

**Universitätsklinikum Ulm**  
**Zentrum für Innere Medizin**  
**Klinik für Innere Medizin II**

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Vinzenz Hombach

**Adipositas: Inflammation im viszeralen Fettgewebe**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

**Andrea Maria Sonnleitner**

Krumbach

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Debatin

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Marx

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wabitsch

Tag der Promotion: 12.02.2010

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	II
<b>1. Einleitung</b>	
1.1 Adipositas und Insulinresistenz	1
1.2 Fettgewebsinflammation	4
1.3 CD-4 positive T-Lymphozyten	8
1.4 Fragestellung	10
<b>2. Material und Methodik</b>	
2.1 Material	11
2.2 Methodik	13
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Gemeinsame Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker	21
3.2 Diabetiker	28
3.3 Nicht –Diabetiker	32
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Gemeinsame Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker	36
4.2 Diabetiker	42
4.3 Nicht-Diabetiker	45
4.4 Pathophysiologische Relevanz	46
4.5 Limitationen der Studie	47
<b>5. Zusammenfassung</b>	50
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	51

**Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
+	positiv
µl	Mykroliter
Abb.	Abbildung
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BMI	body mass index
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CD	cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GLUT	Glucose-Transporter
h	hour
hs-CRP	high-sensitive C-reaktives Protein
HDL	High Density Lipoprotein
HLA	Human leukocyte antigen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	horse radish peroxidase
IDF	International Diabetes Federation
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IGT	Impaired glucose tolerance
kg	Kilogramm
IL	Interleukin
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MCP	Macrophage chemoattractant protein
MHC	Major Histocompatibility Complex

min.	Minuten
Mio.	Millionen
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate buffered saline
RANTES	regulated on activated normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
T <sub>H1</sub>	T-Helferzellen der Gruppe 1
T <sub>H2</sub>	T-Helferzellen der Gruppe 2
TNF	Tumor necrosis factor
T-Zellen	im Thymus gereifte Lymphozyten
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World health organisation
WHR	waist to hip ratio

## 1. Einleitung

### 1.1 Adipositas und Insulinresistenz

Adipositas ist eines der größten globalen Gesundheitsprobleme des 21. Jahrhunderts, das besonders in Europa einen großen Anteil der Bevölkerung betrifft. Sie ist für sich gesehen keine Krankheit, stellt jedoch einen Hauptrisikofaktor für Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und Arteriosklerose dar [62,63]. Um die Adipositas besser klassifizieren zu können wurde der Body Mass Index (BMI) eingeführt (Tab. 1). Er berechnet sich aus folgender Formel: Körpergewicht in kg / Körpergröße in m<sup>2</sup>.

**Tab. 1: Definition Body mass index (BMI) [24]**

<b>Gewichtsklassifikation</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht (Präadipositas)	25,0 – 29,9
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9
Adipositas Grad III (extreme Adipositas)	40 oder mehr

Der BMI wird im klinischen Alltag als grobes Maß zur Einschätzung des Körperfettanteils genutzt. Für das kardiovaskuläre Risiko ist jedoch nicht allein das Körpergewicht, sondern besonders das Fettverteilungsmuster von Bedeutung. Hier ist die für Männer typische abdominelle Adipositas, die sog. „Apfelform“ prognostisch ungünstiger als die häufig bei Frauen anzutreffende „Birnenform“ mit typischen Fettansammlungen im Oberschenkel- und Hüftbereich.

Die Prävalenz der Adipositas steigt rapide an, die WHO (World Health Organisation) erwartet bis 2010 insgesamt 150 Mio. betroffene Erwachsene und 15 Mio. betroffene Kinder in der europäischen Region [57,62,63].

Die abdominelle Adipositas ist neben erhöhten Blutdruck-, Blutzucker- und Blutfettwerten, ein wichtiger Bestandteil des Metabolischen Syndroms. Das Metabolische Syndrom, auch bekannt als „Wohlstandssyndrom“, schließt das Fettverteilungsmuster als zentralen Punkt mit ein. Nach der International Diabetes Federation (IDF) fällt eine abdominelle Adipositas mit einem Taillenumfang >94cm für Männer und >80 cm für Frauen unter die Definition Metabolisches Syndrom [24]. Diese Werte gelten für Europäer. Zusätzlich müssen mindestens zwei der folgenden Faktoren erfüllt werden:

- Erhöhter Triglyceridspiegel >150 mg/dl (>1,70 mmol/l) oder vorausgegangene Therapie dieser Störung
- Vermindert HDL-Cholesterin <40mg/dl (<1,03 mmol/l) für Männer und <50 mg/dl (<1,29 mmol/l) für Frauen oder
- Blutdruck >130/85 mmHg oder vorausgegangene Therapie dieser Störung
- Nüchtern – Plasmaglukose >100mg/dl (5,6 mmol/l) oder Diabetes mellitus Typ 2 [24]

Typisch für das metabolische Syndrom sind eine verstärkt altersbezogene Prävalenz (30-40%) im mittleren und höheren Alter, eine erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität, ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie sowie eine häufige Assoziation mit subklinischen Organschäden wie Mikroalbuminurie, eingeschränkter glomerulärer Filtrationsrate, arterieller Steifheit, linksventrikulärer Hypertrophie, diastolischer Dysfunktion und in einigen Studien einer Verdickung der Wand der Arteria carotis, wobei einige dieser Veränderungen auch unabhängig vom Vorliegen eines arteriellen Hypertonus zu detektieren waren. Zusätzlich zeigt sich ein proinflammatorisches Milieu mit erhöhten Werten des hochsensitiven C-reaktiven Proteins (hsCRP) und ein 3- bis 6-fach erhöhtes Risiko, einen Diabetes mellitus zu entwickeln. Dieses deutlich erhöhte Diabetesrisiko spiegelt sich in der Tatsache, dass rund 80% aller an Diabetes mellitus Typ 2 Erkrankter adipös sind [24].

Somit ist es nicht verwunderlich, dass die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2, ebenso wie die der Adipositas, einen Aufwärtstrend zeigt. Die Daten der IDF für die Prävalenz des Diabetes mellitus in Europa, beschreiben einen Anstieg von 25 Mio. Erkrankter im Jahr 2003, auf 29 Mio. bis zum Jahr 2025 [29]. Diabetes mellitus ist eine chronische erbliche Stoffwechselerkrankung und beruht auf einem absoluten oder relativen Insulinmangel. 95% aller Diabetiker sind Typ 2 Diabetiker. Pathogenetisch spielen eine gestörte Insulinsekretion und eine herabgesetzte Insulinwirkung (Insulinresistenz) eine wichtige Rolle. Insulinresistenz wird definiert als ein vermindertes Ansprechen der Zielorgane auf Insulin. Dies hat einen Stoffwechselzustand mit zu hohen Insulinwerten bei normalen oder erhöhten Glukosekonzentrationen zur Folge. Auf molekularer Ebene liegt eine Übertragungsstörung des Insulinsignals innerhalb der Zellen vor. Als Folge werden vermindert Glukose-Transport-Moleküle bereitgestellt, so dass weniger Glukose als gewöhnlich in die Zellen gelangt. Bei Adipositas finden sich im Rahmen der Fettgewebsinflammation vermehrt insulinresistenzfördernde Zytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) [28].

Als Resultat der Insulinresistenz können die Zellen im Fettgewebe, der Skelettmuskulatur und der Leber nicht mehr ausreichend auf endogenes oder exogen zugeführtes Insulin reagieren, so dass es zu einer reduzierten Insulinwirkung an den Zielorganen kommt. Um die drohende Unterversorgung der Zielorgane zu kompensieren, schütten die Inselzellen der Bauchspeicheldrüse vermehrt Insulin aus. Durch diese Mehrsekretion kann der Blutzuckerspiegel über einen bestimmten Zeitraum im Normbereich gehalten werden. Jedoch erreicht das Pankreas meist im Laufe mehrerer Jahre, die durch Hyperinsulinämie geprägt sind, einen Punkt, an dem die Insulinsekretion nicht weiter gesteigert werden kann. Das bedeutet, dass der Körper nach Nahrungsaufnahme den Blutglukosespiegel nicht schnell genug in normale Bereiche senken kann wie z.B. eine gesunde Person. Diese Phase wird Stadium der gestörten Glukosetoleranz (IGT= Impaired glucose tolerance) genannt.



Im Stadium der gestörten Glukosetoleranz, kann es durch die fortgeschrittene Insulinresistenz der Zellen dazu kommen, dass der Organismus postprandiale Glukose-Spitzenwerte nicht mehr auffangen kann und die Nüchtern-Plasma-Glukose schließlich anhaltend hoch bleibt. Aus der anfänglichen Insulinresistenz hat sich nun ein manifester Diabetes mellitus Typ 2 entwickelt. Somit ist eine Insulinresistenz charakteristisch für Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. Es gibt jedoch auch andere Erkrankungen, die mit Insulinresistenz assoziiert sind, wie z.B. die Adipositas, die ebenso einen Hauptrisikofaktor bei der Entstehung der Insulinresistenz darstellt [16]. Das metabolische Syndrom schließt sowohl Diabetes mellitus Typ 2, als auch als Hauptkriterium die abdominelle Adipositas mit ein. Die Insulinresistenz ist also ein gemeinsamer Faktor dieser beider Kriterien.

Bei adipösen Patienten wurde eine Erhöhung unspezifischer Entzündungsparameter wie das gesamte  $\gamma$ -Globulin [34], die Körpertemperatur [17], Leukozyten [44] und C-reaktives Protein [55] festgestellt. Diese Daten legen eine gesteigerte Aktivität des Immunsystems bei Adipositas nahe und verdeutlichen, dass die chronische Inflammation im Fettgewebe, bei der Entstehung einer Insulinresistenz, eine wichtige Rolle spielen könnte [60].

## **1.2 Fettgewebsinflammation**

Der Entstehungsmechanismus der Arteriosklerose durch Entzündungsvorgänge in den Gefäßen ist schon seit geraumer Zeit aufgedeckt, während die Inflammation im Fettgewebe erst seit kurzem zunehmend als Quelle einer chronischen Entzündungsaktivität, mit Einfluss sowohl auf die Atherogenese als auch auf die Insulinresistenz gilt. Besonders dem viszeralen Fettgewebe wird bei diesem Prozess eine Rolle zugeschrieben [41]. Seit ungefähr 10 Jahren ist bekannt, dass das weiße Fettgewebe nicht nur als Speicherort für Triglyzeride dient, sondern selbst viele unterschiedliche Proteine sog. Adipozytokine produziert.

Zu den Adipokinen zählen Zytokine, Chemokine und hormonähnliche Stoffe wie z.B. Adiponektin, Leptin, TNF- $\alpha$ , Leptin, MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), RANTES (regulated on activated normal T cell expressed and secreted) und Resistin [30].

Adiponektin hat im Gegensatz zu den meisten anderen Adipokinen eine insulinsensitivierende und atheroprotektive Wirkung [41]. Bei Übergewichtigen ist es vermindert nachweisbar, ebenso bei Entzündungszuständen mit erhöhtem hsCRP und bei Insulinresistenz [26]. Einige Studien konnten die insulinsensitivierende Wirkung von Adiponektin sowohl auf Leber- als auch auf Muskelzellen nachweisen. Adiponektin verstärkt z.B. die insulininduzierte Hemmung der Glukosefreisetzung in Leberzellen [3,67] und stimuliert die Fettsäureoxidation in Muskelzellen [66,67]. Somit hat es Einfluss auf die Senkung des Blutzuckerspiegels. Es wird angenommen, dass die Wirkung von Adiponektin als Insulinsensitizer über eine Aktivierung der Adenosin-Monophosphat-Kinase reguliert wird, die auch die Insulinsensitivierung nach körperlichem Fitnessstraining vermittelt [52,67]. Spranger et al. fanden in ihrer Arbeit heraus, dass hohe Plasmakonzentrationen von Adiponektin mit einem verminderten relativen Risiko für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 einhergehen [49]. Somit ist Adiponektin nach heutigem Kenntnisstand ein wichtiger Schutzfaktor bezüglich der Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2. Der Mehrzahl der Adipokine wird jedoch eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben, hierzu zählen unter anderem TNF- $\alpha$ , Leptin und Resistin.

TNF- $\alpha$  ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, das über Interleukin 1 (IL-1) und IL-6 lokale und systemische Entzündungsreaktionen im Körper reguliert. Es senkt die Insulinsensitivität der Zellen, was bisher jedoch nur bei Nagetieren nachgewiesen werden konnte [27,40]. Moller et al. konnte in diversen Adipositas- und Insulinresistenz- Mausmodellen erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  nachweisen [40]. Weiterhin führt TNF- $\alpha$  zu einer verminderten Translokation des insulinabhängigen Glukose-Transporters 4 (GLUT 4) ins Muskel- und ins Fettgewebe und hat somit direkten Einfluss auf die Entstehung einer Insulinresistenz und einen daraus resultierenden Diabetes mellitus [32,40].

Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  hat Leptin, ein weiteres von Adipozyten sezerniertes Zytokin, keinen Einfluss auf die Glukose-Transporter. Leptin ist ein Adipokin, das das Hungergefühl reduziert, eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel spielt und folglich direkt das Körpergewichte reguliert. Es führt zentral über eine negative Rückkopplung im Hypothalamus zu einer verminderten Nahrungsaufnahme [22]. Da die Plasmakonzentration von Leptin positiv mit der Körperfettmasse und der Adipozytengröße korreliert, kann angenommen werden, dass bei Adipositas eine vermehrte Leptinausschüttung vorliegt [1]. Somit spiegelt, bei geregelter Nahrungszufuhr, die Leptinkonzentration die Körperfettmenge exponentiell wider [25]. Da durch ansteigende Leptinspiegel bei Zunahme des Körpergewichtes der Appetit reduziert wird, dürfte rein theoretisch eine Adipositas gar nicht erst entstehen. Jedoch liegt bei Übergewichtigen bereits ein erhöhter Leptinspiegel vor, der unter anderem über eine Veränderung der Rezeptordichte dazu führt, dass der Organismus auf eine Leptingabe nicht mehr adäquat reagiert. Dieses Phänomen wird als Leptinresistenz bezeichnet [25]. Zusätzlich hat Leptin auch eine Angiogenese fördernde Wirkung [6]. Bisher konnte durch den therapeutischen Einsatz von Leptin nur bei adipösen Kindern mit genetisch bedingtem Leptinmangel eine Senkung der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes nachgewiesen werden [20].

Resistin ist ein weiteres Adipokin, das ähnlich wie TNF- $\alpha$ , die Insulinresistenz in Muskel- und Leberzellen steigert, dessen Wirkung bisher aber nur in unterschiedlichen Mausmodellen gezeigt werden konnte [50]. Im Mausexperiment zeigte sich bei Übergewicht ein Anstieg von Resistin. Durch die darauf folgende Gabe von Antikörpern gegen Resistin, konnten sinkende Blutzuckerwerte und folglich eine gesteigerte Insulinsensitivität gemessen werden. Für die Expression des Resistins scheint besonders das viszerale Fettgewebe bedeutend zu sein, wobei das Resistin dort verstärkt durch „Nichtfettzellen“ sekretiert wird [18]. Bei Nagern führt ein erhöhter Resistin-Spiegel zu einer verminderten Insulinsensitivität, während ein Ausschalten des Resistingens zu einer verbesserten Stoffwechsellage führen kann [43].

Beim Menschen konnte jedoch nur eine Korrelation zwischen der Resistinexpression und dem BMI bzw. Adipositas nachgewiesen werden, sowie erhöhte Resistin-Spiegel bei Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 [2,13,30,39,68]. Somit können die im Tierexperiment beschriebenen Zusammenhänge vorerst nicht auf den Menschen übertragen werden. Daher bleibt die Funktion und die Rolle von Resistin bei der Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen noch weitgehend unklar.

