

Adipozytokine als Bindeglied zwischen Metabolismus und arthritischen Veränderungen

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des
Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Marie-Lisa Hülser

Bad Nauheim 2019

Diese Arbeit wurde an der Professur für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael U. Martin

Lehrstuhl für Immunologie des Fachbereichs Biologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Professur für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie des Fachbereichs Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Marie-Lisa Hülser

Inhalt

| | |
|--|----|
| Adipozytokine als Bindeglied zwischen Metabolismus und arthritischen Veränderungen | 1 |
| Abkürzungen | 6 |
| Zusammenfassung..... | 8 |
| Abstract | 9 |
| Einleitung..... | 10 |
| Diarthrosen..... | 11 |
| Arthrose (OA) | 13 |
| Rheumatoide Arthritis (RA) | 15 |
| Fettgewebe..... | 16 |
| Insulinresistenz..... | 17 |
| Adipokine und Adipozytokine | 17 |
| Fragestellung..... | 21 |
| Material | 22 |
| Methoden..... | 25 |
| Mäuse | 25 |
| Induktion einer Adipositas durch HFD | 25 |
| Induktion einer Arthrose durch Destabilisierung der medialen Menisci | 25 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6 Mäusen | 27 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1Jrj Mäusen | 29 |
| ELISA | 30 |
| Histologische Färbungen | 30 |
| Immunohistochemische Färbungen..... | 31 |
| Histologische Beurteilungen (Scoring) | 35 |
| Statistische Auswertungen..... | 36 |
| Ergebnisse | 37 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6 Mäusen | 37 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1Rj Mäusen | 40 |
| Metabolische Veränderungen..... | 43 |
| Systemische Adipokinspiegel | 43 |
| Systemische Entzündungsparameter | 49 |
| Arthroseinduktion | 54 |
| Besonderheiten und Einzelfälle bei der Gelenkdegradation..... | 62 |

| | |
|---|-----|
| Metabolische Veränderungen..... | 63 |
| Systemische Adipokinspiegel | 70 |
| Korrelationsanalysen..... | 79 |
| Lokale Adipokinverteilung..... | 88 |
| Ortsständige Zelltypen | 93 |
| Diskussion..... | 98 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6..... | 98 |
| Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1Rj..... | 98 |
| Arthroseinduktion | 99 |
| Metabolische Veränderungen im Kontext der Arthroseinduktion | 100 |
| Systemische Adipokinspiegel | 102 |
| Korrelationsanalysen..... | 104 |
| Adipokinverteilung im Gewebe..... | 104 |
| Zelltypen im Gewebe..... | 105 |
| Verknöcherungen der Menisken..... | 107 |
| Zusammenfassung..... | 108 |
| Danksagung | 109 |
| Literaturverzeichnis..... | 110 |

Abkürzungen

| | |
|---------------|---|
| ACPAs | Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (aus dem Engl. <i>anticitrullinated peptide/protein antibodies</i>) |
| BMI | aus dem Engl. <i>Body-Mass-Index</i> |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | Unterscheidungsgruppen (aus dem Engl. <i>Cluster of Differentiation</i>) |
| CFA | komplettes Freund'sches Adjuvans (aus dem Engl. <i>complete Freund's adjuvant</i>) |
| CIA | Kollagen-induzierte Arthritis (aus dem Engl. <i>collagen induced arthritis</i>) |
| CLS | aus dem Engl. <i>Crown-like structures</i> |
| CRP | C-reaktives Protein |
| DMM | Destabilisierung des medialen Meniskus (aus dem Engl. <i>destabilization of the medial meniscus</i>) |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| <i>et al.</i> | et alia (aus dem Lateinischen <i>und andere</i>) |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | fetales Kälberserum (aus dem Engl. <i>fetal calf serum</i>) |
| HE | Hämalaun / Eosin |
| HFD | Hochfettdiät (aus dem Engl. <i>high-fat diet</i>) |
| Ig | Immunglobulin |
| IHC | Immunhistochemie |
| IL | Interleukin |
| i.p. | Intraperitoneal |
| JAK | Januskinase/„just another kinase“ |
| MMP | Matrix-Metalloproteasen |
| ND | normale Diät (Standardfutter für Mäuse) |
| OA | Arthrose (aus dem Engl. <i>osteoarthritis</i>) |
| OP | Operation |
| OPG | Osteoprotegerin |

| | |
|---------------|---|
| RA | rheumatoide Arthritis |
| RT | Raumtemperatur |
| SF | synoviale Fibroblasten |
| SNP | single nucleotide polymorphisms |
| STAT | aus dem Engl. <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |

