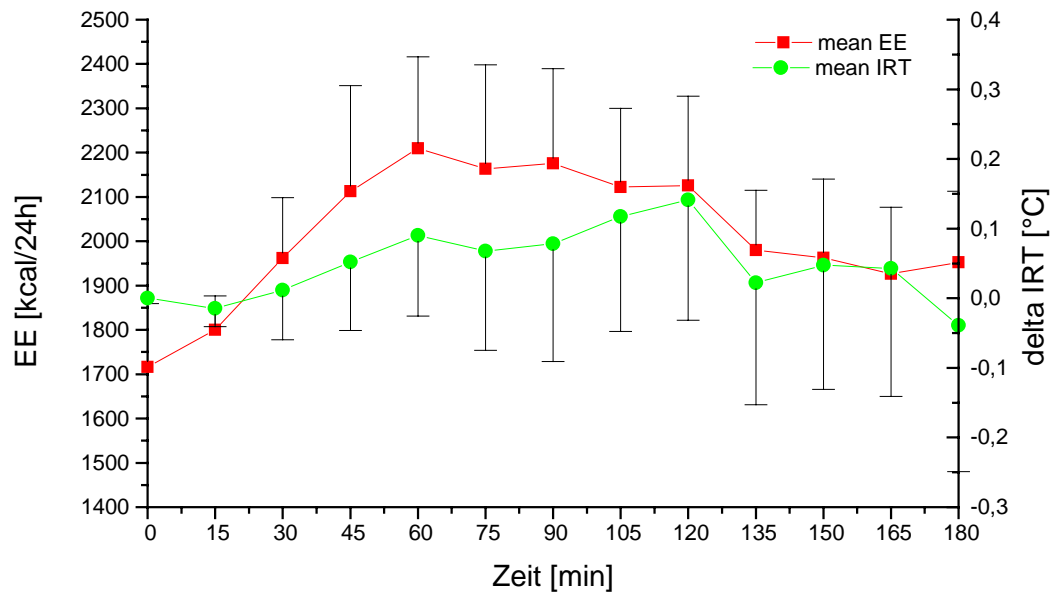
**Abb. 22** Temperaturverlauf der mit der IR-Kamera aufgezeichneten emittierten Wärme zum Zeitpunkt und nach der Stimulation mit Ephedrin von Proband G001

Abb. 23 zeigt den Vergleich der intramuskulären Temperatur mit der IR Temperaturmessung. Es ist ersichtlich, daß die mit der IR Kamera aufgezeichnete Temperatur sich wesentlich geringer und gegenüber der intramuskulären Sonde wesentlich später ändert.

Mittelt man aber die Daten der IR Messung und bildet diese mit dem Energieumsatz ab (siehe Abb. 24) so kann man auch hier eine verzögerte Reaktion der Wärmeemission auf die Erhöhung des Energieumsatzes beobachten.



**Abb. 23** Intramuskuläre Temperatur(IMT) des *m. gastrocnemius* und die vom Unterschenkel mittels IR - Kamera aufgezeichnete Wärmestrahlung (IRT) der vier Probanden.



**Abb. 24** MEAN  $\pm$  SEM (n=4) des Energieumsatzes und der Temperaturdifferenz der vom IR-Bild zum Zeitpunkt 0 aufgezeichneten Wärmestrahlung des Unterschenkels

Abb. 25 zeigt die Auswertung des DXA Scan's. In der Graphik links oben kann man die Verteilung der verschiedenen Gewebe (Fett) sehen. Im unteren Abschnitt, werden die aus dem Scan berechneten Werte der Fett-, Muskelmasse und Knochendichte dargestellt.