Neben den dargestellten Zytokinen werden aus dem Fettgewebe auch Chemokine wie z.B. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), auch unter dem Namen CCL-2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2) bekannt, freigesetzt. Zusätzlich wird es von unterschiedlichen Geweben wie glatten Muskelzellen, Monozyten und Endothelzellen sezerniert. Es ist ein Chemokin, das an der Einwanderung und der Anhäufung von Makrophagen im Fettgewebe beteiligt ist [11]. Makrophagen exprimieren auf ihrer Oberfläche CD-68 (cluster of differentiation 68) und sind in aktiviertem Zustand zur Phagozytose fähig. Sie entstammen dem Knochenmark und gelangen als Monozyten ins Blut. Sie wandern, nach dem Kontakt mit aktivierten Endothelzellen, in unterschiedliche Gewebe aus und differenzieren sich dort zu Makrophagen. Bei diesem Vorgang spielt die Chemotaxis über CCL-2 und dessen Rezeptor CCR-2 eine wichtige Rolle [59]. Da CCL-2 von Adipozyten produziert wird, wandern die Makrophagen auch ins Fettgewebe. Die Interaktion der Adipozyten, Makrophagen und Endothelzellen führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , dessen fördernde Wirkung auf die Entstehung einer Insulinresistenz bereits genannt wurde. Makrophagen gelten derzeit als die ausschlaggebende Zellart im Fettgewebe für die Entstehung einer lokalen, chronischen Inflammation [59,65].

Ein ebenfalls vom Fettgewebe produziertes Chemokin ist RANTES, das auch CCL-5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5) genannt wird. RANTES wird nicht nur von Adipozyten, sondern zusätzlich von glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Monozyten und aktivierten T-Zellen freigesetzt. Es ist ein Chemokin für T-Lymphozyten[48,90], rekrutiert aber auch andere Immunzellen wie z.B. Monozyten und Makrophagen. Außerdem ist es an der Atherogenese beteiligt [9]. Bei Adipositas ist RANTES vermehrt im Fettgewebe nachweisbar [64].

### **1.3 CD-4 positive T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten sind die Träger der spezifischen Immunantwort. Das T steht für den Thymus, da die T-Lymphozyten dort reifen und geprägt werden. Nach der Prägung und Reifung im Thymus befinden sich nur noch ca. 1% der Lymphozyten im Blut, der Rest hält sich hauptsächlich im Gewebe, im Ductus thoracicus, in den Lymphknoten und in der Milz auf. Die meisten Lymphozyten, die in die sekundären lymphatischen Organe auswandern, sind CD-4 und CD-8 positive Zellen. CD-8 positive T-Zellen werden als zytotoxische Zellen oder auch T-Killerzellen bezeichnet, während CD-4 positive Zellen allgemein als T-Helferzellen ( $T_H$ ) bezeichnet werden. Funktionell können die CD-4 positiven T-Lymphozyten in T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen unterschieden werden. Die T-Helferzellen können in 2 weitere Gruppen unterteilt werden. Dies sind T-Helferzellen der Gruppe 1 ( $T_{H1}$ ) und T-Helferzellen der Gruppe 2 ( $T_{H2}$ ).

$T_{H1}$  setzen vorwiegend inflammatorische Zytokine wie  $TNF-\alpha$ , IL-2 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) frei, während  $T_{H2}$  die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 produzieren.  $T_{H2}$  sind wesentlich an der humoralen Immunantwort beteiligt. Sie können B-Zellen aktivieren, die dann als Plasmazellen Antikörper produzieren. Zusätzlich stimulieren sie auch eosinophile Granulozyten bei allergischen Reaktionen.

$T_{H1}$  hingegen verstärken die zelluläre Immunantwort indem sie andere T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (APZ) anlocken. Über die Ausschüttung von  $IFN-\gamma$  sind die T-Zellen zudem in der Lage, andere Zellen zu aktivieren. Dieser Vorgang führt zu einer Expression des Oberflächenmarkers HLA-DR. T-Zellen befinden sich normalerweise im Ruhezustand und müssen, um ihre Funktion ausüben zu können aktiviert werden. Zunächst wird das Antigen durch APZ phagozytiert, in kleine Peptid-Fragmente zerteilt und über MHC II-Moleküle (Major Histocompatibility Complex) den  $T_H$  präsentiert. Der Oberflächenmarker CD-4 der  $T_{H2}$  bindet ausschließlich an Klasse-II-MHC-Moleküle, während CD-8 der T-Killerzellen nur an Klasse-I-MHC-Moleküle bindet. Durch die Aktivierung werden über diverse Signaltransduktionswege die oben genannten Zytokine wie IL-2,  $IFN-\gamma$  und  $TNF-\alpha$  vermehrt exprimiert und somit sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort angeregt. Um im Normalfall effektiv wirken zu können, werden die  $T_H$  über Chemotaxis in den Bereich des Körpers geleitet, wo Krankheitserreger eingedrungen sind [35].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass T-Helferzellen durch ihre unterstützende und regulierende Funktion bei der Aktivierung des Immunsystems eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen einnehmen. Aktuelle Studien fanden bei Adipositas vermehrt T-Lymphozyten im Fettgewebe [33,64]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass neben den Makrophagen auch T-Lymphozyten bei der Entstehung und Verstärkung der Inflammation im Fettgewebe und der Entwicklung einer Insulinresistenz eine zentrale Rolle spielen [33,64]. Unklar ist, ob es sich bei den im Fettgewebe vorkommenden T-Lymphozyten um CD-4 oder CD-8 positive Lymphozyten handelt und inwiefern es eine Korrelation mit Insulinresistenz und Adipositas gibt.

## 1.4 Fragestellung

Studien der letzten Jahre sehen in der zunehmenden Adipositas einen großen Risikofaktor für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2. Da besonders das viszerale Fettgewebe endo- und parakrine Eigenschaften besitzt [41], soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, inwieweit CD-4 positive T-Lymphozyten im Fettgewebe vorkommen und ob es einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Adipositas und der Fettgewebsinflammation gibt.

Im Einzelnen ergeben sich daraus folgende Fragestellungen:

1. Finden sich inflammatorische Zellen, vor allem CD-4 positive Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe?
2. Kommt es im Rahmen der Adipositas zu einer Veränderung des inflammatorischen Milieus im viszeralen Fettgewebe?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Fettgewebsvaskularisation und dem Vorkommen inflammatorischer Zellen im viszeralen Fettgewebe?

## 2. Material und Methodik

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Substanzen und Lösungen

Aceton	AppliChem GmbH, Germany
ABC (Avidin-Biotin-Complex) – Kit	Vector Laboratories, USA
AEC Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, USA
Anti human, CD-31, Endothelial cell, Monoclonal Mouse	Dako, Denmark
Anti human T-Cell, CD-4, Monoclonal Mouse	Dako, Denmark
Biotinylated Goat anti mouse Immunglobulins	Dako, Denmark
EnVision+ System-HRP (AEC)	Dako, Denmark
Goat Serum (Normal)	Dako, Denmark
HLA-DR antibody, Mouse Monoclonal	Biozol, Germany
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Germany
Mayers Hämalaunlösung	Merck, Germany
Methanol	Merck, Germany
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Austria
Rabbit Serum (Normal)	Dako, Denmark
Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems, Germany
Wasserstoffperoxidlösung 30%	Otto-Fischer GmbH, Germany



### 2.1.2 Geräte und Software

Adhäsionsobjektträger, Polysize	Menzel, Germany
Brutschrank „Hera Cell“	Heraeus, Germany
Deckgläser, rechteckig	Menzel, Germany
Graph Prism Plus	GraphPad Software, USA
Image - Pro Plus	Media Cybernetics, USA
Kimtech Science	Kimberly – Clark Professional, USA
Mikroskop	Nikon, Japan
Mikroskopkamera, digital	Nikon, Japan
NIS Elements Image Software	Laboratory Imaging, CZ
Pipetten	Gilson, France
Reaktionsgefäße 1,5ml	Safe Lock, Eppendorf, Germany
Reaktionsgefäße 15ml/50ml	FALCON, Becton Dickinson, USA

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Immunhistochemische Fettgewebsfärbung

#### 2.2.1.1 Probengewinnung

Die Fettgewebeproben stammen von 19 Patienten, die auf Grund eines Kolontumors operiert wurden. Sie wurden in der Abteilung Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Ulm aus dem Omentum in einem tumorfernen Bereich entnommen. Ein positives Votum der Ethikkommission lag vor.

Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand des BMI, so dass sich 3 Gruppen ergaben. In Gruppe 1 befanden sich normalgewichtige Patienten mit BMI 21 bis 24,8. Gruppe 2 enthielt übergewichtige Patienten (Präadipositas) mit BMI 27 bis 29,7. Patienten mit Adipositas Grad I/II, mit BMI 30 bis 36,3, waren in Gruppe 3. Jede der 3 Gruppen beinhaltete Diabetiker und Nicht-Diabetiker (Tab. 2).

**Tab. 2: Gruppeneinteilung,** (BMI: Body Mass Index; Verschlüsselung der Patientendaten durch Ziffern und Buchstaben z.B. 3491 JHA1)

<b>Fettgewebsproben der Patienten</b>	<b>BMI</b>	<b>Diabetiker/Nicht-Diabetiker</b>
<b>Gruppe 1</b>		
3491 JHA1	21,0	Diabetiker
3361 UBU1	21,6	Diabetiker
2671 RHU1	23,3	Diabetiker
1731 RSP1	23,4	Diabetiker
2481 ELO1	24,5	Diabetiker
0381WSC1	24,5	Nicht-Diabetiker
1791 GLA1	24,8	Nicht-Diabetiker
<b>Gruppe 2</b>		
1701 GBO1	27,0	Diabetiker
0341 FRA1	27,2	Nicht-Diabetiker
0791 JST1	28,0	Diabetiker
3621 JSC1	28,6	Diabetiker
0951 HSC1	29,3	Diabetiker
0851 GKI1	29,7	Diabetiker

<b>Fett</b>	<b>BMI</b>	<b>Diabetiker/Nicht-Diabetiker</b>
<b>Gruppe 3</b>		
0331 ARI1	30,0	Nicht-Diabetiker
2551 MJA1	30,8	Diabetiker
2851 LSE1	31,4	Diabetiker
0631 SMA1	33,0	Nicht-Diabetiker
1781 DGR1	33,5	Diabetiker
1911 KVE1	36,3	Nicht-Diabetiker

### 2.2.1.2 Fixierung des Fettgewebes

Ein rasches und schonendes Gefrieren der Fettgewebsproben direkt nach der Gewinnung gewährleistete den bestmöglichen Strukturhalt. Es verhinderte unerwünschte Vorgänge wie die Autolyse oder eine Zellschwellung bzw. -schrumpfung durch vermehrten Wassereinstrom bzw. Austrocknung. Die gefrorene Probe wurde mit Gewebekleber (Tissue Freezing Medium) und CO<sub>2</sub> (Kohlendioxid) aufgeblickt und im Kryostat bei -32°C geschnitten. Nach Anschmelzen von jeweils zwei Gefrierschnitten an einen Objektträger, erfolgte die Fixierung im Acetonbad für 20 Minuten. Nun konnte der getrocknete Gefrierschnitt bei -20°C aufbewahrt oder direkt mit der eigentlichen immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

### 2.2.1.3 Avidin-Biotin-Färbemethode

Bei der direkten Weiterverarbeitung wurde der Gefrierschnitt kurz in Phosphate buffered saline (PBS) gespült. Nach dem Lufttrocknen erfolgte für 10 min. ein Einlegen in 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) gelöst in Methanol bei Raumtemperatur (RT). Nach erneutem Spülen in PBS wurde die überschüssige Pufferflüssigkeit vom Objektträger gewischt. Nun erfolgte das Blocken mit 1:10 in PBS verdünntem Serum (Tab. 3), indem pro Gewebeschnitt 50 µl aufgebracht wurde.

Das zum Blocken verwendete Serum richtete sich jeweils nach dem Tier, in dem der 1. Antikörper (AK) hergestellt wurde. Durch das Blocken wurden unspezifische Bindungsstellen im Gewebe abgesättigt, so dass der 1. AK spezifisch an sein jeweiliges Epitop binden konnte. Der Schnitt wurde jetzt für 30 min. bei 37°C inkubiert.

**Tab. 3: Marker und zugehörige Reagenzien** zur Immunhistochemischen Färbung von Fettgewebsschnitten. (Abkürzungen: CD: cluster of differentiation, HLA-DR: Human leukocyte antigen, PBS: Phosphate buffered saline, HRP: horse radish peroxidase)

	Blocken	1. Antikörper	2. Antikörper
<b>CD-68</b>	Goat – Serum 1:10 in PBS	Anti human CD-68, 1:100 in PBS	Biotinylated Goat anti mouse Immunglobulins 1:200 in PBS
<b>CD-4</b>	Peroxidase Block aus dem Färbekit: EnVision+ System-HRP	Anti human T-Cell CD-4, 1:10 in PBS	Labelled Polymer– HRP Anti-Mouse
<b>HLA-DR</b>	Goat – Serum 1:10 in PBS	HLA-DR antibody, 1:20 in PBS	Biotinylated Goat anti mouse Immunglobulins 1:200 in PBS
<b>CD-31</b>	Goat – Serum 1:10 in PBS	Anti human, CD- 31, 1:10 in PBS	Biotinylated Goat anti mouse Immunglobulins 1:200 in PBS

Vor Auftragen des 1. AK durfte der Objektträger nur vorsichtig abgeklopft und auf keinen Fall gespült werden, da sonst das Serum wieder ausgewaschen wurde.

Nun erfolgte die Inkubation mit dem 1. AK für 45min. bei 37°C im Brutschrank. Auf die jeweilige Negativkontrolle wurde das Serum, das bereits zum Blocken verwendet wurde, aufgetragen.

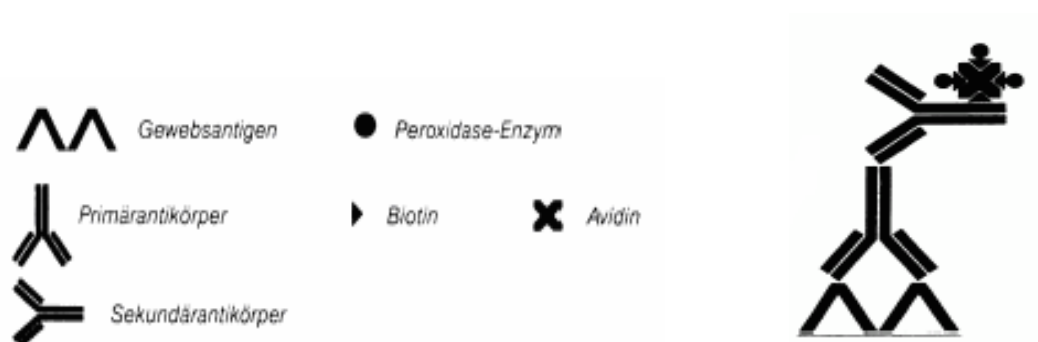
Der 1.AK ist direkt gegen das gesuchte Antigen gerichtet und wurde, je nach Herstellerangaben und Ansprechen im Gewebe, mit PBS verdünnt (Tab. 3). Es wurde jeweils 50 µl/Schnitt aufgetragen.

Nach der Inkubation mit dem 1.AK wurde der Objektträger in angewärmter PBS gespült. Der 2.AK, wieder 50 µl/Schnitt, wurde aufgetragen und für 30 min. bei 37°C inkubiert.

Der 2.AK ist gegen den 1.AK gerichtet und wurde ebenfalls, je nach Herstellerangaben und Ansprechen im Gewebe, mit PBS verdünnt (Tab. 3). Zusätzlich ist der 2.AK biotinyliert, das bedeutet, dass Biotin kovalent an den AK gebunden ist. Das Biotin ist nötig um später die Bindung mit Avidin einzugehen.

Nach den 30 min. Inkubation wurde der Objektträger erneut in angewärmter PBS gespült und überschüssige Flüssigkeit abgewischt.

Im nächsten Schritt wurde je 50 µl Avidin-Biotin (AB) -Komplex auf jeden Schnitt aufgetragen. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, musste der AB-Komplex bereits 30 min. vor dem Aufbringen im Verhältnis 1:100 in PBS gemischt werden. Die anschließende Inkubation erfolgte über 30 min. bei 37°C. Bei der Avidin-Biotin-Methode bindet das Avidin des enzymmarkierten AB-Komplexes an das Biotin, welches an den 2.AK gebunden ist (Abb.1).



**Abb. 1: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode** (nach einer Produktbeschreibung der Firma DAKO Diagnostika GmbH Hamburg, Deutschland). Die Avidin-Biotin-Färbemethode (AB-Färbemethode) nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Komplexbildung aus dem biotinylierten Sekundärantikörper (2.AK) und AB-Komplexen, die mit einem Enzym markiert sind. Vereinfacht gesagt, bindet das Avidin des enzymmarkierten AB-Komplexes an das Biotin, welches an den 2.AK gebunden ist.