Zusammenfassung

Weltweit betrifft Adipositas und ihre Komorbiditäten immer mehr Menschen und gewinnt somit an klinischer, gesellschaftlicher und wirtschaftlicher Bedeutung. Adipozytokine sind bioaktive Faktoren, welche vor allem vom Fettgewebe produziert werden und die Energiehomöostase des Körpers regulieren. Da diese Adipozytokine durch Adipositas bzw. metabolische Veränderungen reguliert werden, können sie den Metabolismus mit dem Immunsystem verbinden, indem sie dieses modulieren. Nicht nur Adipositas, sondern auch Gelenkerkrankungen wie die degenerative Arthrose und die autoimmune Rheumatoide Arthritis sind weltweit verbreitet und so häuft sich die Zahl der Patienten, welche sowohl von Adipositas als auch von Gelenkerkrankungen betroffen sind. Um die Einflüsse von Übergewicht auf Arthritis und Arthrose genauer darzustellen wurden in dieser Dissertationsarbeit mehrere Mausmodelle kombiniert. Ein diätinduziertes Übergewicht wurde entweder mit einem Arthritismodell (Kollagen-induzierte Arthritis) oder einem Arthrosemodell (Destabilisierung der medialen Menisken) kombiniert. Durch Nekropsien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Arthritis- bzw. Arthroseinduktion sollte dargestellt werden, wie verschiedene Adipokine im Verlauf der Erkrankung exprimiert werden. Des Weiteren sollte zwischen systemischen Adipokinwerten im Serum und lokalen Adipokinverteilungen im Gelenk unterschieden werden.

Das Arthrosemodell wurde in C57Bl/6 Mäusen durchgeführt, wobei den Tieren nach dreimonatiger Fütterung mit einer Standarddiät oder einer stark fetthaltigen Diät operativ die medialen Menisken durchtrennt wurden. 4, 6 und 8 Wochen nach Arthroseinduktion wurden dann die Gewebe entnommen und die Seren analysiert.

Das Arthritismodell sollte zunächst zur optimalen Vergleichbarkeit im gleichen Mausstamm durchgeführt werden, hier konnte jedoch keine zufriedenstellende Inzidenz erreicht werden, sodass das Arthritismodell erfolgreich im DBA/1Rj Mausstamm durchgeführt wurde. Die Tiere wurden vor Beginn der Kollagen-induzierten Arthritis für 6 Wochen mit den gleichen Diäten gefüttert wie bereits die C57Bl/6 Mäuse und dann 4, 5,5 und 7 Wochen nach der ersten Immunisierung analysiert.

Sowohl die metabolischen- als auch die Arthrose- und Arthritismodelle wurden erfolgreich durchgeführt. Die Gelenke der erkrankten Tiere wurden histologisch mittels eines etablierten Scores bemessen, um den Krankheitsverlauf darzustellen und mit metabolischen Parametern vergleichen zu können. Außerdem wurde der Metabolismus durch einen Score zur Darstellung der Leberverfettung charakterisiert und das Fettgewebe wurde auf Anzeichen einer Entzündung untersucht. Auch die Adipokine konnten im Serum gemessen und lokal histologisch dargestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass Leptin stark durch die fetthaltige Diät erhöht, durch Arthroseinduktion jedoch nur leicht, und durch Arthritisinduktion sehr stark reduziert wird. Interessanterweise wurden Visfatin und Adiponektin systemisch deutlich weniger stark durch die Gelenkerkrankungen beeinflusst. Im Gelenk zeigte sich, dass in den geschädigten Bereichen deutlich mehr Adiponektin- und Leptin-produzierende Zellen vorhanden waren als in den entsprechenden gesunden Arealen. Die lokalen Adipokine waren unabhängig von den diätinduzierten systemisch-metabolischen Veränderungen.