**Abb. 25** DXA Scan mit Auswertung eines Probanden



**Abb. 26**  $^1\text{H}$  MR Spektrum des *m. tibialis anterior*. Linker Peak EMCL rechter Peak IMCL

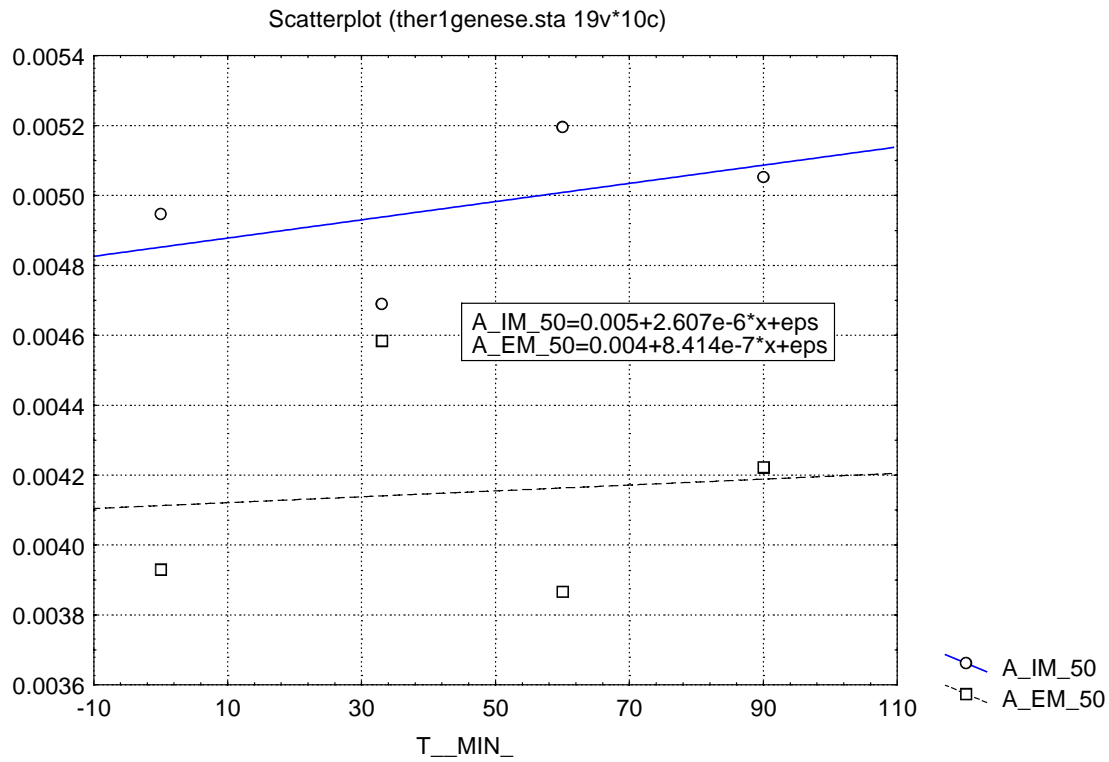


Abb. 27 Amplituden der IMCL und EMCL vor und nach der Stimulation mit Ephedrin

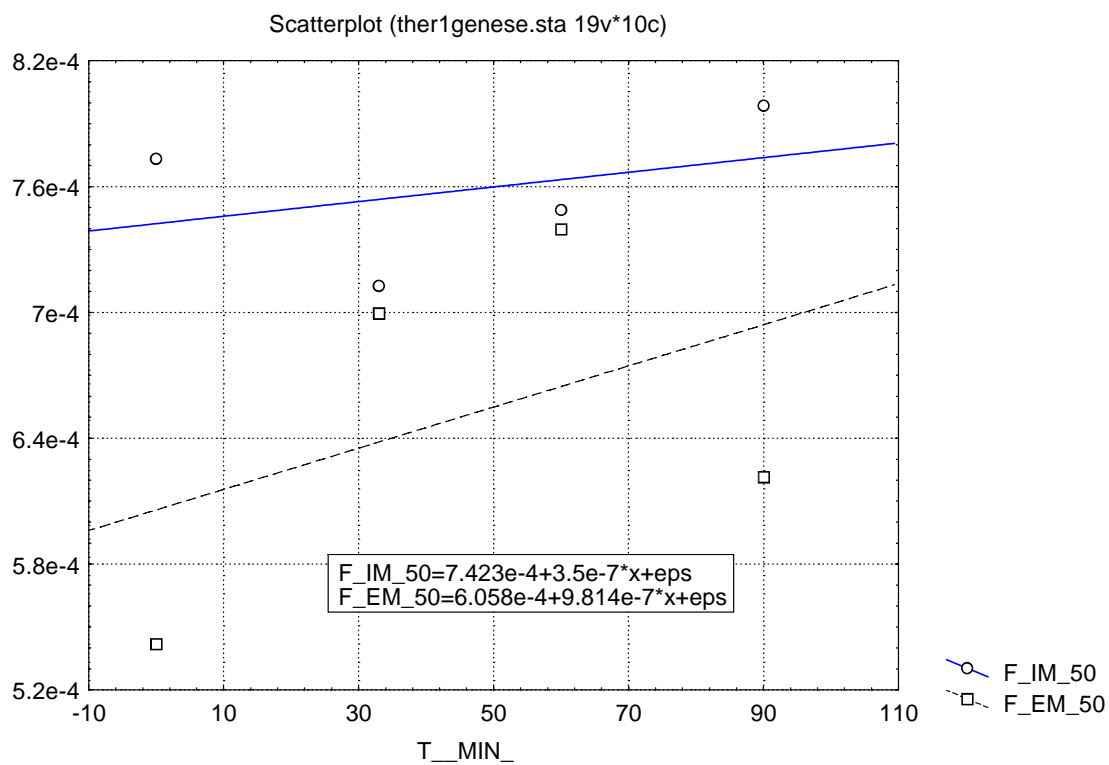


Abb. 28 Flächen unter den Peaks der IMCL und EMCL vor und nach der Stimulation mit Ephedrin