Vor Zugabe der chromogenen Substanz musste der Objektträger erneut mit PBS gespült und von überschüssiger Flüssigkeit befreit werden. Nun wurde jeweils 100 µl 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)–Lösung mit Peroxidase (AEC Peroxidase Substrate Kit) auf jeden Schnitt aufgetragen. Die Einwirkzeit variierte je nach Herstellerangaben und Ansprechen im Fettgewebe zwischen 3 bis 6 Minuten.

Das für die Fettgewebsfärbung verwendete Enzym war die Meerrettichperoxidase (HRP, horse radish peroxidase), die aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen wird [4].

Durch die Peroxidase-Aktivität bildete sich unter Zugabe eines Elektronendonors ein Enzym-Substratkomplex, danach wurde der Elektronendonator oxidiert.

Der Elektronendonator war die AEC –Lösung. AEC bildete unter Oxidation ein rotes Farbprodukt und wird deswegen auch als ein Chromogen bezeichnet [4].

#### **2.2.1.4 CD-4 Färbung mit dem Färbekit: EnVision+ System-HRP**

Für die Färbung von CD-4 positiven T-Lymphozyten wurde das Färbekit EnVision+ System-HRP verwendet. Der strukturelle Ablauf sowie die einzelnen Wasch- und Färbeschritte entsprachen der Avidin-Biotin Methode. Es gab lediglich Unterschiede bei den zugegebenen Reagenzien sowie bei den Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen. Das Blocken erfolgte mittels Peroxidase Block (Tab. 3) für 6 min. bei RT. Nach den jeweiligen Waschschritten wurde der 1.AK 30 min. bei RT inkubiert. Anstelle des 2.AK wurde ein peroxidasemarkiertes Polymer (Tab. 3) aufgetragen und für 30 min. bei RT inkubiert. Nach dem oben beschriebenen Waschschrift wurde das Substratchromogen aus dem Färbekit zugegeben, das der unter 2.2.1.3 genannten AEC-Lösung entspricht. Die Einwirkzeit variierte je nach Ansprechen im Fettgewebe zwischen 3-6 min.

### **2.1.5 Kernfärbung**

Vor der Kernfärbung wurde der Objektträger nochmals in PBS und in Leitungswasser gespült. Dann erfolgte das Einlegen in Hämalaun.

Hämalaun ist ein häufig verwendeter Farbstoff auf wässriger Basis, der standardmäßig zur Kernfärbung eingesetzt wird. Eine Standardfärbung ist unabdingbar um die wichtigsten Gewebestrukturen hervorzuheben und sie so voneinander differenzieren zu können.

Die unterschiedliche Färbung einzelner Gewebebestandteile beruht auf einer unterschiedlichen Affinität des Farbstoffs zu den einzelnen Bestandteilen des Gewebes. Der basische Farbstoff Hämalaun ist ein kationischer Farbstoff, der an anionische Bestandteile wie z.B. DNA und RNA bindet und diese leuchtend blau anfärbt [36].

Nach einer Anfärbdauer, die aufgrund unterschiedlicher Fettgewebsschnitte zwischen 5 – 20 Sekunden variierte, wurde der Objektträger in einem Leitungswasserbad, bei fließendem Wasser, für 10 min. gespült.

### **2.2.1.6 Einbetten**

Zum Einbetten wurde Kaisers Glyceringelatine in der Mikrowelle bei 90°C kurz erhitzt. Auf jeden Objektträger wurden 60 µl aufgetragen. Danach erfolgte das Aufsetzen der Deckplatte auf den Objektträger. Größere Luftblasen konnten mit einer Pinzette, die mit leichtem Druck aufgesetzt wurde, zum Rand hin ausgestrichen werden. Nach ca. 10 min. war die Gelatine ausgehärtet. Die Objektträger wurden dunkel gelagert, da es unter Lichteinwirkung zu einem Ausbleichen des Reaktionsproduktes kommt.

### **2.2.1.7 Kontrollen**

Die ständige Kontrolle der verwendeten Reagenzien und der Arbeitsschritte war zur Bestätigung der immunhistochemischen Ergebnisse unabdingbar. Für die Fettgewebefärbung wurden auf jedem Objektträger zwei Gewebeschnitte fixiert. Das Auftragen des 1.AKs ist bei den genannten Färbemethoden der entscheidende Schritt. Um diesen Vorgang genau zu kontrollieren, wurde nur auf den 1.Schnitt des Objektträgers der 1.AK aufgebracht. Der 2.Schnitt wurde als sogenannte Negativkontrolle verwendet. Hier wurde kein AK zugegeben, sondern das Serum, das schon zum Blocken verwendet wurde (Tab. 3).

Wenn sich beim Mikroskopieren in der Negativkontrolle positiv gefärbte Strukturen zeigten, also rot gefärbte Strukturen, wurde das jeweilige Gewebestück nicht ausgewertet. Da sich hier das Gewebe auch ohne Zugabe des 1.AKs rot gefärbt hatte, konnte nicht spezifisch auf das zu detektierende Antigen geschlossen werden.

## **2.3 Auswertung**

Zum Auswerten der fertig gefärbten Fettgewebsschnitte wurden diese mikroskopiert. Rot gefärbte Strukturen zeigten eine positive Gewebereaktion an. Die Gewebeschnitte wurden mit einer digitalen Mikroskopkamera in 10-facher Vergrößerung abfotografiert. Durch den Vergrößerungsfaktor ergaben sich je nach Größe der Fettgewebssprobe pro Schnitt 20 bis 60 Einzelfotos.

Um objektive Ergebnisse zu erhalten, wurden die einzelnen Bilder am Computer mit dem speziellen Auswertungsprogramm Image - Pro Plus ausgewertet. Hier wurden manuell die zu detektierende rote Farbe in jedem Foto und der auszuwertende Bildabschnitt festgelegt. Image - Pro Plus berechnete den prozentualen Anteil der positiven Strukturen des ausgewählten Bildabschnitts.

Die Einzelwerte wurden für jeden Gewebsschnitt addiert und daraus der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde der gruppeninterne Mittelwert errechnet um die Gruppen miteinander vergleichen zu können.



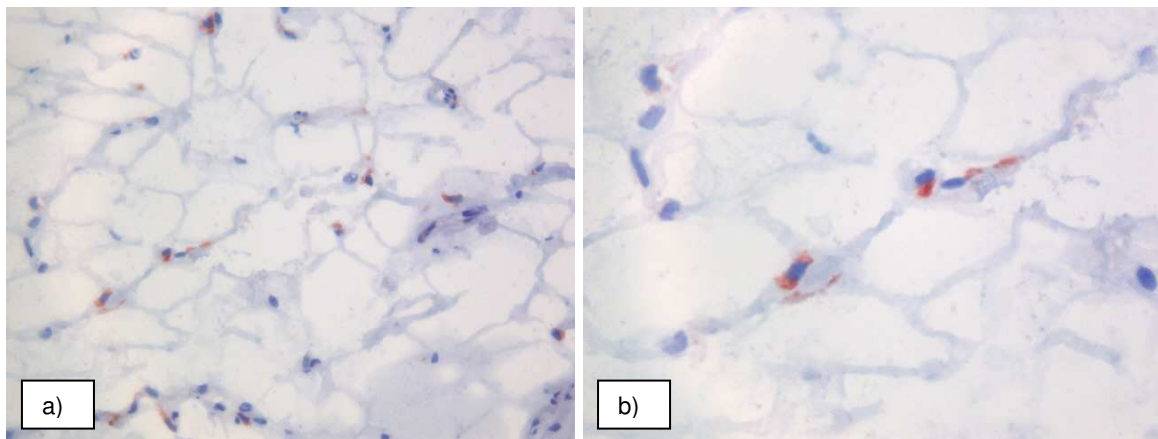
## 2.4 Statistik

Alle Ergebnisse dieser experimentellen Studie wurden mit dem Programm Graph Prism Plus bearbeitet. Der Zusammenhang zwischen den jeweiligen Merkmalen wurde über den Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Die graphisch-deskriptive Beschreibung der Daten erfolgte durch bivariate Punktwolken. Ein p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)  $< 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

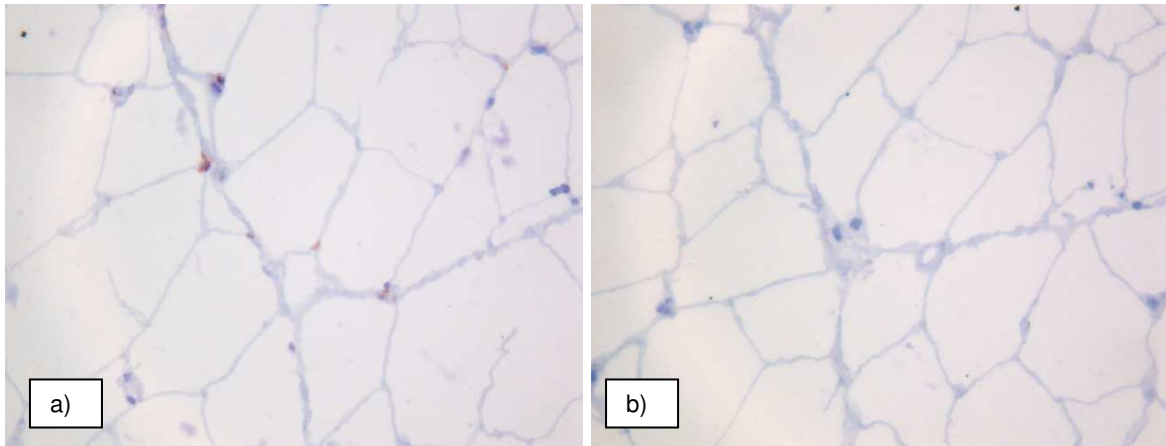
#### 3.1 Gemeinsame Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker

Die Gesamtheit der Fettgewebeproben stammt von 19 Patienten, die auf Grund eines Kolontumors operiert wurden. Diese wurden aus dem Omentum in einem tumorfernen Bereich gewonnen. Die Gruppeneinteilung orientierte sich am BMI, so dass sich insgesamt 3 Gruppen ergaben. Gruppe 1 enthielt normalgewichtige Patienten mit BMI 18,5 bis 24,9. In Gruppe 2 befanden sich übergewichtige Patienten mit BMI 25 bis 29,9. Patienten mit Adipositas Grad I/II (BMI 30 bis 39,9) waren in Gruppe 3. Alle 3 Untergruppen beinhalteten Diabetiker und Nicht-Diabetiker. Zunächst wurde das Vorkommen inflammatorischer Zellen im viszeralen Fettgewebe mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Wie bereits in vielen Studien beschrieben, konnten Makrophagen mit Hilfe des Makrophagenmarkers CD-68 nachgewiesen werden (Abb. 2).



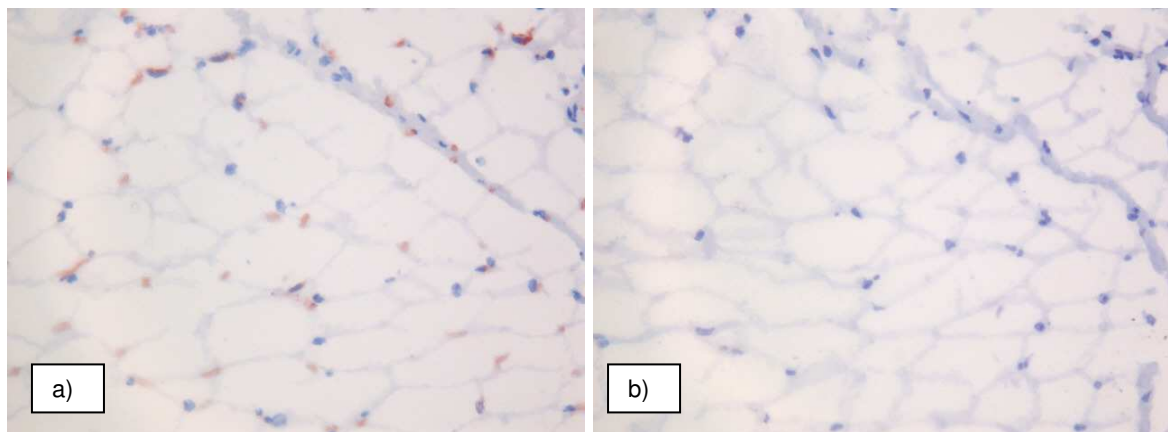
**Abb. 2:** a) Fettgewebsschnitt in 20-facher Vergrößerung mit Färbung der CD-68 (CD: cluster of differentiation) positiven Zellen eines Patienten aus der Gruppe der Diabetiker. b) Ausschnitt des gleichen Schnittes wie in a) in 40-facher Vergrößerung. Die rot gefärbten Strukturen entsprechen den CD-68 positiven Makrophagen. Die Zellkerne stellen sich in der Hämalaun-Färbung blau dar.

Zur Abklärung, ob eine weitere inflammatorische Zellart neben den Makrophagen im viszeralen Fettgewebe der Probanden nachweisbar ist, wurden auch CD-4 positiven T-Lymphozyten immunhistochemisch angefärbt (Abb.3).



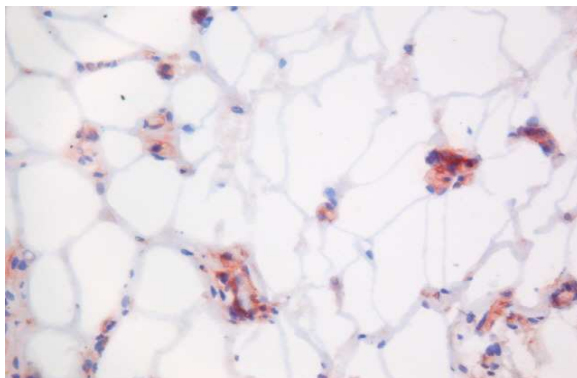
**Abb. 3:** a) Exemplarischer Fettgewebsschnitt eines Patienten aus der Gruppe der Diabetiker in 20-facher Vergrößerung. Die rot gefärbten Strukturen sind das positive Färbeergebnis, im vorliegenden Fall CD-4 (CD: cluster of differentiation) positive Zellen. b) Kontrollfärbung des gleichen Schnittes ohne Zugabe des 1. Antikörpers. Hier ist keine CD-4 Positivität zu erkennen. Somit wird deutlich, dass das positive Färbeergebnis in a) spezifisch CD-4 positive T-Lymphozyten detektiert.

Um nun die physiologische Relevanz der T-Lymphozyten neben den Makrophagen zu beleuchten, wurden die Fettgewebssproben immunhistochemisch auf HLA-DR positive Zellen hin untersucht. HLA-DR ist ein Oberflächenmarker, der die Aktivierung durch das  $T_{H1}$ -Zytokin  $IFN-\gamma$  anzeigt. Auch HLA-DR konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abb.4).



**Abb. 4:** a) Exemplarischer Fettgewebsschnitt eines Patienten aus der Diabetiker-Gruppe in 20-facher Vergrößerung. Im Bindegewebe der Adipozyten zeichnet sich das positive Färbeergebnis der HLA-DR (HLA: human leucocyte antigen) positiven Zellen deutlich ab. b) Im gleichen Schnitt stellt sich in der Negativkontrolle keine unspezifische Färbung dar. Das positive Färbeergebnis in a) entspricht folglich HLA-DR positiven Zellen.