Diese Arbeit konnte außerdem zeigen, dass der Schweregrad der Arthrose vor allem mit dem Körpergewicht korreliert und weniger mit metabolischen Veränderungen, was auf einen ausgeprägten biomechanischen Einfluss hinweist.

Abstract

Obesity and its comorbidities are of increasing clinical, societal and economical importance due to worldwide increase of affected people. Adipocytokines are bioactive factors, produced mainly by adipose tissue, regulating energy homeostasis of the body. Since adipocytokines themselves are regulated by obesity or metabolic changes, they are able to connect metabolism to the immune system by modulating immunologic processes. Not only obesity, but also joint diseases such as degenerative osteoarthritis (OA) or the autoimmune driven rheumatoid arthritis (RA) are very common, leading to high numbers of patients affected by both, joint disease and obesity. To characterize the influence of obesity on OA and RA, this doctoral thesis describes the evaluation of a combination of different mouse models. A diet-induced obesity was either combined with collagen-induced arthritis (CIA) or surgically-induced OA (by destabilization of the medial menisci). The mice were sacrificed at different time points after induction of OA or RA to show the influence of adipokines at different stages of the joint diseases. Furthermore, distinct analysis of systemic adipokines in the mouse sera were compared to immunohistological analysis of tissue adipokine expression in the joint.

The OA model was performed in C57Bl/6 mice, which were fed with standard(ND)- or high-fat diet (HFD) for three months prior to OA induction. Necropsies were done 4, 6 and 8 weeks after surgery for collection and analysis of tissues and sera.

For optimal comparability, CIA should be performed in the same mouse strains, but since the incidence was too low, CIA model was successfully repeated in DBA/1Rj mice. These mice received the same ND or HFD for six weeks prior immunization and were sacrificed 4, 5.5 and 7 weeks after RA induction.

Diet induced obesity as well as the OA- and RA-models were successful and destruction of the joints could be quantified by histological scores for comparison with metabolic parameters. Metabolic changes were characterized by scoring lipid vacuoles in liver cells or histological changes in the adipose tissue. Adipokines were analyzed in the sera and local distribution in the joints were visualized by immunohistochemical staining. The serologic analysis showed that leptin was significantly induced by HFD, which was then reduced by DMM and strongly reduced by CIA. Of note, visfatin and adiponectin were only slightly influenced by the different models on a systemic level, whereas locally adiponectin and leptin were expressed by cells predominantly in areas with defects rather than in respective areas of healthy joints. These local observations were independent from metabolic changes due to the different diets.

This project also showed a better correlation between OA progression and bodyweight than with other metabolic parameters or adipokines, suggesting a strong biophysical influence of obesity.

Einleitung

Übergewicht und Adipositas sind weltweit ein Phänomen mit wachsender Bedeutung für die medizinische Forschung in den meisten Fachgebieten. Im 2015 veröffentlichten Bericht der „Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKU und DESTATIS¹“ wird speziell für Deutschland gezeigt, dass sowohl Übergewicht und Adipositas als auch Arthrose (engl. „osteoarthritis“, OA) und rheumatoide Arthritis (RA) im Alter zunehmen. Daraus ergibt sich nicht nur generell durch steigende Häufigkeit eine größere Wahrscheinlichkeit, dass RA- und OA-Patienten übergewichtig oder adipös sind, sondern auch biographisch gesehen häufen sich beide Phänomene im Alter. Im Zuge des demographischen Wandels ist zu erwarten, dass die Thematik in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnt², sowohl sozioökonomisch als auch in der Klinik und Forschung.

Auch in der Rheumatologie wird vermehrt untersucht, welche Auswirkungen das Körpergewicht oder metabolische Einflüsse wie z. B. Blutfette, Blutzucker, Insulinresistenz oder Diabetes auf die verschiedenen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises haben³. Hierbei ist natürlich nicht nur von Bedeutung, ob sich rheumatische Erkrankungen und der Metabolismus gegenseitig beeinflussen, sondern auch, über welche Mechanismen diese Einflüsse funktionieren, damit langfristig eben diese Mechanismen in der Klinik modifiziert werden können und eine Verbesserung für die Patienten erreicht wird.