Abb. 26 zeigt das  $^1\text{H}$  MRS des musculus tibialis anterior vor der Einnahme von Ephedrin. Der linke Peak entspricht den EMCL der rechte den IMCL.

Abb. 27 und Abb. 28 zeigen den zeitlichen Verlauf der Amplituden bzw. der Flächen unter den Peaks vor und während der Stimulation mit Ephedrin. In Abb. 28 erkennt man, daß wenn man die Fläche von IMCL und EMCL (CH<sub>2</sub> Komplex) betrachtet, das Verhältnis IMCL/EMCL etwas kleiner wird. Es ist bei der Streuung aber nicht signifikant. Die Amplituden (Abb. 27) z.B. ergeben ein umgekehrtes Bild.

#### **4. Diskussion:**

In dieser Arbeit konnten „state of the art“ Methoden evaluiert werden, mit denen es möglich ist, die Thermogenese im Skelettmuskel von schlanken und adipösen Personen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, daß es mit dem entwickelten Protokoll und den verwendeten Tools möglich ist, eine größere Studie zu designen, um in dieser die Einflüsse der Thermogenese im menschlichen Skelettmuskel auf den Metabolismus beurteilen zu können.

Die gezeigten Ergebnisse bezüglich des Energieumsatzes und den kardialen Parametern stimmen mit den Ergebnissen von A. Astrup überein. Es wurde jedoch im Gegensatz zu den veröffentlichten Publikationen der Thermogenese - Forschung noch weitere Parameter aufgenommen und ausgewertet. So wurden zum erstmalig die intramuskulären Temperaturen (IMT) vor und während der Stimulation mit Ephedrin aufgezeichnet. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich ist, gibt es große Unterschiede zwischen den IMT der Probanden. So könnten einerseits die absoluten aber auch die relativen Unterschiede eine pathologische Relevanz darstellen. Die absoluten Temperaturunterschiede, die zwischen den Probanden zu erkennen waren, könnten aber auch aufgrund der besseren Isolation der Fettschicht, die den Muskel einschließt auftreten. Diese Annahme muß jedoch noch in weiteren Versuchen überprüft werden. Von größerer Bedeutung dürften aber die Unterschiede in den relativen Temperaturänderungen sein. Wie in den Ergebnissen zu sehen ist, folgt die IMT etwas zeitlich verzögert dem Energieumsatz. Aufgrund der großen und vom BMI abhängigen individuellen Temperaturschwankungen kann dies als eine Bestätigung der Arbeitshypothese gewertet werden.

Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Literatur bezüglich der respiratorischen Parameter rechtfertigt die Verwendung des indirekten Kalorimeters anstelle einer respiratorischen Kammer, die in vielen Studien verwendet wurde. Die Möglichkeit der Messung des Energieumsatzes mittels der „doubly labeled water“ Methode [51] wurde aufgrund des größeren Aufwand der instrumentellen Analytik und damit verbundenen höheren Kosten in dieser Versuchsreihe nicht in Betracht gezogen, da es sich um eine stationäre Messung handelte. Sie ist jedoch die Methode der Wahl, um den Energiehaushalt von Personen zu messen, ohne sie in irgendeiner Weise in ihren normalen Lebensgewohnheiten einzuschränken.

Mit Hilfe der Infrarot - Messung der Temperatur dürfte es jedoch viel schwerer sein, die individuellen Unterschiede der Thermogenese im Skelettmuskel zu beurteilen. Da es aber jedoch aufgrund der kleinen Anzahl von Versuchen sehr schwierig ist diesen Punkt in seiner

Ganzheit zu beurteilen, wird die Messung der Temperatur mit Hilfe der IR Kamera weiter verfolgt werden, da auch hier die Temperaturänderung dem Energieumsatz folgt.