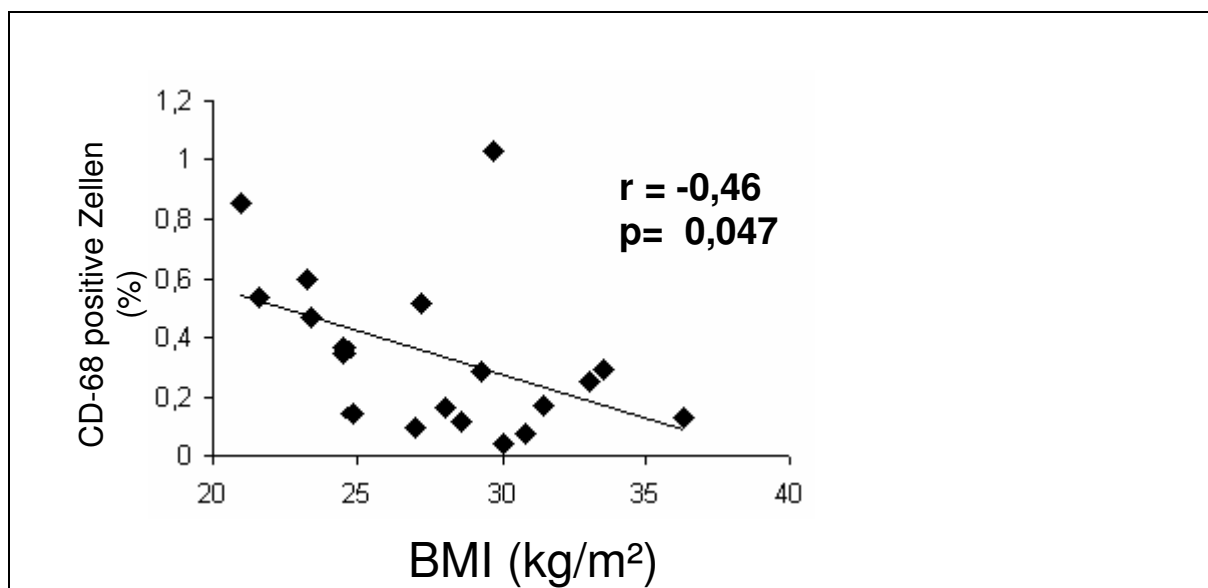
Neben den inflammatorischen Oberflächenmarkern wurde auch CD-31, als Marker für Endothel, immunhistochemisch angefärbt. Hierbei sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Vaskularisation im humanen viszeralen Fettgewebe und dem dortigen Vorkommen inflammatorischer Zellen untersucht werden. Auch bei diesem Marker ließ sich ein positives Färbeergebnis verzeichnen (Abb. 5).



**Abb. 5:** Exemplarischer Fettgewebsschnitt eines Patienten aus der Diabetiker-Gruppe mit CD-31 (CD: cluster of differentiation) positiven Zellen in 20-facher Vergrößerung. Die rot gefärbten Strukturen entsprechen den CD-31 positiven Endothelzellen. Die Fettzellen erscheinen leer, da die Lipide aus den Vakuolen herausgelöst sind. Die Kerne sind durch Hämalaun blau angefärbt und liegen mit dem restlichen Zytoplasma als schmaler Saum der Vakuole an.

Betrachtet man in einem nächsten Schritt den Zusammenhang zwischen Adipositas in Form des BMI und den unterschiedlichen inflammatorischen Zellen, so zeigt sich in Abb. 6 für CD-68 als Marker für die Makrophagen, eine signifikante, negative Korrelation zwischen dem Vorkommen CD-68 positiver Zellen und dem BMI

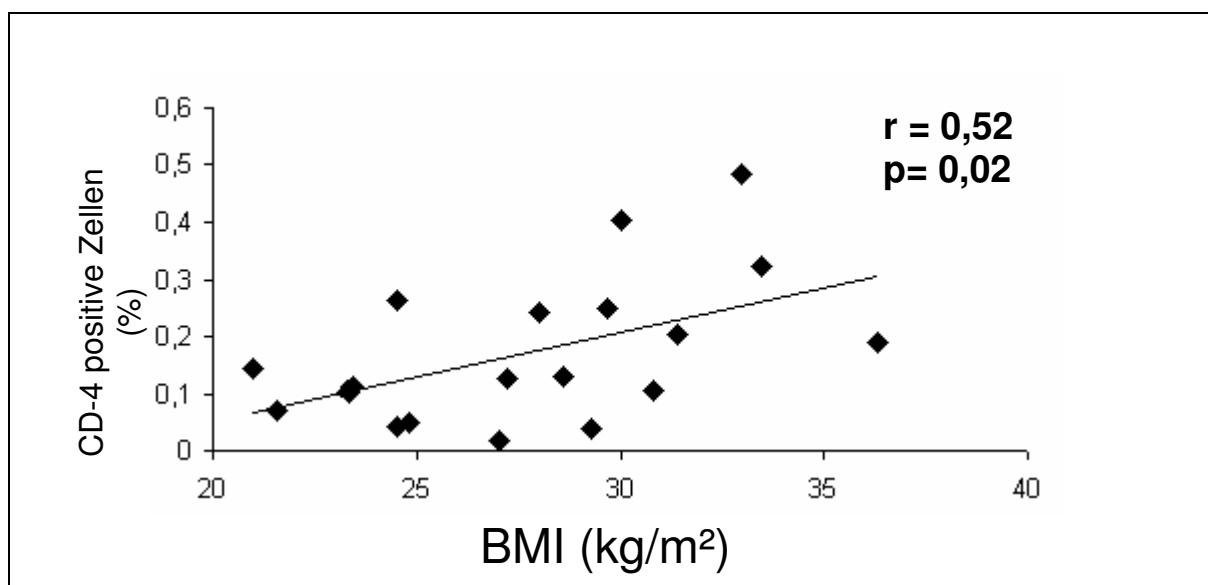
( $r = -0,46$ ;  $p = 0,047$ ).



**Abb. 6: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-68 in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker** Der Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r = -0,46$  gibt einen mittelgradigen gegensinnigen Zusammenhang an. Die Verteilung der Punktwolke entlang der sinkenden Korrelationsgeraden entspricht den 19 Patienten in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker und spricht für eine prozentual abnehmende Anzahl CD-68 positiver Zellen bei steigendem BMI. ( $r = -0,46$ ;  $p = 0,047$ ;  $n = 19$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

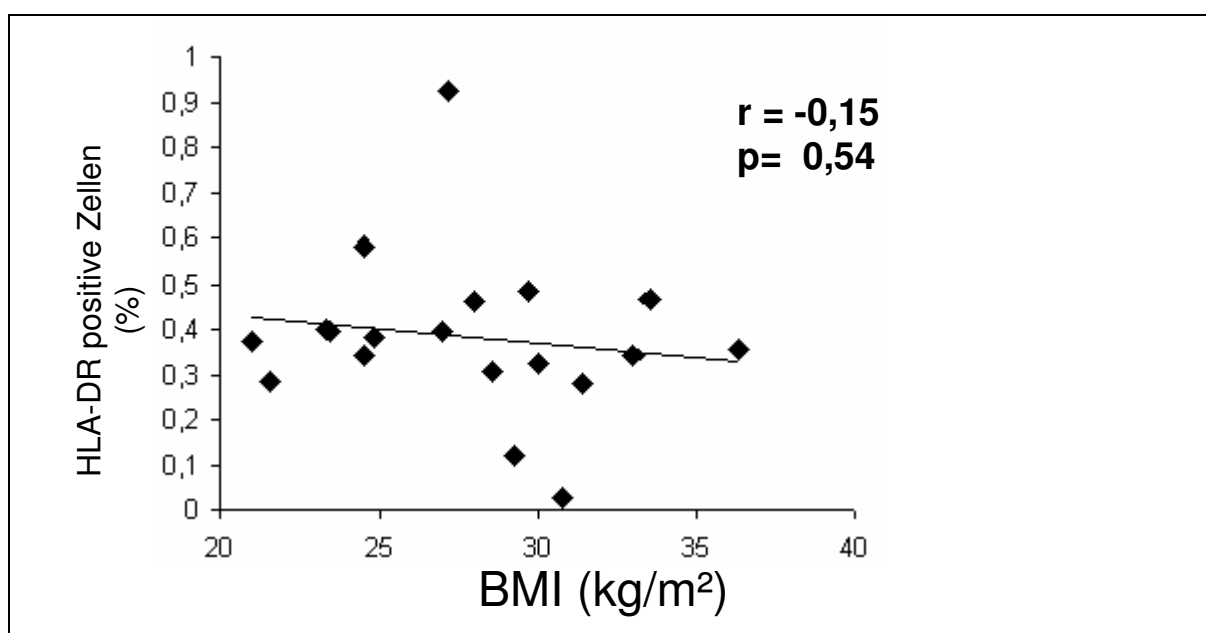
Neben den Makrophagen wurde auch durch die Auszählung der CD-4 positiven Zellen im viszeralen Fettgewebe der Zusammenhang zwischen den Lymphozyten und dem BMI untersucht (Abb.7). Für CD-4, dem Erkennungsmolekül der T-Helferzellen, ergab sich in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker bei der Auswertung eine signifikante, positive Korrelation zwischen CD-4 und dem BMI ( $r=0,52$ ;  $p=0,02$ ). Je höher der BMI des Patienten war, desto mehr CD-4 positive Zellen konnten im viszeralen Fettgewebe nachgewiesen werden.



**Abb. 7 : Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-4 in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-4 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der steigenden Korrelationsgeraden entspricht den 19 Patienten in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker. Der Pearson Korrelationskoeffizient  $r = 0,52$  gibt einen mittelgradigen gleichsinnigen Zusammenhang an. Dies bedeutet, dass in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker mit steigendem BMI, auch die Anzahl der CD-4 positiven Zellen im Fettgewebe ansteigt. ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,02$ ;  $n = 19$ ) (Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

Um die funktionelle Relevanz der CD-4 positiven T-Lymphozyten zu untersuchen, wurde der Oberflächenmarker HLA-DR angefärbt. Wenn er durch Zellen exprimiert wird, ist dies ein Ausdruck einer Aktivierung dieser Zellen durch das von CD4-positiven Lymphozyten freigesetzte IFN- $\gamma$ .

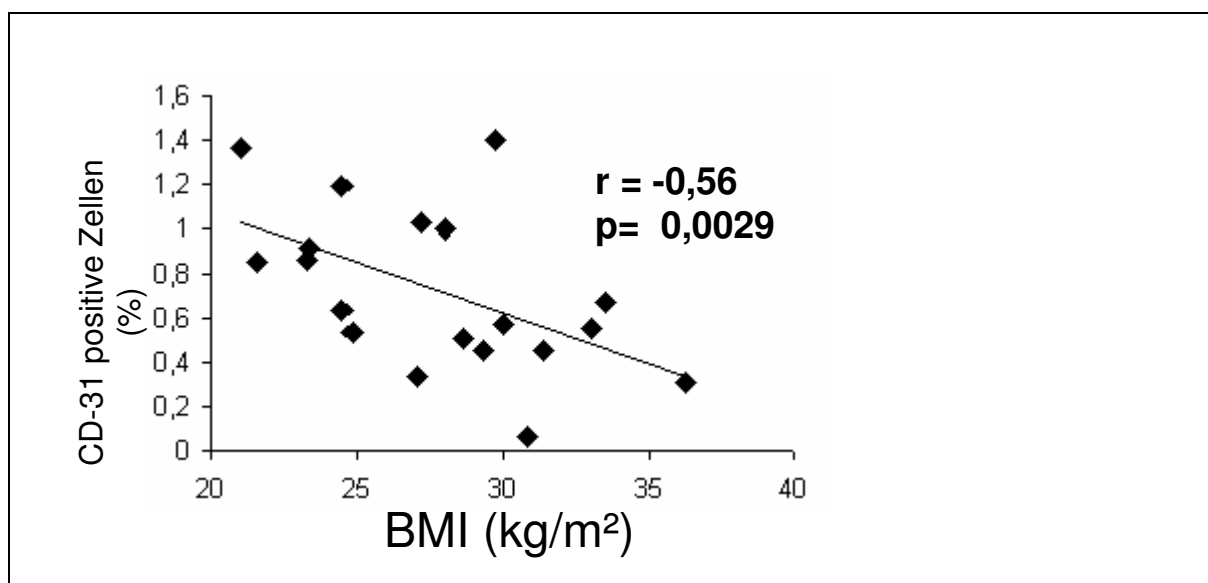
Die Auswertung der mit HLA-DR gefärbten Fettgewebsschnitte ergab in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker eine nicht-signifikante negative Korrelation von HLA-DR und dem BMI ( $r = -0,15$ ;  $p = 0,54$ ).



**Abb. 8 : Zusammenhang zwischen dem BMI und HLA-DR in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der HLA-DR positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der Korrelationsgeraden entspricht den 19 Patienten in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker ( $r = -0,15$ ;  $p = 0,54$ ;  $n = 19$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, HLA-DR: Human leukocyte antigen, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Fettgewebsvaskularisation und dem Vorkommen inflammatorischer Zellen im viszeralen Fettgewebe gibt, wurde der Endothelzellmarker CD-31 untersucht. Wie in Abb.7 dargestellt, zeigte sich eine signifikante, negative Korrelation der CD-31 positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,56$ ;  $p = 0,0029$ ). Dies bedeutet, je größer der BMI, desto weniger CD-31 positive Zellen waren im viszeralen Fettgewebe nachweisbar.



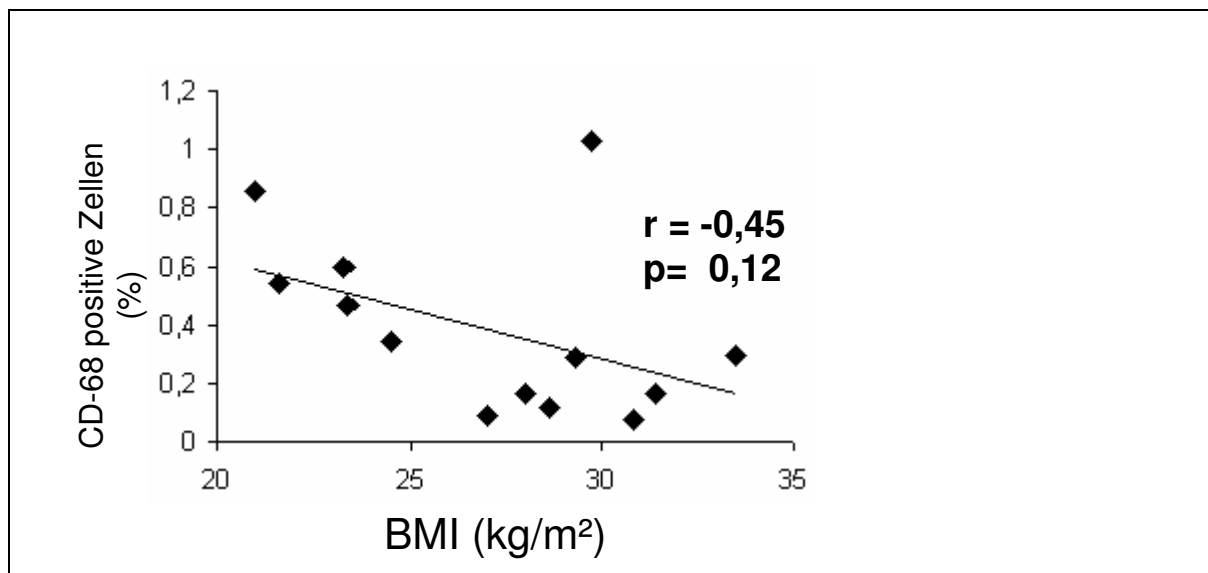
**Abb. 9: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-31 in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-31 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der sinkenden Korrelationsgeraden entspricht den 19 Patienten in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker. Der Pearson Korrelationskoeffizient  $r = -0,56$  gibt einen mittelgradigen gegensinnigen Zusammenhang an. Somit sinkt in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker mit steigendem BMI der prozentuale Anteil der CD-31 positiven Zellen im Fettgewebe. ( $r = -0,56$ ;  $p = 0,0029$ ;  $n = 19$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)



## 2. Diabetiker

Betrachtete man aus dem beschriebenen Kollektiv nur die Diabetiker, so zeigte sich für die Makrophagen eine nicht-signifikante, negative Korrelation von CD-68 positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,45$ ;  $p = 0,12$ ). Der negative Korrelationskoeffizient deutet einen mittelgradigen gegensinnigen Zusammenhang an, so dass bei hohen BMI-Werten nur geringe Mengen an CD-68 nachweisbar wären.