Adipositas wirkt sich durch eine höhere mechanische Belastung auf die Gelenke aus und beeinflusst durch veränderte Zytokin- und Adipokinspiegel entzündliche Prozesse³⁻⁶. Es sind jedoch nicht nur negative Effekte eines hohen BMI beschrieben, so führt Übergewicht auch zu einer höheren Knochenmasse und geringerem Frakturenrisiko⁷.

In dieser Arbeit soll im Tiermodell eine Adipositas induziert werden, in Kombination entweder mit OA oder mit RA. Anschließend soll genauer dargestellt werden, wie sich die Adipositas sowohl systemisch im Serum als auch lokal im Kniegelenk zu verschiedenen Zeitpunkten des OA- bzw. RA-Progresses auswirkt. Dabei wird außerdem mit Tieren ohne Gelenkerkrankung aber mit Adipositas verglichen, um unterscheiden zu können, welche Einflüsse der Adipositas generell auf ein Gelenk wirken (im gesunden Tier), welche auf ein geschädigtes Gelenk wirken (OA) und welche den autoimmunen Mechanismus der RA beeinflussen und nicht nur den daraus resultierenden Gelenksschaden.

Diarthrosen

Aufbau

Diarthrosen, also echte Gelenke, sind bewegliche Verbindungen von Knochen, bestehend aus einer überknorpelten Gelenkpfanne und einem ebenfalls überknorpelten Gelenkkopf. Diarthrosen werden durch die Gelenkkapsel abgeschlossen und durch Bänder stabilisiert. Zwischen den Knorpelflächen, welche sich gegeneinander bewegen, befindet sich der Gelenkspalt, welcher mit Synovialflüssigkeit gefüllt ist⁸.

Die Gelenkhöhle, also der von der Gelenkkapsel umschlossene Raum des Gelenks, wird bei manchen Gelenken durch knorpelige Scheiben unterteilt. Diese bezeichnet man bei vollständiger Kompartimentierung der Gelenkhöhle als Disci und bei unvollständiger Kompartimentierung wie z. B. im Kniegelenk als Menisci⁸.

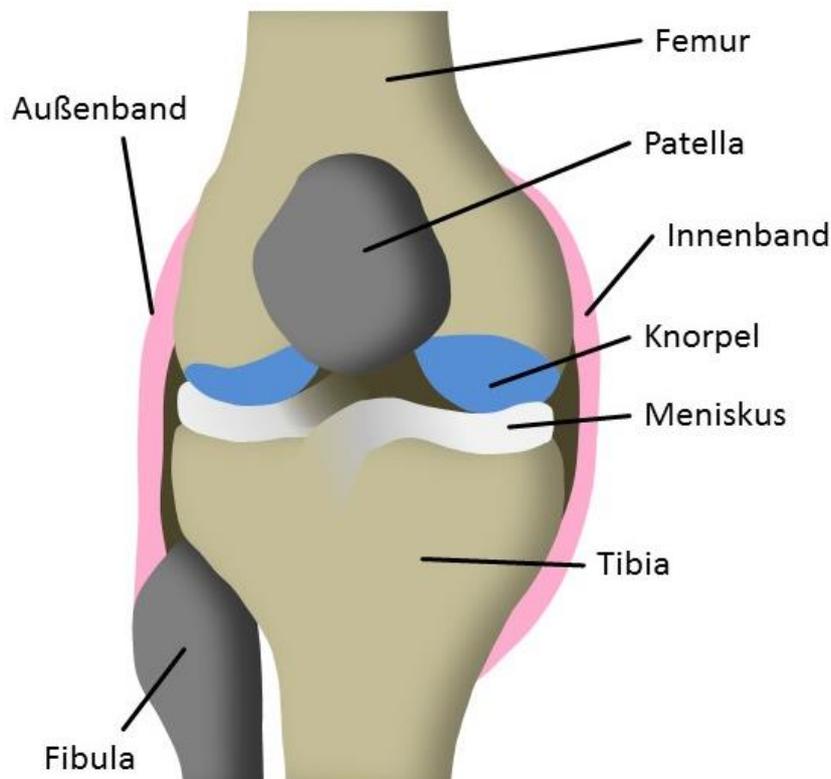


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines gesunden Kniegelenks. Der überknorpelte Femur und die ebenfalls überknorpelte Tibia können, stabilisiert durch den Meniskus, gegeneinander bewegt werden. Dabei entsteht durch die Synovia und die perfekt aufeinander abgestimmten Oberflächen kaum Reibung.