Die Verwendung des Paratrend 7 (Biomedical Sensors Ltd, Pfitzer Hospital Products Group, High Wycombe, UK), eines zur intravaskulären Blutgasanalyse konzipierten Sensors, könnte sowohl bei der online Bestimmung der Blutgase sehr hilfreich sein. Viel interessanter wäre jedoch die Verwendung dieses Sensors, welcher pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, den pH Wert und die Temperatur messen kann, im Muskel. Von einer Verwendung dieses Sensors wurde in dieser Versuchsreihe aber noch abgesehen, da es einer eigenen Versuchsreihe bedarf, die mit diesem Sensor aufgenommenen Ergebnisse, mit den Arbeiten von Boekstegers und Fleckenstein [12,16,33,63,25,26,9] zu vergleichen. Auch der große finanzielle Aufwand ließ uns zu diesem Zeitpunkt noch vom Einsatz dieses Sensors absehen. (ca. ATS 6000.- pro Proband)

Da es mit Hilfe der Mikroperfusion und der Mikrodialyse möglich ist, interstitielle Flüssigkeit zu sampeln und diese zu einem späteren Zeitpunkt zu analysieren, können die Unterschiede der Catecholamin Konzentrationen systemisch und lokal festgestellt werden. Bei der Untersuchung von Noradrenalin in der intrazellulären Flüssigkeit bietet die Mikrodialyse aufgrund der kürzeren Schlauchlängen einen wesentlichen Vorteil gegenüber der Mikroperfusion, da hier die Gefahr der Oxidation des Noradrenalin wesentlich geringer ist.

Wie schon in der Einleitung angedeutet wurde, kann aufgrund der Messungen von [13] der Skelettmuskel als Ort der fakultativen Thermogenese und somit vielleicht auch der NST vermutet werden. [13] zeigten, daß die Messung der IMCL und der EMCL im Skelettmuskel möglich ist. Wie in Abb. 3 ersichtlich ist, fallen die IMCL nicht nur durch eine starke körperliche Belastung sondern auch nach der Essenseinnahme ab. In dieser Diplomarbeit wurde gezeigt, daß es prinzipiell möglich ist, die durch Ephedrin induzierte Veränderung der IMCL und EMCL zu messen. Eine Schlußfolgerung aus den gemessenen IMCL und EMCL ist aufgrund der noch fehlenden Versuche an dieser Stelle noch nicht möglich. Es ist noch nicht erklärbar, warum sich die Verhältnisse von der Fläche und die der Amplitude konträr verhalten. Im weiteren soll auch die Messung der intramuskulären Temperatur während der MR Messung in die Versuche implementiert werden. In dieser Versuchsreihe konnte aber eine Messung der IMT aufgrund der hohen Invasivität noch nicht durchgeführt werden, da bei der Magnetresonanz Spektroskopie ein spezieller Temperatursensor eingesetzt werden muß, dessen Durchmesser ca. 14 Ga. betragen hätte. Grundsätzlich bestünde auch die Möglichkeit der nichtinvasiven Temperaturmessung im MR.[45] Da diese Methode aber noch nicht ausreichend erprobt und validiert wurde, wurde auch von dieser Methode Abstand

genommen. Man kann jedoch annehmen, daß die MR - Spektroskopie in Zukunft einen noch größeren Stellenwert in der Messung der Thermogenese einnehmen wird.

Für die Bestimmung der Fettmasse wurde aufgrund der Einfachheit und der Genauigkeit dem DXA der Vorzug gegenüber anderen Methoden gegeben. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, das es in Graz möglich ist, mit Hilfe dieser Methode die freie Fettmasse zu bestimmen und somit die Auswertung der Daten auf diese gewonnenen Parameter zu normieren.

Die Ergebnisse der Lipolyse Bestimmung mittels markiertem Glycerol, welches sowohl im Plasma als auch in der ICF des Muskels gemessen wurde, können an dieser Stelle noch nicht diskutiert werden. Diese Proben wurden zur Auswertung in die USA gesendet und werden zur Zeit vom Howard Hughes Medical Institute, Yale University, New Haven, CT, USA( Prof. G.I. Shulman) ausgewertet.

Die neue „Anti-obesity drug“ Sibutramine könnte ebenfalls mit den hier verwendeten Methoden untersucht werden. Versuche zeigten das Sibutramine die Thermogenese in Ratten stimuliert. Im Gegensatz zu Ephedrin hat es auch den Vorteil, daß es wie ein Appetitzügler (Anorectica) wirkt.[4,24]