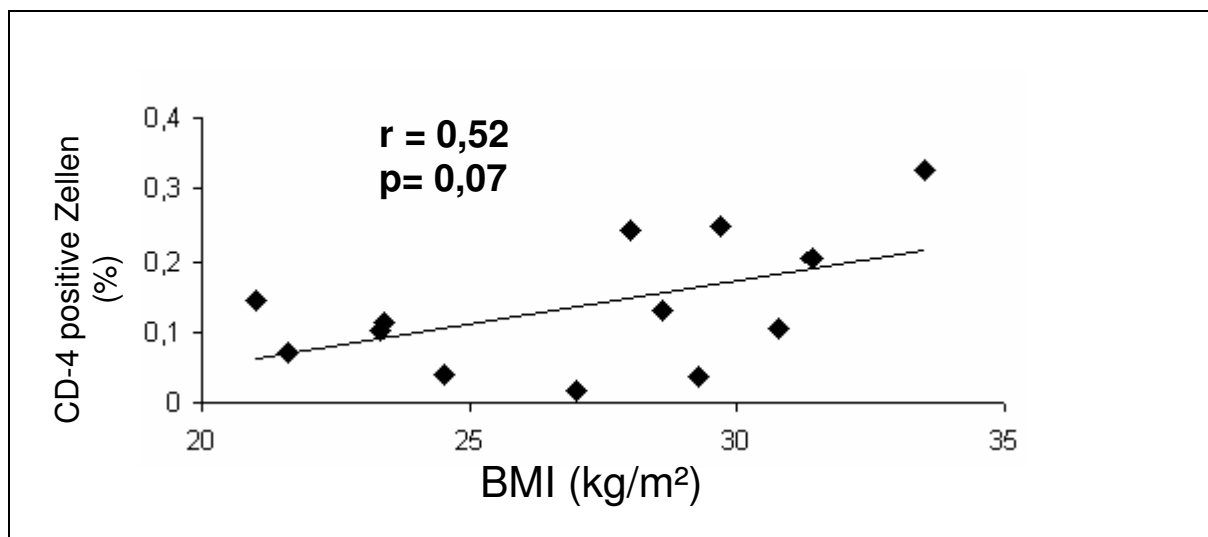


**Abb. 10: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-68 in der Gruppe der Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-68 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der sinkenden Korrelationsgeraden entspricht den 13 Patienten in der Gruppe der Diabetiker. ( $r = -0,45$ ;  $p = 0,12$ ;  $n = 13$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

Für CD-4 positive Zellen zeigte sich in der Diabetiker-Gruppe eine nicht-signifikante, positive Korrelation ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,07$ ). Der positive r-Wert würde zunächst für einen mittelgradigen statistischen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Anzahl der CD-4 positiven Zellen sprechen, ist wegen des p-Wertes jedoch nicht signifikant (Abb.11).

Somit ergab die Studie für die Diabetiker-Gruppe keinen signifikanten Zusammenhang zwischen steigendem BMI und der Anzahl CD-4 positiver Zellen im Fettgewebe.

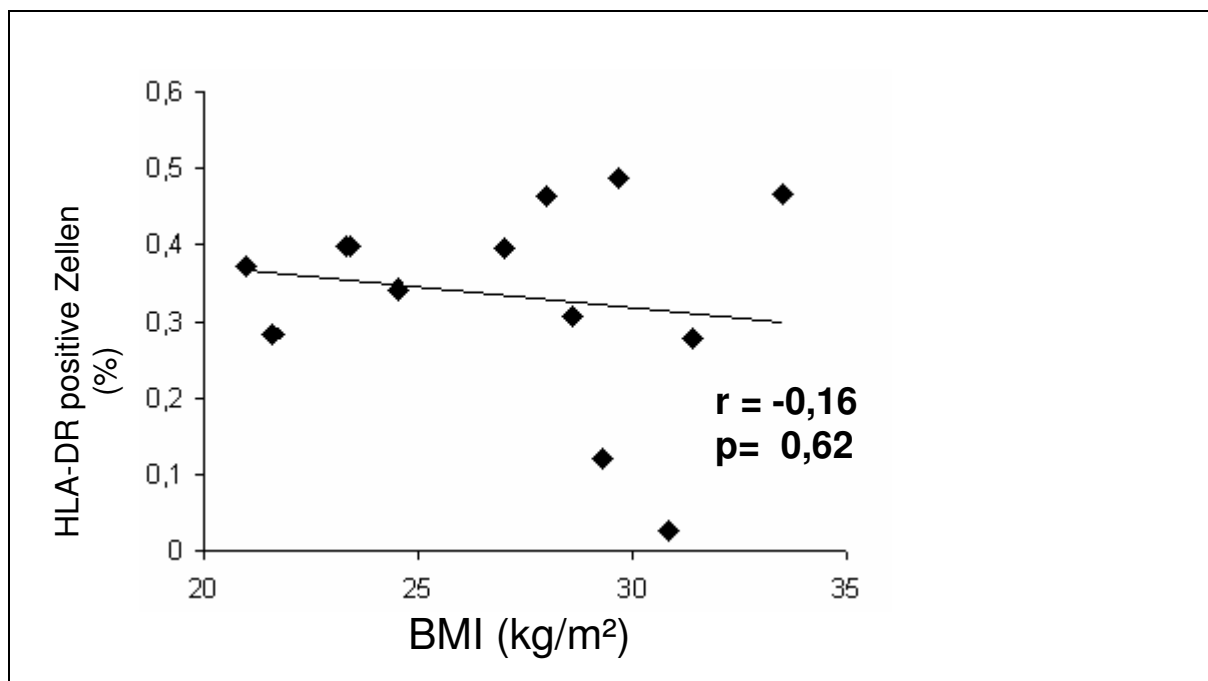


**Abb. 11: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-4 in der Gruppe der Diabetiker**

Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-4 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der Korrelationsgeraden entspricht den 13 Patienten in der Gruppe der Diabetiker. Die Anzahl der CD-4 positiven Zellen korreliert nicht signifikant mit dem BMI. ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,07$ ;  $n = 13$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

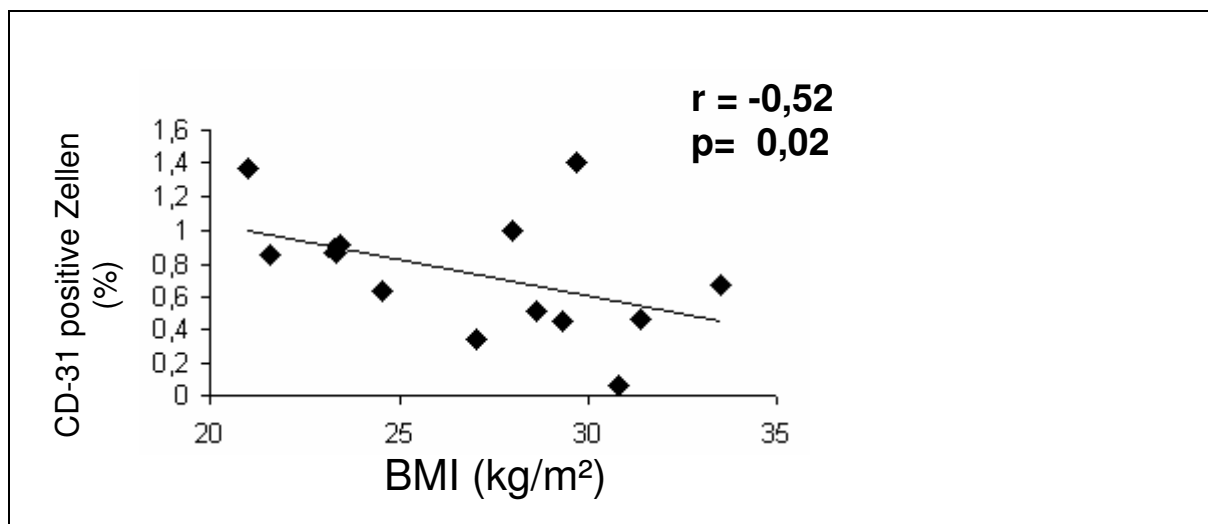
Für HLA-DR, als Ausdruck der Aktivierung durch IFN- $\gamma$ , ergab sich in der Untergruppe der Diabetiker, wie schon in der gemeinsamen Gruppe von Diabetikern und Nicht-Diabetikern, eine nicht-signifikante, negative Korrelation mit dem BMI ( $r = -0,16$ ;  $p = 0,62$ ). Der geringe  $r$ -Wert und die flache Korrelationsgerade im Diagramm (Abb.12) würden für einen geringgradigen gegensinnigen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Anzahl HLA-DR positiver Zellen sprechen. Der  $p$ -Wert zeigt jedoch, dass die Korrelation nicht als signifikant zu bewerten ist.



**Abb. 12: Zusammenhang zwischen dem BMI und HLA-DR in der Gruppe der Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der HLA-DR positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der Korrelationsgeraden entspricht den 13 Patienten in der Gruppe der Diabetiker. ( $r = -0,16$ ;  $p = 0,62$ ;  $n = 13$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, HLA-DR: Human leukocyte antigen,  $r$ : Korrelationskoeffizient nach Pearson,  $p$ : Irrtumswahrscheinlichkeit,  $n$ : Anzahl der Patienten)

Auch in der Diabetikergruppe zeigte sich, wie in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker, für die Vaskularisation des Fettgewebes eine signifikante, negative Korrelation von CD-31 positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,52$ ;  $p = 0,02$ ) (Abb.13).



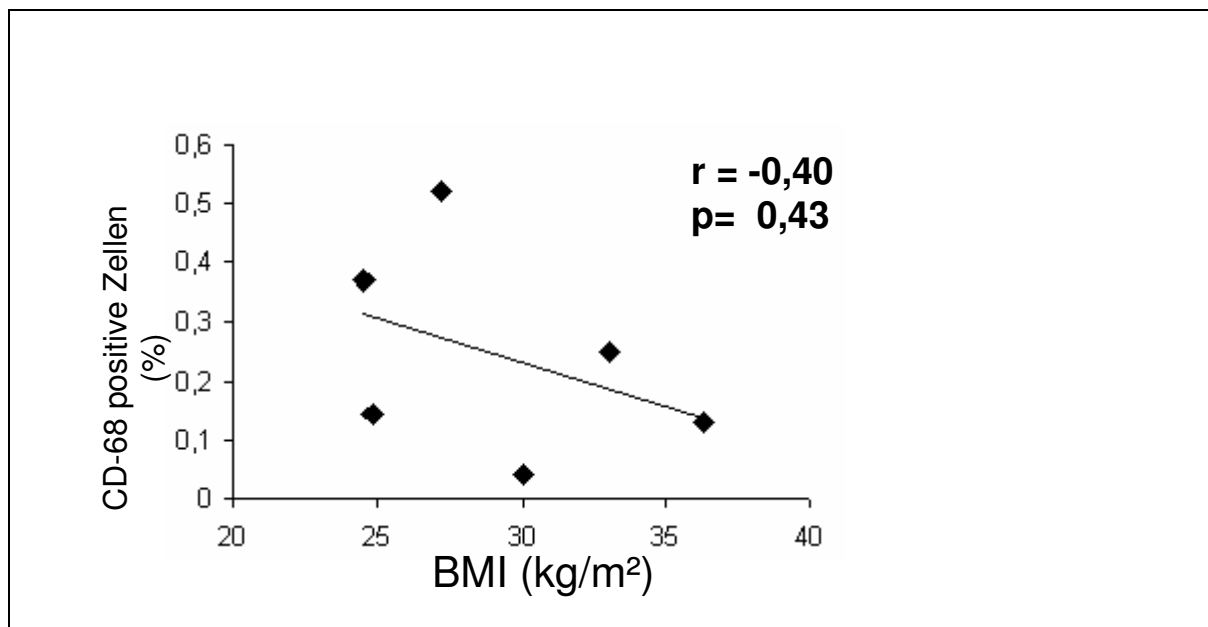
**Abb. 13: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-31 in der Gruppe der Diabetiker** Der Korrelationskoeffizient nach Pearson von  $r = -0,52$  zeigt einen mittelgradigen gegensinnigen Zusammenhang an. Die Verteilung der Punktwolke entlang der sinkenden Korrelationsgeraden entspricht den 13 Patienten in der Gruppe der Diabetiker und zeigt eine prozentual abnehmende Anzahl CD-31 positiver Zellen bei steigendem BMI. ( $r = -0,16$ ;  $p = 0,62$ ;  $n = 13$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

### 3. Nicht-Diabetiker

Die nächste Untergruppe neben den Diabetikern ist die Gruppe der Nicht-Diabetiker. Sie enthält insgesamt 6 Patienten aus dem Gesamtkollektiv der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker.

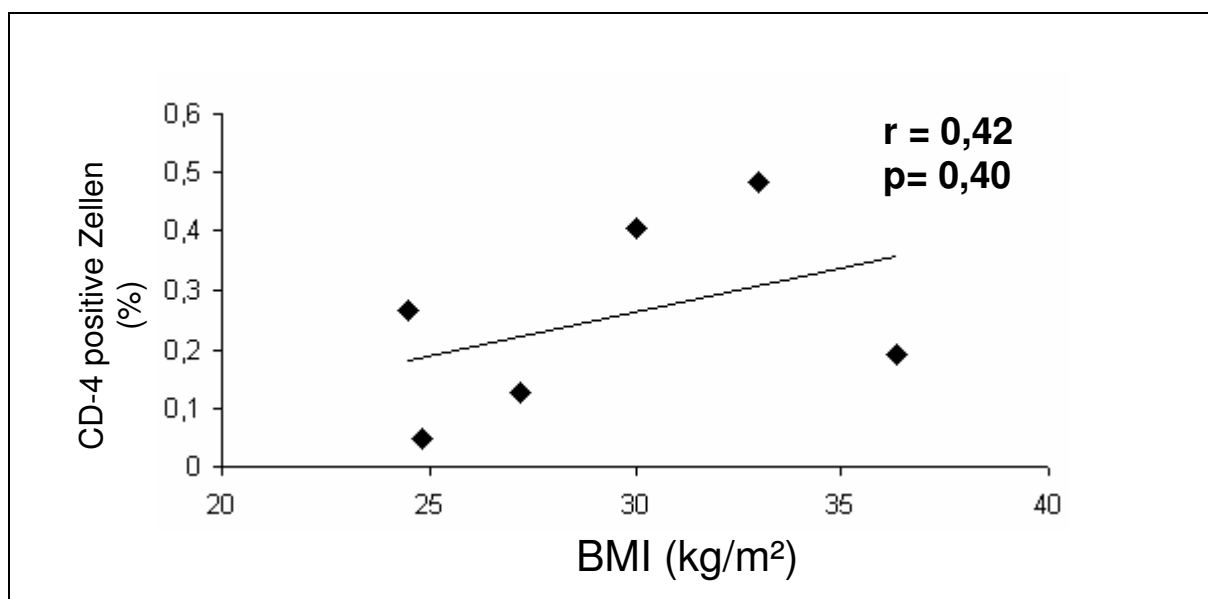
Das Ergebnis für die Makrophagen war eine nicht-signifikante, negative Korrelation von CD-68 positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,40$ ;  $p = 0,43$ ) (Abb.14). Der negative Korrelationskoeffizient deutet einen gegensinnigen Zusammenhang an, so dass bei steigenden BMI-Werten nur geringe Mengen CD-68 nachweisbar wären.