Knochen

Die Knochen des menschlichen Körpers müssen verschiedensten Belastungsarten standhalten können, nicht nur dem Druck des Körpergewichts bzw. der Schwerkraft, sondern auch Zug-, Biegs- und Torsionskräften. Dafür ist eine entsprechend stabile und gleichzeitig flexible Struktur essenziell⁸. Die Knochenmatrix wird von Osteoblasten synthetisiert, welche zunächst eine organische Matrix sezernieren, die dann mit etwas zeitlicher Verzögerung mineralisiert wird⁸. Um zeitlebens den hohen Belastungen standhalten und im Falle eines Bruchs auch diesen wieder heilen zu können, sind Knochen

einem ständigen Umbau unterworfen, wobei Osteoklasten Knochenmatrix abbauen bzw. resorbieren und Osteoblasten neue Knochenmatrix aufbauen⁸. Diese Prozesse der Verknöcherung können im Kontext einer Arthrose verändert werden und zur Bildung von Osteophyten und anderen pathologischen Veränderungen wie subchondralen Sklerosen oder Pseudozysten beitragen^{9, 10}.

Knorpel

Knorpel ist eine spezialisierte Form des Binde- bzw. Stützgewebes, welcher in vier Arten unterschieden werden kann: hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel, fetaler Knorpel und Faserknorpel. Die Knorpelmatrix wird von Chondrozyten synthetisiert, welche sich im Knorpelgewebe befinden. In histologischen Gewebepräparaten sind Chondrozyten in Knorpelhöhlen vorzufinden, allerdings entstehen diese Höhlen durch die Fixierung bzw. Dehydrierung bei der Gewebepräparation, welche so nicht den physiologischen Bedingungen entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem der hyaline Knorpel, welcher die Gelenkoberflächen überzieht und der Faserknorpel aus welchem die Menisken bestehen, von Bedeutung. Der hyaline Knorpel besitzt keine Knorpelhaut und kann Schäden deshalb nicht regenerieren, dies bedeutet Schädigungen im Rahmen von Arthrose (OA) oder rheumatoider Arthritis (RA) sind nicht oder nur eingeschränkt reversibel⁸.

Der Knorpel der Gelenkoberflächen besteht zu 90 % aus extrazellulärer Matrix, welche von den Chondrozyten sezerniert wird. Die Matrix besteht hauptsächlich aus Typ II Kollagen, Aggrecan und der umgebenden Hydrathülle¹¹. Werden Chondrozyten aktiviert, z. B. durch entzündliche Stimuli, so können sie aber auch zum Abbau der Knorpelmatrix beitragen indem sie Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 β (IL-1 β) oder IL-6 sezernieren oder auch durch die Synthese von Kollagenasen (Matrixmetalloproteinasen, MMPs) und Aggrecan degradierenden Enzymen (z.B.: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs, ADAMTS)⁹.

Chondrozyten exprimieren unterschiedliche Proteine, je nachdem, ob die Zelle gerade erst zum Chondrozyten differenziert, oder ob sie sich z. B. zu einem hypertrophen Chondrozyt weiterentwickeln. Hypertrophie bedeutet, dass die einzelne Zelle an Volumen zunimmt⁸. Bei Chondrozyten geht dies mit der Synthese von Kollagen Typ 10 und MMPs einher wodurch die Entwicklung einer Arthrose verstärkt wird¹². Anhand solcher Markerproteine kann also erkannt werden, in welchem Stadium sich ein Chondrozyt befindet. SOX9 wird z. B. nur von Vorläuferzellen der Chondrozyten und differenzierten Chondrozyten exprimiert, nicht aber von hypertrophen Chondrozyten¹³, wohingegen Kollagen Typ 10 nur von hypertrophen Chondrozyten synthetisiert wird¹⁴.