Bei näherer Betrachtung der verwendeten Methoden kann man sehen, daß diese sich nicht nur für die klinische Forschung der Thermogenese eignen. Es wäre möglich, diese Methoden in der klinischen Routine zur Feststellung der zur Risikogruppe der malignen Hyperthermie (MH) gehörenden Patienten zu verwenden. Die MH ist eine vererbare Krankheit, die einem autosomalen dominanten Erbgang folgt. Es handelt sich dabei primär um eine Stoffwechselstörung im Skelettmuskel. Ausgelöst durch Triggersubstanzen, wie das Inhalationsanästhetika Halothan, kann es zu einer Art Dauerkontraktion der Skelettmuskels kommen, die zum Tod führen kann. Bis jetzt konnte man aber den genetischen Defekt nicht lokalisieren, und daher sind Muskelbiopsien, mit denen anschließend aufwendige mechanische Untersuchungen gemacht werden, die einzige Möglichkeit, die Risikogruppe der MH zu bestimmen [35]. Da wie in [60] berichtet wird, Ephedrin die Kontraktilität steigert, könnte die Hypothese postuliert werden, daß zwischen den UCP3 und der MH ein funktioneller Zusammenhang bestehen könnte. Da die Mikroperfusion die Möglichkeit bietet, Medikamente lokal zu verabreichen, könnte hier eine Methode mit Hilfe der Temperatursensoren entwickelt werden, welche die Muskelbiopsien ersetzen kann.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es in dieser Arbeit gelungen ist „state of the art“ Methoden zu evaluieren und ein Protokoll zu entwickeln, mit dem es möglich ist, den Einfluß der Thermogenese in menschlichen Skelettmuskel auf den Metabolismus zu untersuchen. Die dabei entwickelten Methoden könnten auch in Zukunft in der klinischen Routine zur Diagnose der malignen Hyperthermie eingesetzt werden.

**Anerkennung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in irgendeiner Form bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Zlatko Trajanoski, für die fortlaufende Unterstützung und Betreuung. Ebenso möchte ich mich bei Dr. W. Löscher und Dr. S. Quasthoff für die medizinische Betreuung, bei Dr. K.H. Smolle für die Bereitstellung der med. Geräte, bei Dr. R. Stollberger für das Durchführen und das Einbringen seines Know How bei den MR Messungen und bei E. Stach für die Durchführung der DXA Messung bedanken. Besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben.

DANKE



**Literaturverzeichnis:**

- [1] Astrup A.: Thermogenesis in human brown adipose tissue and skeletal muscle induced by sympathomimetic stimulation. *Acta endocrinologica Supplementum* 278 Vol.112, 1986
- [2] Astrup A. Büllow J. et al: Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *Am. J. Physiol* 248: E507-E515, 1985
- [3] Astrup A. Büllow J., et al.: Facultative thermogenesis induced by carbohydrate A skeletal muscle component mediated by ephedrine. *Am. J. Physiol* 250: E226-E229, 1986
- [4] Astrup A. Hansen D.L. et al: Sibutramine and energy balance. *Int J Obes Relat Metab Disord* Aug 22 Suppl. 1: 30-5; discussion 36, 1998
- [5] Astrup A. Lundsgard C et al.: Enhanced thermogenic response during chronic ephedrine treatment in man. *Am J Clin Nutr* 42: 83-94, 1985
- [6] Astrup A. Madsen J. et al.: The Effect of Chronic Ephedrine Treatment on Substrate Utilization, the Sympathoadrenal Activity, and Energy Expenditure during Glucose-Induced Thermogenesis in Man. *Metabolism*. 35: 260-265, 1986
- [7] Astrup A. Raben A. et al.: Fat metabolism in predisposition to obesity. *Annals of the New York Academy of Science* Sep.20; 827: 417-30, 1997
- [8] Astrup A., Toubro S., et al.: Impact of the v/v 55 polymorphism of the uncoupling protein 2 gene on 24-h energy expenditure and substrate oxidation. *International Journal of Obesity* 23: 1-5, 1999
- [9] Balasubramanian V., Boots R. J.: Carbon dioxide and oxygen partial pressure measurements in the cerebrospinal fluid in a conventional blood gas analyzer: analysis of bias and precision. *Journal of Neurological Sciences* 147: 5-8, 1997
- [10] Björntorp P.: Neuroendocrine factors in obesity. *J Endocrinol.* Nov; 155(2): 193-5, 1997
- [11] Block B. A.: Thermogenesis in Muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 535-77, 1994
- [12] Boekstegers P., Fleckenstein W., et al.: Überwachung der Sauerstoffversorgung des Skelettmuskels und der Gesamtsauerstoffaufnahme bei koronarchirurgischen Eingriffen. *Anaesthesist* 37: 287-296, 1988
- [13] Boesch C., Slotboom J. et al.: In Vivo Determination of Intra-Myocellular Lipids in Human Muscle by Means of Localized 1H MR spectroscopy. *MRM* 37: 484-493, 1997
- [14] Bottcher H., Furst P.: Decreased white fat cell thermogenesis in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* Jun; 21(6): 439-44 , 1997
- [15] Brondel L., Fricker J., Fantino M.: Postprandial thermogenesis and alimentary sensory stimulation in human subjects. *International Journal of Obesity* 23: 34-40, 1999
- [16] Brückle W. Fleckenstein W., et al : Gewebe pO<sub>2</sub> Messung in der verspannten Rückenmuskulatur. *Zeitschrift f. Rheumatologie* 49: 208-216, 1990
- [17] Christin L. O'Connell M. et al.: Norepinephrine Turnover and Energy Expenditure in Pima Indian and White Men. *Metabolism* Vol 42 June: 723-29, 1993