**Abb. 14: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-31 in der Gruppe der Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-68 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der Korrelationsgeraden entspricht den 6 Patienten in der Gruppe der Nicht-Diabetiker. ( $r = -0,40$ ;  $p = 0,43$ ;  $n = 6$ )

(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

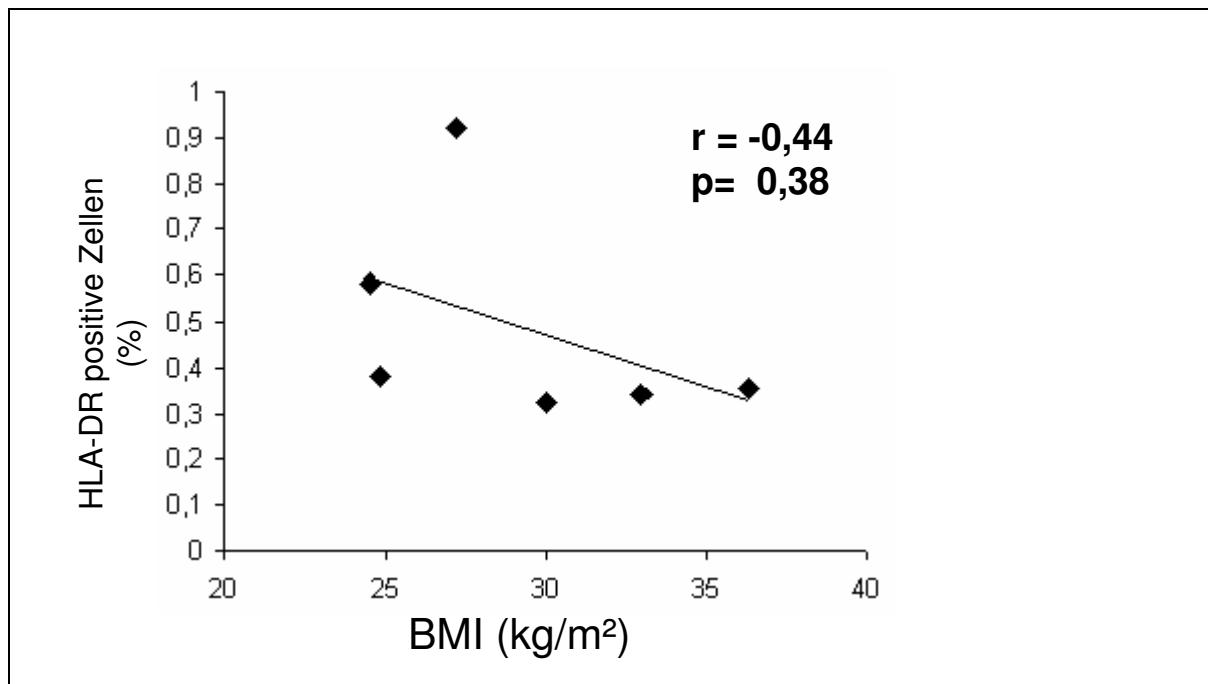
Für die CD-4 positiven T-Lymphozyten ergab sich bei Nicht-Diabetikern eine nicht-signifikante, positive Korrelation ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,40$ ) zwischen CD-4 positiven Zellen und dem BMI (Abb.15). Die Tendenz in der Gruppe der Nicht-Diabetiker ist also ähnlich wie in der Untergruppe der Diabetiker und in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker, lässt aber keinen signifikanten Zusammenhang zwischen steigendem BMI und der Anzahl CD-4 positiver Zellen im Fettgewebe erkennen.



**Abb. 15: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-4 in der Gruppe der Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-4 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der ansteigenden Korrelationsgeraden entspricht den 6 Patienten in der Gruppe der Nicht-Diabetiker. ( $r = 0,42$ ;  $p = 0,40$ ;  $n = 6$ )

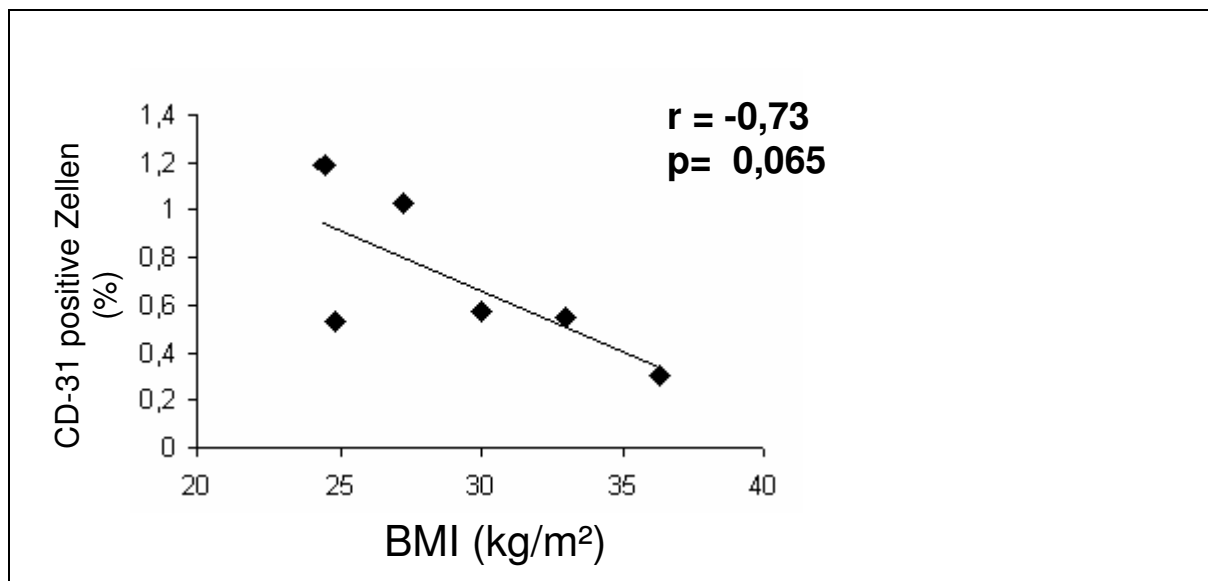
(Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

Für HLA-DR, als Marker für Zellen die durch IFN- $\gamma$  aktiviert wurden, zeigte sich in der Nicht-Diabetiker Gruppe eine nicht-signifikante, negative Korrelation von HLA-DR positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,38$ ) (Abb.16). Dieser Wert deutet einen mittelgradigen gegensinnigen Zusammenhang zwischen dem BMI und der Anzahl der HLA-DR positiven Zellen an.



**Abb. 16: Zusammenhang zwischen dem BMI und HLA-DR in der Gruppe der Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der HLA-DR positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der fallenden Korrelationsgeraden entspricht den 6 Patienten in der Gruppe der Nicht-Diabetiker und zeigt eine nicht-signifikante, negative Korrelation von HLA-DR positiven Zellen mit dem BMI. ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,38$ ;  $n = 6$ ) (Abkürzungen: BMI: body mass index, HLA-DR: Human leukocyte antigen, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)

Auch in der Nicht-Diabetikergruppe wurde mit der Auswertung des Endothelzellmarkers CD-31 untersucht, inwiefern die Vaskularisation des Fettgewebes für die Inflammation von Bedeutung ist. Wie in Abb.17 dargestellt, zeigte sich eine nicht-signifikante, negative Korrelation der CD-31 positiven Zellen mit dem BMI ( $r = -0,73$ ;  $p = 0,0650$ ).



**Abb. 17: Zusammenhang zwischen dem BMI und CD-31 in der Gruppe der Nicht-Diabetiker** Das Diagramm zeigt auf der x-Achse in aufsteigender Größe den BMI in  $\text{kg/m}^2$  und auf der y-Achse die Anzahl der CD-31 positiven Zellen im Fettgewebe in %. Die Verteilung der Punktwolke entlang der sinkenden Korrelationsgeraden entspricht den 6 Patienten in der Gruppe der Nicht-Diabetiker. Sie bildet eine nicht-signifikante, negative Korrelation der CD-31 positiven Zellen mit dem BMI ab. ( $r = -0,73$ ;  $p = 0,065$ ;  $n = 6$ ) (Abkürzungen: BMI: body mass index, CD: cluster of differentiation, r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, p: Irrtumswahrscheinlichkeit, n: Anzahl der Patienten)



## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt das Vorkommen CD-4 positiver T-Lymphozyten im humanen viszeralen Fettgewebe neben den bereits bekannten Makrophagen, sowie die Anwesenheit HLA-DR positiver Zellen. HLA-DR positive Zellen sind Zellen, die durch das T<sub>H1</sub>-Zytokin IFN- $\gamma$  aktiviert worden sind. Weiterhin ergab sich eine Korrelation zwischen Adipositas (BMI) und der Fettgewebsinflammation, repräsentiert durch einen gesteigerten Nachweis des inflammatorischen Oberflächenmarker CD-4 mit steigendem BMI.

Diese Daten legen nahe, dass CD-4 positive T-Lymphozyten während des inflammatorischen Prozesses, im Rahmen der Adipositas, eine wichtige Rolle spielen könnten.

### 4.1 Gemeinsame Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker

Seit das Fettgewebe als endokrines Organ entdeckt wurde, das bei Adipositas vermehrt proinflammatorische Zytokine ausschüttet, sind Adipokine als mögliche Verbindung zwischen Adipositas und Insulinresistenz zunehmend Thema wissenschaftlicher Arbeiten [21,30,47,51]. Adipositas führt über eine chronische Aktivierung des Immunsystems zu einer Inflammation des Fettgewebes. Murphy et al. zeigte, dass hier besonders das viszerale Fettgewebe bedeutend ist [41]. Neuere Studien, wie auch die vorliegende Arbeit, haben das Augenmerk vermehrt auf die Rolle der T-Lymphozyten und Makrophagen bei der Entstehung von Insulinresistenz gelegt. Während den T-Lymphozyten erst seit kurzem eine mögliche Rolle bei der Diabetesentstehung zugesprochen wird, sind die Makrophagen schon länger ein zentraler Forschungspunkt. So sehen die Studien der letzten Jahre [31,58,64,65] vor allem Makrophagen als die entscheidende Zellart bei der Entstehung einer chronischen Entzündung im Fettgewebe.

Bei Adipositas sind bei Nagern vermehrt Makrophagen im Fettgewebe nachweisbar [58,65]. Xu et al. fanden eine Hochregulation makrophagenspezifischer Gene und eine Anreicherung von CD-68, dem Marker für Makrophagen, in weißem Fettgewebe von adipösen Mäusen [65].

Die vorliegende Arbeit kann ebenso Makrophagen im humanen viszeralen Fettgewebe nachweisen. Dies fügt sich in die derzeit bestehende Datenlage ein, dass die Makrophagen entscheidend an der Entzündungsentstehung im Fettgewebe beteiligt sind. Weitere Studien fanden eine charakteristische Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe bei adipösen Patienten. Sowohl der BMI als auch die durchschnittliche Größe der Adipozyten sind signifikant für die Vorhersage der Makrophagenakkumulation im Fettgewebe [58]. Dieser enge Zusammenhang zwischen der Adipozytengröße und der Makrophagenmenge lässt einen Einfluss der Adipozytengröße auf die Funktion der Makrophagen vermuten. Er hat möglicherweise eine parakrine Basis, die auch die Makrophagen mit einschließt [58].

Kanda et al. fanden bei Knock-out Mäusen für MCP-1, dem Schlüsselmediator bei der Monozytenrekrutierung, eine Reduzierung der durch Hochfettdiät ausgelösten Makrophagenansammlung im Fettgewebe, sowie einen Rückgang der Insulinresistenz im Vergleich zum Wildtyp. Daraus schlossen sie, dass eine erhöhte MCP-1 Expression im Fettgewebe bei adipösen Mäusen zu einer verstärkten Makrophageninfiltration und Insulinresistenz führt [31]. Weitere Versuche von Weisberg et al. ergaben ähnliche Ergebnisse bei Nagern mit einem MCP-1-Rezeptorantagonisten [59], so dass sich auch hier die wichtige Rolle der Makrophagen bei der Entstehung einer Entzündung im Fettgewebe zeigt.

In der vorliegenden Arbeit werden im humanen viszeralen Fettgewebe der 19 Patienten CD-68 positive Zellen nachgewiesen. Dies bestätigt dort, ähnlich wie bei den genannten Studien, die Anwesenheit von Makrophagen. Jedoch zeigt sich wider Erwarten eine negative Korrelation der CD-68 positiven Zellen mit dem BMI.

Das Ergebnis deutet in die gegensätzliche Richtung der anderen erwähnten Studien. Dies ist, angesichts der geschlossen abweichenden Ergebnisse, ein ungewöhnlicher Befund. Er ist möglicherweise auf das gewählte Patientenkollektiv

oder die Tatsache, dass die Fettgewebsproben aus dem Omentum von Patienten mit Kolonkarzinom stammen, zurückzuführen. Trotz des widersprüchlichen Ergebnisses in diesem Punkt, zeigt die vorliegende Arbeit, dass sich Makrophagen im humanen viszeralen Fettgewebe befinden und dort möglicherweise eine Funktion bei der Fettgewebsinflammation innehaben.

Da seit kurzem, neben den Makrophagen, auch den T-Lymphozyten eine mögliche Rolle bei der Entstehung der Fettgewebsinflammation zugesprochen wird, hat die vorliegende Arbeit auch diesen Aspekt mit einbezogen. Wu et al. konnten bei Adipositas eine erhöhte Anzahl CD-3 positiver T-Lymphozyten und Makrophagen im Fettgewebe nachweisen [64]. CD-3 ist ein allgemeiner Marker für reife Lymphozyten. Daraus erschließt sich, dass diese Zellen bei der Entstehung adipositasassoziierter Krankheiten eine entscheidende Rolle spielen könnten.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Vorkommen von CD-4 positiven T-Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe von 19 Patienten (13 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, 6 Patienten ohne Diabetes). In allen 19 Fettgewebsschnitten sind CD-4 positive Zellen nachgewiesen. In den jeweiligen Negativkontrollen stellt sich keine unspezifische Färbung dar. Im Gegensatz zu Wu et al., die allgemein reife CD-3 positive T-Lymphozyten mittels quantitativer Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) untersuchten, werden hier in den jeweiligen Fettgewebsschnitten CD-4 positive T-Lymphozyten immunhistochemisch angefärbt. Die Ergebnisse deuten jedoch in die gleiche Richtung und zeigen ferner, dass es sich bei den T-Lymphozyten im humanen viszeralen Fettgewebe um CD-4 positive T-Lymphozyten handelt.

Bei der Arbeit von Kintscher et al. zeigte sich im Mausmodell, dass die Tiere nach 5 Wochen unter spezieller Hochfettdiät insulinresistent werden. Im viszeralen Fettgewebe der adipösen Tiere konnte zeitgleich eine Erhöhung der CD-3 positiven T-Lymphozyten festgestellt werden.

Im weiteren Verlauf der Studie konnte die Makrophageninfiltration erst nach 10 Wochen Hochfettdiät beobachtet werden. Diese Daten lassen eine zeitliche Sequenz bei der Entstehung einer Insulinresistenz vermuten und legen nahe, dass T-Lymphozyten eine Rolle bei diesem Vorgang spielen könnten [33].

Immunhistochemische Färbungen zeigen, dass sich besonders CD-4 positive T-Lymphozyten sowohl im Stroma der viszeralen Fettgewebszellen, als auch in den Gefäßen zwischen den Adipozyten befinden [33].

Die vorliegende Arbeit bestätigt also die Anwesenheit von T-Lymphozyten als zelluläre Komponente in viszeralem Fettgewebe. Um weiter zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der T-Lymphozyten im Fettgewebe und zunehmender Adipositas gibt, wurde in dieser Arbeit zusätzlich der BMI gemessen. Durch dieses Vorgehen kann festgestellt werden, ob eine Veränderung der T-Lymphozytenzahl bei steigendem Körpergewicht auftritt. Es zeigt sich eine signifikante positive Korrelation der CD-4 positiven Zellen mit dem BMI der Patienten.

Auch Kintscher et al. fanden im subkutanen Fettgewebe eine positive Korrelation zwischen CD-3 positiven T-Lymphozyten und dem Taillenumfang. Der Taillenumfang gilt als ein besseres Maß für Insulinresistenz als der BMI, der nur das reine Gewicht in Relation zur Körpergröße einbezieht, während der Taillenumfang das Fettverteilungsmuster besser widerspiegelt. Wu et al. fanden im Vergleich dazu im subkutanen Fettgewebe eine mittelgradige positive Korrelation zwischen RANTES und dem BMI sowie dem Rezeptor von RANTES (CCR-5) und dem BMI. RANTES ist ein spezifisches Chemokin für T-Zellen. Ebenso liegt für die mRNA von RANTES eine positive Korrelation mit CD-3 positiven T-Lymphozyten sowie dem Makrophagenmarker CD11b vor [64]. Der Nachweis von RANTES, als spezifisches Chemokin für T-Lymphozyten, weist möglicherweise auf eine folgende Infiltration mit T-Lymphozyten hin.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die vorliegende Arbeit mit steigendem BMI ein Ansteigen der Zahl CD-4 positiver T-Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe zeigt.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein Anstieg CD-4 positiver T-Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas, eine zentrale Rolle bei der Inflammation im Fettgewebe einnehmen und zu Insulinresistenz führen könnte. In den Arbeiten von Kintscher et al. sowie von Wu et al. stellte sich ein ähnliches Resultat heraus. Um die genauen Zusammenhänge der T-Zellinfiltration bei der

Entstehung von Insulinresistenz abzuklären, sind jedoch weitere Studien nötig. Die vorliegende Arbeit sowie die anderen genannten Studien zeigen, dass sowohl die Makrophagen als auch die Lymphozyten an der Entstehung einer Fettgewebsinflammation beteiligt sind. Einen möglichen Zusammenhang zwischen den genannten Zellarten stellt HLA-DR dar. Es spiegelt die Aktivierung von Zellen durch das  $T_{H1}$ -Zytokin IFN- $\gamma$  wider. Die vorliegende Studie kann HLA-DR positive Zellen im humanen viszeralen Fettgewebe nachweisen. Dieses Ergebnis bedeutet möglicherweise, dass die CD-4 positiven T-Lymphozyten über eine vermehrte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  im Fettgewebe Makrophagen anlocken und aktivieren.