- 
- [18] Fagher B, Liedholm H. et al.: Effects of teributaline on basal thermogenesis of human muscle and Na-K pump after 1 week of oral use – a placebo controlled comparison with propranolol. *Br. J. Clin Pharmacol.* Jun 35 (6): 629-35, 1993
- [19] Ferranini E.: The Theoretical Bases of Indirect Calorimetry: A Review. *Metabolism*, Vol 37, No 3 (March): 287-301, 1988
- [20] Florez-Duquet M. McDonald R.B.: Cold – induced thermoregulation and biological aging. *Physiol Rev* Apr; 78(2): 339-58, 1998
- [21] Gudden F., Hofmann F.W.: Röntgentechnik. H.Hutten *Biomed. Technik 1*
- [22] Gura T.: Regulation of Body Weight Uncoupling Proteins Provide New Clue to Obesity's Causes. *Science Magazine* May: 1369-70, 1998
- [23] Hallgren P: Energy expenditure of adipose tissue. *Eur J. clin Invest* 15 A3: 83-94, 1985
- [24] Heal D.J., Aspley S.: Sibutramine: a novel anti obesity drug . A review of the pharmacological evidence to difference it from d-amphetamine and d-fenfluramine *Relat.Metab. Disord* Aug;22 Suppl.1: 18-28; discussion S29, 1998
- [25] Honig C. R., Gayeski T.E.: Intracellular pO<sub>2</sub> in long axis of individual fibers in working dog gracilis muscle. *The American Physiological Society* : H1179-86, 1988
- [26] Honig C. R., Gayeski T.E.: O<sub>2</sub> gradients from sarcolemma to cell interior in red muscle at maximal VO<sub>2</sub>. *The American Physiological Society* : H789-99, 1986
- [27] James W.P.T., Trayhuran P.: Thermogenesis and Obesity. *Br. Med. Bulletin* Vol.37: 43-48, 1981
- [28] Jebb S.A., Prentice A.M.: Assessment of human energy balance. *J Endocrinol.* Nov;155(2): 183-5, 1997
- [29] Jequier E.: Methods of measuring energy expenditure and substrate utilization. *Diabetes Reviewes* Vol. 4 Number 4: 423-32, 1996
- [30] Jerek P., Engstova H. et al.: Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta Jun 10; 1365(1-2): 319-25, 1998*
- [31] Jung R.T.: Obesity and Nutritional Factors in the Pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes in Obesity* , 1998
- [32] Jung R.T. Shetty P.S., et al.: Reduced Thermogenesis in Obesity. *Nature* May 24; 279 (5711): 322-3, 1979
- [33] K. Groebe: A versatile model of steady state O<sub>2</sub> supply to tissue. *Biophys. J.* Vol 57: 485-498, 1990
- [34] Kersing T. Reinhart K.: The effect of dopamine on muscle PO<sub>2</sub> in healthy volunteers and intensive care patients. *European Journal of Anaesthesiology* 2: 143 –153, 1985
- [35] Klein W., Spieß-Kiefer C., et al.: Diagnose der Anlage zu Maligner Hyperthermie mit Hilfe des in vitro-Kontrakturtests. *Anaesthesist* 36: 685-691, 1987
- [36] Krssak M., Falk Petersen K., et al.: Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study. *Diabetologia* 42: 113-116, 1999

- 
- [37] Kuschinsky G., Lüllmann H., Mohr K.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. *Thieme*, Stgt 13. Auflage
- [38] Levin J.A. Eberhardt N.L., et al.: Role of Nonexercise Activity Thermogenesis in Resistance to Fat Gain in Humans. *Science Magazine* Jan: 212-14, 1999
- [39] Litscher G. Möller K.O. et al.: Laser – Doppler Datenanalyse während interstitieller Laserthermotherapie unter Magnetresonanz – Kontrolle im Rahmen einer tierexperimentellen Studie. *Biomedizinische Technik* Band 42 Heft 4: 93-96, 1997
- [40] Litscher G. Möller K.O. et al.: Laser Doppler Flowmetry in Hyperbaric Environment. *Lasers in Medical Science* 12: 342-346, 1997
- [41] Litscher G. Schwarz G. et al.: Laser Doppler Flowmetry – Peripheral Microcirculation during Cessation and Cardiocirculatory Function. *Biomedizinische Technik* Band 40 Heft 7-8: 195-199, 1995
- [42] Litscher G. Schwarz G. et al.: Laser – Doppler Flowmetrie – Erfahrungen aus der Intensivmedizin. *Biomedizinische Technik* Band 41 Heft 6: 166-169, 1996
- [43] Lowell B.B.: Adaptive thermogenesis: turning on the heat. *Curr Biol*. Jul 16; 8 (15): R517-20, 1998
- [44] Mejsnar J. Pacha J.: Thermogenesis due to noradrenaline in muscles under different rates of perfusion. *Pflügers Arch* 397: 149-151, 1983
- [45] Mietzsch E., Koch M., et al.: Non-invasive temperature imaging of muscles with magnetic resonance imaging using spin-echo sequences. *Medical & Biological Engineering & Computing* November: 673-678, 1998
- [46] Nordfors L., Hoffstedt J., et al.: Reduced Gene Expression of UCP2 and UCP3 in skeletal muscle of human obese subjects. *Diabetologia* 41: 935-939, 1998
- [47] Oberkofler H., Liu Y.M., et al.: UCP –2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans. *Diabetologia* 41: 940-946, 1998
- [48] Pietrobelli A., Formicia C., et al.: Dual–energy X-ray absorptiometry body composition model: Review of physical concepts. *American Journal of Physiology* : E941-51, 1996
- [49] Qureshi A, Koppelman P.G.: Leptin – fat messenger or fat controller . *Clin Endocrinol (Oxf)* Aug; 47(2): 169-71, 1997
- [50] Ravussin E. Danforth E.: Beyond Sloth – Physical Activity and Weight Gain. *Science Magazine* Jan:184-185, 1999
- [51] Ravussin E. Swinburn B.A., et al.: Energy expenditure and obesity. *Diabetes Reviews* Vol 4 Nr. 4: 403-22, 1996
- [52] Sachs L.: Angewandte Statistik. *Springer Verlag* 9. Aufl., 1999
- [53] Salibi N. M., Brown M. A.: Clinical MR Spectroscopy : First Principles. *Paperback* - March 1998
- [54] Samec S., Seydoux J., Dulloo A.G.: Post-Starvation Gene Expression of Skeletal Muscle UCP2 and UCP3 Protein in Response to Dietary Fat Levels and Fatty Acid Composition. *Diabetes* Vol 48 February: 436-41, 1999

- 
- [55] Simonsen L. Bülow J. Madsen J.: Adipose tissue metabolism in humans determined by vein catheterization and microdialysis techniques. *The American Physiological Society*: E357-65, 1994
- [56] Stetter E., Oppelt A.: Magnetresonanztomographie (MRT). H.Hutten *Biomed. Technik* 1
- [57] Stock M.J: Thermogenesis and energy balance. *Int J Obes Relat Metab Disord* Dec; 16 Suppl 2: 13-6, 1992
- [58] Szczepaniak L.S., Babcock E.E., et al.: Measurement of intracellular triglyceride stores by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy: validation in vivo. *American Journal of Physiology* May; 276(5Pt1): E977-89, 1999
- [59] Trajanoski Z.: Techniques for In Vivo Assessment of Glucose and FFA Metabolism . Medizintechnik, *Shaker Verlag* Achen, 1998
- [60] Urwyler A., Censier K, et al.: In vitro effect of ephedrine, adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on halothane – induced contractures in skeletal muscle from patients potentially susceptible to malignant hyperthermia. *British Journal of Anaesthesia* 70: 76-79, 1993
- [61] Weckelgren I.: Regulation of Body Weight How Big a Problem. *Science Magazine* May: 1364-67, 1998
- [62] Weckelgren I., TaubesG.: Regulation of Body Weight As obesity Rates Rise. *Science Magazine* May: 1367-68, 1998
- [63] Zollinger A., Saphan D.R., et al.: Accuracy and clinical performance of a continuous intra-arterial blood-gas monitoring system during thoroscopic surgery. *British Journal of Anaesthesia* 79: 47-52, 1993
- [64] Zurlo F., Nemeth P.M., Ravussin E.: Whole body energy metabolism and skeletal muscle biochemical characteristics. *Metabolism* 43: 481-486, 1994
- [65] Zurlo F.,Larson K. , Ravussin E.: Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *J Clin Invest* 86: 1423-1427, 1990