Auch Kintscher et al. untersuchten, nachdem sich im Mausexperiment unter Hochfettdiät, ein zeitversetzten Anstieg von T-Lymphozyten nach 5 Wochen und Makrophagen erst nach 10 Wochen herausstellte, einen möglichen Zusammenhang zwischen den beiden Zellarten über HLA-DR. Die Daten legen nahe, dass Makrophagen über IFN- $\gamma$ , das von Lymphozyten sezerniert wurde, aktiviert wurden. Zusätzlich konnten Kintscher et al., bei 5 Patienten mit CD-4 positiven T-Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe, sowohl die Expression von HLA-DR als auch von IFN- $\gamma$  nachweisen [33].

Zusammengenommen legen die Daten nahe, dass eine vermehrte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch CD-4 positive T-Lymphozyten im Fettgewebe, möglicherweise zu einer Aktivierung von Makrophagen führt. Einen Hinweis auf diesen Vorgang könnte die Expression von HLA-DR an deren Zelloberfläche liefern.

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Fettgewebsvaskularisation und dem Vorkommen inflammatorischer Zellen im Fettgewebe gibt, untersucht die vorliegende Arbeit neben CD-4, CD-68 und HLA-DR auch CD-31, als Marker für Endothelzellen.

Als Resultat ergibt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen CD-31 positiven Zellen und dem BMI. Andere Studien zeigen, dass das Fettgewebe normalgewichtiger Probanden insgesamt stark durchblutet ist und jeder einzelne Adipozyt durch ein gut organisiertes Kapillarnetzwerk versorgt wird [6,12]. Das Fettgewebe produziert sowohl Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), Angiopoietin-2 und Angiogenin, die die Angiogenese fördern, als auch Endostatin, einen endogenen Angiogeneseinhibitor [48]. Studien

stellten fest, dass bei erhöhtem BMI ebenso Angiogenese fördernde Wachstumsfaktoren wie auch Endostatin, ein Inhibitor der Gefäßneubildung, vermehrt nachweisbar sind [48,56]. Beides wird direkt vom Fettgewebe produziert. Silha et al. schlossen daraus, dass der Anstieg der angiogenetischen Faktoren ein Resultat der Adipositas sein könnte [48]. Da aber auch vermehrt Endostatin bei Adipositas nachzuweisen ist, bleibt der genaue Regulationsmechanismus der Gefäßbildung und deren Hemmung im Fettgewebe unklar.

Im Vergleich dazu werden in der vorliegenden Arbeit nicht die fördernden bzw. hemmenden Faktoren der Angiogenese, sondern direkt die zum Untersuchungszeitpunkt vorhandene Vaskularisation des viszeralen Fettgewebes untersucht. Die negative Korrelation von CD-31 als Marker für Endothel mit dem BMI, zeigt eine sinkende Vaskularisation bei zunehmender Adipositas. Eine mögliche Erklärung wäre, dass mit der Größenzunahme der Adipozyten bei steigendem BMI weniger Platz für die Endothelzellen vorhanden ist. Somit wären in den durchgeführten Färbungen prozentual auch weniger CD-31 positive Zellen im viszeralen Fettgewebe nachweisbar. Da die Angiogenese jedoch von unterschiedlichen Faktoren abhängt, könnte die sinkende Vaskularisierung des viszeralen Fettgewebes bei Adipositas auch durch den von Silha nachgewiesenen Anstieg des Angiogenese-Inhibitors Endostatin bei erhöhtem BMI zustande kommen. Klarheit könnte hier eine Messung des Endostatin-Spiegels und der Spiegel diverser angiogenetischer Faktoren bringen, die aber in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Neben der Vermutung, dass die Angiogenese fördernden Faktoren möglicherweise durch die Adipositas eine veränderte Wirkung aufweisen, geben die Daten der vorliegenden Studie jedoch auch bezüglich der Herkunft der inflammatorischen Zellen Aufschluss. Die vorliegende Studie konnte bei allen Probanden inflammatorische Zellen im viszeralen Fettgewebe nachweisen. Da offensichtlich bei einer Zunahme an Fettgewebe dessen Gefäßversorgung prozentual absinkt, stammt der Großteil der nachgewiesenen Makrophagen und Lymphozyten mit großer Wahrscheinlichkeit direkt aus dem Fettgewebe. Ein bestimmter Anteil der inflammatorischen Zellen, die im Fettgewebe anfärbbar sind,

befindet sich auch im Gefäßsystem. Doch angesichts der beobachteten Dynamik liegt es nahe, dass sich ein großer Teil der Zellen direkt im Fettgewebe selbst aufhält.

Die Interaktion der inflammatorischen Zellen mit den Adipozyten und Endothelzellen führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und kann in eine Insulinresistenz münden. Bemerkenswert an den Makrophagen ist ihre wichtige Rolle sowohl im Immunsystem als auch im Stoffwechsel, sowie die überlappende Biologie und Funktion von Makrophagen und Adipozyten bei Adipositas [5,27,37, 53]. Beide Zellarten können ähnliche Proteine exprimieren wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-6. Makrophagen phagozytieren und speichern Lipide und werden bei der Atherogenese zu Schaumzellen. Präadipozyten sind unter bestimmten Umständen ebenfalls zur Phagozytose fähig und scheinen sich sogar zu Makrophagen differenzieren zu können [10]. Diese Interaktion ist sinnvoll, da beide Zellarten an der Immunantwort beteiligt sind. Die Makrophagen eliminieren Pathogene und sezernieren inflammatorische Chemokine und Zytokine, während die Adipozyten Lipide freisetzen, die den Entzündungsstatus beeinflussen könnten [60]. Der Entzündungszustand im viszeralen Fettgewebe bei Adipositas resultiert also vermutlich aus der Zytokinproduktion der Adipozyten selbst, aus der Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten und möglicherweise auch aus der Differenzierung von Präadipozyten zu Makrophagen.

## **4.2 Diabetiker**

Studien der letzten Jahre beschreiben einen Zusammenhang zwischen Adipositas und der Ansammlung von Makrophagen und Lymphozyten im Fettgewebe. Für die Situation bei Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2, als bedeutende Erkrankungen bei Adipositas, liegen bezüglich der Makrophageninfiltration ins Fettgewebe nur wenige Daten vor.

Die Studie von Weisberg et al. beschreibt eine Makrophagenakkumulation bei steigender Adipositas, liefert jedoch keine Angaben über den Insulinsensitivitätsstatus der Probanden bzw. Versuchstiere [58]. Die Arbeit von

Xu et al. zeigt hingegen eine zunehmende Hyperinsulinämie und daher eine steigende Insulinresistenz der Versuchstiere unter Hochfettdiät an [65]. Gemeinsam ist diesen beiden Arbeiten, dass sie eine zunehmende Anzahl von Makrophagen bei steigender Adipositas beschreiben, jedoch nur Xu et al. setzt dies in einen Zusammenhang mit der Insulinresistenz. Somit legen die Daten von Xu et al. nahe, dass die, durch die Makrophagen ausgeschütteten Zytokine im Rahmen der Fettgewebsinflammation, zur Entstehung einer Insulinresistenz beitragen könnten [65].

Die vorliegende Arbeit weist im humanen viszeralen Fettgewebe in der Gruppe der Diabetiker mittels immunhistochemischer Färbung CD-68 positive Zellen nach. Dieses Ergebnis deutet an, dass bei Diabetes mellitus Typ 2, vermehrt Makrophagen im viszeralen Fettgewebe präsent sein könnten und möglicherweise eine pathophysiologische Relevanz bei der Diabetesentstehung haben. Auch Di Gregorio et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen der Einwanderung von Makrophagen ins Fettgewebe und Insulinresistenz [14]. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie zeigten sie die Anwesenheit der Makrophagen in humanem subkutanem Fettgewebe über die Genexpression von CD-68 und MCP-1 mittels RT-PCR. Es ergab sich eine negative Korrelation zwischen der mRNA von CD-68 und der Insulinsensitivität [14].

Die vorliegende Studie zeigt zwar in der Gruppe der Diabetiker Makrophagen im viszeralen Fettgewebe an, kann jedoch nur eine nicht-signifikante negative Korrelation zwischen der Anzahl CD-68 positiver Zellen und dem BMI nachweisen. Die fehlende Signifikanz liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an der geringen Fallzahl. Die ungewöhnliche negative Korrelation könnte möglicherweise auf das Patientenkollektiv mit Kolonkarzinom zurückzuführen sein. Die Tendenz der Werte geht somit erwartungsgemäß in die gleiche Richtung wie in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und Nicht-Diabetiker.

Auch in der Gruppe der Diabetiker sucht die vorliegende Arbeit nach einem Zusammenhang zwischen der Inflammation im Fettgewebe und dessen Vaskularisation. Es zeigt sich wie in der gemeinsamen Gruppe der Diabetiker und



Nicht-Diabetiker eine signifikante negative Korrelation von CD-31 positiven Zellen mit dem BMI. Die Vaskularisation im Fettgewebe wird nicht nur durch die von den Adipozyten sezernierten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren reguliert, sondern auch durch Hypoxämie. Ein verminderter Sauerstoffgehalt im Gewebe verursacht einen Anstieg von VEGF und Leptin im Fettgewebe und führt zu verstärkter Vaskularisation. Leptin ist ein Adipokin, das bei Adipositas und somit auch bei dem damit verbundenen Absinken der Insulinsensitivität und einem daraus resultierenden Diabetes mellitus Typ 2, vermehrt nachweisbar ist. Seine eigentliche Funktion ist die Regulation des Hungergefühls und letztendlich des Körpergewichtes über einen negativen Rückkopplungsmechanismus im Hypothalamus. Die Leptinkonzentration korreliert positiv mit der Körperfettmasse. Unter anderem führt eine veränderte Rezeptordichte bei Adipositas jedoch zu einem fehlenden Ansprechen auf Leptin und somit zu einer sog. Leptinresistenz [25]. Leptin ist also ein Adipokin, das nicht nur bei Adipositas erhöht ist, sondern auch bei Hypoxämie vermehrt von bestimmten Adipozyten sezerniert wird [23]. Diese Daten könnten einen Hinweis auf die Ursache für das in der vorliegenden Arbeit festgestellte Absinken der Vaskularisation im Fettgewebe geben. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre eine veränderte Wirkung von Leptin bei Adipositas.

Ähnlich wie bei der appetitregulierenden Wirkung von Leptin, könnte es durch eine veränderte Rezeptordichte auch in diesem Bereich zu einer Art Resistenz kommen und folglich zu einer sinkenden Vaskularisation bei steigendem BMI. Eine andere Vermutung legt nahe, dass ab einem bestimmten Grad der Adipositas eine Stabilisierung der Wachstumsrate des Fettgewebes eintritt und ab diesem Punkt eine erhöhte Ausschüttung von Hemmstoffen der Angiogenese die Folge ist [8]. Zusätzlich zur gesteigerten Leptinausschüttung entdeckten Grosfeld et al. bei Hypoxie einen starken Abfall des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT-4 [23]. Auch bei der Fettgewebsinflammation bewirkt die gesteigerte Konzentration von TNF- $\alpha$ , eine reduzierte Translokation von GLUT-4 ins Muskel- und Fettgewebe und führt so zu Insulinresistenz [25]. Es ist also vorstellbar, dass eine Hypoxie im Fettgewebe über die verminderte Konzentration des Glukosetranspor-

ters GLUT-4, die Entstehung einer Insulinresistenz und einen daraus folgenden Diabetes mellitus vorantreibt.

So deutet die vorliegende Arbeit zum einen eine Verknüpfung zwischen der Vaskularisation und der Inflammation im Fettgewebe an und zum anderen, dass sich bei steigender Adipositas die Vaskularisation im viszeralen Fettgewebe verringert. Weiterhin bestätigt die sinkende Durchblutung bei erhöhtem BMI das Fettgewebe bzw. die Adipozyten selbst als Produktionsort der Adipokine und Zytokine als Auslöser für die Inflammation.

### **4.3 Nicht-Diabetiker**

Auch bei Nicht-Diabetikern ist Adipositas mit einer vermehrten Entzündungsaktivität verbunden. Bei adipösen Nicht-Diabetikern wurden erhöhte unspezifische Entzündungswerte wie CRP,  $\gamma$ -IG, Körpertemperatur und Leukozyten gemessen [17,34,44,55].

Die vorliegende Arbeit kann in der Gruppe der Nicht-Diabetiker sowohl bei den grenzwertig normalgewichtigen als auch bei den übergewichtigen Probanden Makrophagen, CD-4 positive T-Lymphozyten und HLA-DR, als Zeichen für durch das  $T_{H1}$ -Zytokin IFN- $\gamma$  aktivierte Zellen, nachweisen.

Die Anwesenheit dieser immunaktiven Zellen könnte somit, bei zunehmender Adipositas, auf ein vom Insulinsensitivitätsstatus unabhängiges Potential zur Inflammationsentstehung im viszeralen Fettgewebe hindeuten. Die Daten in der Gruppe der Nicht-Diabetiker ergeben in der vorliegenden Studie jedoch keine Signifikanz.

Weiterhin ist bei gesunden Probanden, die im Laufe der Zeit einen Diabetes entwickeln, ein erhöhtes Körpergewicht, eine verstärkte Störung der Insulinsekretion sowie eine gesteigerte Insulinresistenz, im Vergleich zu den nicht an Diabetes Erkrankten, nachgewiesen [61].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich, wahrscheinlich wegen der geringen Fallzahl in der Gruppe der Nicht-Diabetiker, keine signifikanten Ergebnisse. Jedoch sind die Einzelwerte ähnlich denen der Diabetiker. Interessanterweise ist

der BMI der Nicht-Diabetiker in zwei Fällen mit 24,5 und 24,8 gerade noch in der Norm, während die restlichen Probanden in dieser Gruppe übergewichtig sind. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bereits bei übergewichtigen Nicht-Diabetikern eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems zur Inflammation im Fettgewebe führt, die in eine mögliche Insulinresistenz münden könnte.

#### **4.4 Pathophysiologische Relevanz**

Die zunehmende Adipositas stellt in den Industrienationen ein großes Gesundheitsrisiko dar. Außer einer ausgewogenen fettarmen Ernährung und körperlicher Aktivität gibt es bis jetzt keine effektive Behandlungsmöglichkeit bei bestehender Adipositas. Besonders die abdominelle Adipositas ist ein Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, das Metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2. Neben der Adipositas ist körperliche Inaktivität ein vom BMI unabhängiger Risikofaktor an Diabetes zu erkranken. So reduziert sportliche Betätigung auch bei Übergewichtigen das Erkrankungsrisiko [69]. Weitere Studien zeigten, dass regelmäßige körperliche Aktivität den Inflammationsstatus im Körper reduziert [19,38].

Ein anderer Therapieansatz untersucht die Auswirkung von Antidiabetika wie Insulinsensitizer auf den Inflammationsstatus im Fettgewebe. Hierbei standen in den bisherigen Studien die Makrophagen im Vordergrund. Die bereits angesprochene Arbeit von Di Gregorio, zeigt eine negative Korrelation zwischen der mRNA von CD-68 und der Insulinsensitivität in humanem subkutanem Fettgewebe. Um zu untersuchen, ob sich bei steigender Insulinsensitivität die Anzahl der Makrophagen wieder verringert, wurden die Probanden über einen Zeitraum von 10 Wochen mit Pioglitazone bzw. Metformin behandelt. Für Pioglitazone zeigte sich bei einer gesteigerten Insulinsensitivität von 60% eine Abnahme der mRNA von CD-68 sowie MCP-1 um mehr als 50%. Auch direkt im Fettgewebe reduzierte sich die Anzahl CD-68 positiver Zellen [14]. Metformin, ein Diabetesmedikament aus der Klasse der Biguanide, zeigte hingegen keine Auswirkung auf Makrophagen.