AnhangDatei Datex Deltatrac II

Die erste Zeile beinhaltet Patienteninformation und die Zweite die Kalibrationsinformation

```
D96,PAT,099,010,012,009,028,021,006,074,MAL,180,088000,025,003,003,013000
D97,CAL,099,010,012,008,029,009,499,500,953,950
D01,000,009,029,023340,030070,077,020380,209,068,083,000,000000,262,751,001,000
D01,000,009,030,021960,027310,080,018620,209,064,076,000,000000,262,751,001,000
D01,000,009,031,021440,028330,075,019090,209,062,078,000,000000,262,751,001,000
D01,000,009,032,020480,025780,079,017520,209,059,072,000,000000,264,751,000,000
D01,000,009,033,021190,027950,075,018840,209,062,077,000,000000,265,751,000,000
D01,000,009,034,020550,027380,075,018410,209,060,075,000,000000,266,751,000,000
```

**1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17**

Nr	Funktion
1	Instrumenten ID
2	Markierung
3	Stunde
4	Minute
5	VCO <sub>2</sub> * 100 in ml/min STPD
6	VO <sub>2</sub> * 100 in ml/min STPD
7	RQ * 100
8	Energieumsatz * 10 kcal/24h
9	FiO <sub>2</sub> * 0.1%
10	FeCO <sub>2</sub> /FCO <sub>2</sub> * * 0.01%
11	(FiO <sub>2</sub> -FeO <sub>2</sub> )/(FiO <sub>2</sub> -FO <sub>2</sub> *) *0.01%
12	RR (nur für Respirator Mode)
13	VE (nur für Respirator Mode)
14	Temperatur *10 °C
15	Luftdruck mmHg
16	Artifakt: 0 kein Artifakt / 1 Artifakt
17	Status (nicht benutzt)

Datei YSI 4600

9:17; 000; 35.897 ; 37.664  
9:18; 000; 35.852 ; 37.627  
9:19; 000; 35.803 ; 37.586  
9:20; 000; 35.752 ; 37.543  
9:21; 000; 35.706 ; 37.505  
9:22; 000; 35.652 ; 37.460  
9:23; 000; 35.600 ; 37.417  
9:24; 000; 35.560 ; 37.383  
9:25; 000; 35.521 ; 37.351  
9:26; 000; 35.479 ; 37.316  
9:27; 000; 35.442 ; 37.285  
9:28; 000; 35.410 ; 37.258  
9:29; 000; 35.375 ; 37.229

**1      2      3      4**

<b>Nr.</b>	<b>Funktion</b>
1	Zeit
2	Markierung
3	Korrigierte Temperatur
4	Angezeigte Temperatur

Datei in EXCEL Format von MATLAB

```

0; 195.86; 253.84; 0.76; 1714.40; 56.76; 119.56; 1725.54; 35.37;
15; 223.11; 282.72; 0.78; 1921.08; 101.65; 123.56; 1930.73; 34.72;
30; 205.84; 264.36; 0.78; 1789.79; 73.50; 120.87; 1800.36; 34.24;
45; 207.41; 260.03; 0.79; 1768.60; 104.33; 106.40; 1778.38; 33.75;
60; 228.69; 268.23; 0.84; 1851.13; 207.21; 74.26; 1857.63; 33.50;
75; 233.32; 278.39; 0.83; 1915.20; 190.00; 87.85; 1922.14; 33.66;
90; 228.82; 297.79; 0.76; 2013.93; 68.48; 146.54; 2024.63; 33.88;
105; 233.75; 300.53; 0.77; 2037.64; 88.32; 141.17; 2047.75; 34.14;
120; 226.92; 292.45; 0.78; 1981.31; 81.02; 138.11; 1991.54; 34.22;
135; 230.12; 301.49; 0.76; 2036.55; 59.61; 152.46; 2047.56; 34.28;

```

**1      2            3            4            5            6            7            8            9**

<b>Nr.</b>	<b>Funktion (gemittelte Werte)</b>
1	Zeit
2	VCO2 ml/min STPD
3	VO2 ml/min STPD
4	RQ
5	Energieumsatz kcal/24h
6	Glukose Oxidationsrate g/24h
7	Lipidoxidationsrate g/24h
8	Energieumsatz kcal/24h nach (9)
9	Intramuskuläre korr. Temperatur

Glycerol ZERTIFIKAT