Die Daten aktueller Arbeiten legen nahe, dass sowohl Makrophagen als auch T-Lymphozyten bei der Entstehung einer Insulinresistenz beteiligt sind [33,64]. Die vorliegende Arbeit konnte ebenfalls vermehrt T-Lymphozyten bei steigendem BMI feststellen. Die T-Lymphozyten könnten somit einen möglichen Ansatzpunkt für eine neue Therapie bei Adipositas und deren Folgen darstellen. Die Aktivierung der Makrophagen und T-Lymphozyten ist eng miteinander verknüpft. T-Zellen können unter anderem durch Chemokine, die von Makrophagen sezerniert werden aktiviert werden. Jedoch gelten die T-Lymphozyten auch als Hauptquelle des Zytokins IFN- $\gamma$  [45]. Über IFN- $\gamma$  könnten die T-Lymphozyten sowohl Monozyten über die MCP-1 Sekretion der Präadipozyten rekrutieren, als auch Zellen wie Makrophagen aktivieren [33]. Die vorliegende Arbeit zeigt über den Oberflächenmarker HLA-DR die Aktivierung von Zellen, möglicherweise Makrophagen, durch IFN- $\gamma$  an. Die Daten zeigen hier, auch aufgrund der gegenseitigen Aktivierungsmechanismen zwischen Makrophagen und T-Lymphozyten, einen Verbindungspunkt wie IFN- $\gamma$  zwischen den beiden Zellarten als möglichen Ansatz für neue Therapien auf. Ein weiterer Ansatzpunkt könnte das Zytokin TNF- $\alpha$  sein. Durch seine gesteigerte Ausschüttung bei Adipositas führt es zu einer verminderten Translokation des insulinabhängigen Glukose-Transporters 4 (GLUT 4) ins Muskel- und ins Fettgewebe und hat somit direkten Einfluss auf die Entstehung einer Insulinresistenz und einen daraus resultierenden Diabetes mellitus [40,32]. Ein spezifischer TNF- $\alpha$ -Inhibitor könnte diesen Vorgang möglicherweise verhindern oder zumindest zeitlich verzögern. Um hier jedoch eine sinnvolle Therapiemöglichkeit zu entwickeln, muss zunächst die Funktion der T-Lymphozyten bei der Fettgewebsinflammation und der daraus resultierenden Insulinresistenz geklärt werden.

#### **4.5 Limitationen der Studie**

In der vorliegenden Arbeit wurde der BMI als Maßeinheit für die Adipositas verwendet. Die Definition des Metabolischen Syndroms schließt jedoch nicht den BMI, sondern den Bauchumfang mit ein. Der BMI berücksichtigt nur das reine Körpergewicht in Relation zur Körpergröße und vernachlässigt das

Fettverteilungsmuster. Der Taillenumfang im Bereich des Bauchnabels gemessen im Verhältnis zum größten Hüftumfang ergibt die waist to hip ratio (WHR, Taille-Hüft-Verhältnis). Die WHR erfasst das Ausmaß des viszeralen Fettgewebes besser. Ab einer WHR > 0,85 für Frauen bzw. >1,0 für Männer liegt ein androider, abdominaler Fettverteilungstyp vor. Die EPIC-NORFOLK-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study) zeigte, dass die WHR als prognostischer Parameter für kardiovaskuläre Erkrankungen zuverlässiger ist als der BMI [7]. Auch in der Arbeit von See et al. stellte sich heraus, dass die WHR ein besserer subklinischer Marker für Arteriosklerose als der BMI ist [46]. Diese Ergebnisse können jedoch nicht direkt auf die Insulinresistenz übertragen werden. Eine groß angelegte Meta-Analyse zeigte, dass sowohl der BMI als auch die WHR und der Bauchumfang als Prädiktor für Diabetes mellitus einen ähnlichen Stellenwert einnehmen [54]. Darüber hinaus ergab sich in der CODA-Studie (Collaborative Study of Obesity and Diabetes in Adults) für den Taillenumfang ein geringfügig besserer prognostischer Wert für Diabetes als beim BMI [15]. Um hier Klarheit zu schaffen, sind noch genauere Untersuchungen nötig.

Neben der Maßeinheit zur Beurteilung von Adipositas muss ebenso die geringe Fallzahl, als auch die Tatsache, dass die Fettgewebsproben von Patienten mit Kolonkarzinom stammen, als eine Limitation der vorliegenden Studie angesehen werden. Sowohl eine durch den Tumor hervorgerufene maligne Inflammation in der Umgebung, als auch die durch das Kolonkarzinom z.T. erforderlichen großen abdominalchirurgischen Eingriffe, wie beispielsweise eine Hemikolektomie, verändern perioperativ das Zytokinspektrum im Gewebe und verfälschen somit die gewonnenen Daten.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich ableiten, dass im humanen viszeralen Fettgewebe, neben Makrophagen, CD-4 positive T-Lymphozyten nachweisbar sind. Zusätzlich zeigt sich, dass die Anzahl CD-4 positiver T-Lymphozyten bei steigendem BMI im viszeralen Fettgewebe zunimmt. Der Nachweis HLA-DR positiver Zellen verdeutlicht die Aktivierung von Zellen, möglicherweise Makrophagen, durch das von T-Lymphozyten sezernierte Zytokin

IFN- $\gamma$ . Dies deutet darauf hin, dass T-Lymphozyten bei der Fettgewbsinflammation eine wichtige Funktion einnehmen könnten.

Weiterhin zeigte die Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Vaskularisation und dem Inflammationsstatus des humanen viszeralen Fettgewebes. Bei steigendem BMI ergab sich eine negative Korrelation mit CD-31 positiven Zellen, so dass die Entzündungsfaktoren mit großer Wahrscheinlichkeit nicht aus dem Gefäßsystem, sondern direkt aus dem Fettgewebe stammen.

Um diese Ergebnisse jedoch für neue Therapiemöglichkeiten nutzen zu können, sind weitere Studien nötig.

## 5. Zusammenfassung

Studien der letzten Jahre zeigten, dass die Entstehung von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 durch chronische Entzündungsvorgänge im viszeralen Fettgewebe geprägt ist. Bisherige Arbeiten fokussierten auf die Makrophagen als entscheidende Zellart. Erst seit kurzem wird bei der Entstehung einer Insulinresistenz, neben den Makrophagen, das Augenmerk vermehrt auf Lymphozyten gerichtet.

Die vorliegende Arbeit zeigt das Vorkommen Cluster of Differentiation (CD)-4 positiver T-Lymphozyten im humanen viszeralen Fettgewebe neben den bekannten Makrophagen, sowie die Anwesenheit Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR positiver Zellen. HLA-DR positive Zellen sind Zellen, die durch das Zytokin Interferon (IFN)- $\gamma$  der CD-4 positiven T-Lymphozyten aktiviert worden sind. Weiterhin ergibt sich ein Zusammenhang zwischen Adipositas und Fettgewebsinflammation, der sich in einer signifikanten positiven Korrelation von CD-4 positiven T-Lymphozyten mit dem BMI darstellt. Dafür wurden Fettgewebeproben immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

Diese Daten legen einen veränderten Inflamationsstatus bei unterschiedlichem Body mass index (BMI) nahe und lassen vermuten, dass CD-4 positive T-Lymphozyten während des Entzündungsvorgangs im Rahmen der Adipositas eine Rolle spielen könnten. Den Nachweis von T-Lymphozyten im viszeralen Fettgewebe und ihren Anstieg bei Adipositas, bestätigen neuere Arbeiten. Dass es sich dabei im humanen viszeralen Fettgewebe um CD-4 positive T-Lymphozyten handelt, ist hingegen ein neuer Aspekt, der unter Umständen eine entscheidende Auswirkung auf die Pathophysiologie haben könnte. CD-4 positive T-Lymphozyten könnten mit ihrem Zytokinspektrum, das IFN- $\gamma$  mit einschließt, einen möglichen Ansatzpunkt für eine neue Therapie darstellen. Dafür muss aber zunächst in weiteren Studien die pathophysiologische Bedeutung der T-Lymphozyten und ihre Interaktion mit den Makrophagen im Fettgewebe geklärt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahima RS, Flier JS: Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-437 (2000)
2. Azuma K, Katsukawa F, Oguchi S, Murata M, Yamazaki H, Shimada A, Saruta T: Correlation between serum resistin level and adiposity in obese individuals. *Obesity Research* 11: 997-1001 (2003)
3. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE: The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7: 947-953 (2001)
4. Boenisch T: Handbuch immunchemischer Färbemethoden II. Carpintera,S.22-26 (2002)
5. Bouloumié A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M: Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 50: 2080-2086 (2001)
6. Bouloumié A, Lolmede K, Sengenes C Galitzky J, Lafontan M: Angiogenesis in adipse tissue. *Ann Endocrinl (Paris)* 63: 91-95 (2002)
7. Canoy D, Boekholdt SM, Wareham N, Luben R, Welch A, Bingham S, Buchan I, Day N, Khaw KT: Body fat distribution and risk of coronary heart disease in men and women in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition in Norfolk Cohort. A population-based prospective study. *Circulation*: 116: 2933-2943 (2007)
8. Cao Y: Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest* 117: 2362-2368 (2007)



9. Cavusoglu E, Eng C, Chopra V, Clark LT, Pinsky DJ, Marmur JD: Low plasma RANTES levels are an independent predictor of cardiac mortality in patients referred for coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* published online : DOI: 10.1161/01.ATV.0000258789.21585.76 (2007)
10. Charriere G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Pènicaud L, Casteilla L: Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem* 278: 9850-9855
11. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH: Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* 50: 471-480 (2007)
12. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG: A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4: 211-232 (1997)
13. Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones RM, Zhu Q, Considine RV: Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5452-5455 (2003)
14. Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, Kern PA: Expression of CD68 and Macrophage Chemoattractant Protein-1 Genes in Human Adipose and Muscle Tissues. *Diabetes* 54: 2305-2313 (2005)
15. Duval S, Vazquez G, Baker WL, Jacobs Jr. DR: The Collaborative Study of Obesity and Diabetes in Adults (CODA) project: metaanalysis design and description of participating studies. *Obes Rev* 8: 263–76 (2007)

16. Eckel RH, Grundy SM, Zimmer PZ: The metabolic syndrome. *Lancet* 365: 1415-1428 (2005)
17. Eriksson H, Svardsudd K, Larsson B, Welin L, Ohlson LO, Wilhelmsen L: Body temperature in general population samples: the study of men born in 1913 and 1923. *Acta Med Scand* 217: 347-352 (1985)
18. Fain JN, Cheema PS, Bahouth SW, Lloyd Hiler M: Resistin released by human tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 917-918 (2003)
19. Fallon KE, Fallon SK, Boston T: The acute phase response on exercise: court and field sports. *Br J Sports Med* 35: 170-173 (2001)
20. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S.: Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341: 879-884 (1999)
21. Fasshauer M, Klein J, Blüher M, Paschke R: Adipokine: Mögliches Bindeglied zwischen Insulinresistenz und Adipositas. *Dtsch Ärzteblatt* 101: A 3491-3495 (2004)
22. Friedmann JM: Obesity in the new millennium. *Nature* 404: 632-634 (2000)
23. Grosfeld A, Zilberfarb V, Turban S, Andre J, Guerre- Millo M, Issad T: Hypoxy increases leptin expression in human PAZ6 adipose cells. *Diabetologia* 45: 527-530 (2002)
24. Herold G: Innere Medizin. Gerd Herold, Köln, S.609-620 (2006)
25. Heß K, Marx N: Bedeutung der Fettgewebsinflammation für Insulinresistenz und Atherogenese. *Diabetes, Stoffwechsel und Herz* 6: 433-440 (2007)

26. Higashiura K, Ura N, Ohata J, Togashi N, Takagi S, Saitoh S, Murakami H, Takagawa Y, Shimamoto K: Correlations of adiponectin level with insulin resistance and atherosclerosis in Japanese male populations. *Clin Endocrinol* 61: 753-759 (2004)
27. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM: Adipose Expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91 (1993)
28. Hotamisligil GS, Spiegelman BM: Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 87-91 (1994)
29. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas (Generated table: Prevalence DM 2003-2025)
30. Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA: Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19: 547-566 (2005)
31. Kanda H, Tateya S, Tamouri Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M: MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116: 1494-1505 (2006)
32. Kanzaki M: Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. *Endocr J* 53: 267-293 (2006)
33. Kintscher U, Hartge M, Heß K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TFE, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf A, Knippschild U, Hombach V, Marx N: T-lymphocyte Infiltration in Visceral Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1304-1310 (2008)

34. Lindsay RS, Krakoff J, Hanson RL, Benett PH, Knowler WC: Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Diabetes* 50: 1598-1603 (2001)
35. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Heidelberg, S.1103-1140 (2007)
36. Lüllmann-Rauch R: *Histologie*. Thieme Stuttgart New York, S.513-519 (2003)
37. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, Parker RA, Suttles J, Fazio S, Hotamisligil GS, Linton MF: Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med* 7: 699-705 (2001)
38. Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R: Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *Int J Sports Med* 21: 21-24 (2000)
39. McTernan PG, Fisher FM, Valsamakis G: Resistin and type 2 diabetes: regulation of resistin expression by insulin and rosiglitazone and the effects on lipid and glucose metabolism in human differentiated adipocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 6098-6106 (2003)
40. Moller DE: Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 11: 212-217 (2000)
41. Murphy KG, Bloom SR: Are all facts created equal? *Nat Med* 12: 32-33 (2006)

42. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100: 2473-2476 (1999)
43. Pang S, Le Y: Role of Resistin in Inflammation and Inflammation-related Diseases. *Cell Mol Immunol* 3: 29-34 (2006)
44. Pratley RE, Wilson C, Bogardus C: Relation of the white blood cell count to obesity and insulin resistance: effect of race and gender. *Obes Res* 3: 563-571 (1995)
45. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: Interferon.gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189 (2004)
46. See R, Abdullah S, McGuire D, Khera A, Patel M, Lindsey J, Grundy SM, de Lemos J : The association of differing measures of overweight and obesity with the prevalence of sub-clinical atherosclerosis in a population-based sample: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol* 50: 752-759 (2007)
47. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB: Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801 (2006)
48. Silha JV, Krsek M, Sucharda P, Murphy LJ: Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity* 29: 1308-1314 (2005)
49. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF: Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361: 226-228 (2003)

50. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307–312 (2001)
51. Tataranni PA, Ortego E: A Burning Question. *Diabetes* 54: 917-927 (2005)
52. Tomas E, Tsa TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB: Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16309-16313 (2002)
53. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM: PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-52 (1998)
54. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR Jr, Silventoinen K: Comparison of body mass index, waist circumference, and waist /hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiol Rev* 29:115-28. (2007)
55. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB: Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *Journal of the American Medical Association* 282: 2131-2135 (1999)
56. Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D, Lijnen HR: Modulation of Angiogenesis during Adipose Tissue Development in Murine Models of Obesity. *Endocrinology* 146: 4545-4554. (2005)
57. Wang Y, Lobstein T: Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J of Pediatr Obes* 1: 11-25 (2006)

58. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808 (2003)
59. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW: CCR modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124 (2006)
60. Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119 (2005)
61. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE: The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 104: 787-794 (1999)
62. WHO: The challenge of obesity in the WHO European Region. Fact sheet EURO/13/05 (2005)
63. World Health Organization. Obesity and Overweight Facts. [http://www.who.int/hpr/NPH/docs/gs\\_obesity.pdf](http://www.who.int/hpr/NPH/docs/gs_obesity.pdf) (2007)
64. Wu H, Ghosh S, Dai Perrard X, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM: T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation* 115: 1029-1038 (2007)
65. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan Guo, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830 (2003)

66. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Shudo K, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T: The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 7: 941-946 (2001)
67. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-1295 (2002)
68. Youn BS, Yu KY, Park HJ, Lee NS, Min SS, Youn MY, Cho YM, Park YJ, Kim SY, Lee HK, Park KS : Plasma resistin concentrations measured by enzyme-linked immunosorbent assay using a newly developed monoclonal antibody are elevated in individuals with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 150-156 (2004)
69. Zoeller RF: Physical Activity and Obesity: Their Interaction and Implications for Disease Risk and the Role of Physical Activity in Healthy Weight Management. *Am J Lifestyle Med* 1: 437-446 (2007)