Synovialmembran

Die Synovialmembran grenzt die Gelenkhöhle vom umgebenden Gewebe ab und überzieht dabei ihre gesamte Innenfläche bis auf den Knorpel. Die Synovialmembran besteht hauptsächlich aus Makrophagen und Fibroblasten (Synoviale Fibroblasten, SF) welche die Synovialflüssigkeit synthetisieren und sezernieren. Die Synovialmembran besteht aus einer wenige Zellen dicken Deckzellschicht, dem sog. lining layer und dem darunter liegenden sublining. Da die Synovialmembran die Homöostase der Synovialflüssigkeit aufrecht erhält, ist sie essenziell für die Homöostase des Gelenkknorpels, welcher nicht über Blutgefäße, sondern durch Diffusion aus der Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt wird⁸. Wichtig ist dabei ganz besonders die Synthese von verschiedenen

Proteinen der extrazellulären Matrix wie z. B. Fibronectin, Kollagen, Laminin, Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Lubricin¹⁵, welche von den Fibroblasten der Synovialmembran in die Synovialflüssigkeit abgegeben werden. Um dabei die Homöostase wahren zu können, sezernieren Fibroblasten aber auch Proteine wie Kathepsin L und K, MMPs oder deren Inhibitoren, die sog. TIMPs (tissue inhibitors of matrixmetalloproteinases)¹⁶. Die Synovialflüssigkeit dient also als „Schmierfilm“ zum Schutz der gegeneinander reibenden Knorpelflächen, weshalb diejenigen Proteine, welche eine visköse Konsistenz garantieren, besonders wichtig sind⁸. Sowohl die Gelenkknorpel als auch Disci und Menisci werden über die Synovialflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt. Umgekehrt werden aber auch Abbauprodukte aus dem Knorpelgewebe in die Synovialflüssigkeit abgegeben und über die Makrophagen der Synovialmembran abtransportiert⁸. Außerdem werden über Stoffe in der Synovialflüssigkeit auch Prozesse im Gelenk reguliert, wie z. B. pro-entzündliche oder anti-entzündliche Faktoren, die insbesondere im Kontext von Gelenkerkrankungen den Gelenkschaden beeinflussen. Als Beispiel für einen antientzündlichen Faktor kann IL-10 genannt werden, wohingegen IL-1 ein starker pro-entzündlicher Faktor ist¹⁷.

Arthrose (OA)

Die OA ist eine weit verbreitete degenerative Gelenkerkrankung, welche durch den Abbau von Knorpelmatrix und eine chronische, meist schmerzhaft eingeschränkte Bewegung des Gelenks charakterisiert ist¹⁸. Weltweit gibt es ca. 10 % der Männer und 18 % der Frauen ab einem Alter von 60 Jahren eine OA, wobei bisher unklar ist, weshalb Frauen häufiger betroffen sind¹⁹. Hände, Knie, Hüften und die Wirbelsäule sind am häufigsten betroffen¹⁸. Der stärkste Risikofaktor für die Entwicklung einer OA ist das Alter, aber auch die erhöhte mechanische Abnutzung durch Sport und/oder Adipositas können die Inzidenz und Progression der OA beeinflussen. Hierbei erhöht Adipositas nicht nur das Risiko zu erkranken, sondern beschleunigt zusätzlich den Verlauf⁹. Auch Verletzungen von Knochen oder Knorpel erhöhen das Risiko, an einer OA zu erkranken. So zeigte sich, dass eine Knieverletzung das OA Risiko um das Vierfache erhöht²⁰. Die Gelenkschäden einer OA sind jedoch nicht ausschließlich auf physikalische Abnutzung zurückzuführen, sondern werden auch durch entzündliche Veränderungen verursacht bzw. verstärkt²¹. Veränderungen und Schäden beschränken sich dabei nicht ausschließlich auf den Knorpel, sondern betreffen auch umliegendes Gewebe wie z. B. den Knochen oder die Synovialmembran⁹. So ist auch eine Synovitis mit vermehrter Proliferation der Synoviozyten und hypertrophen Gewebsveränderungen mit entsprechend verstärkter Angiogenese eine häufige Begleiterscheinung der OA. Die Aktivierung des Synoviums ist bei der OA (im Gegensatz zur autoimmun vermittelten RA) vermutlich eine sekundäre Reaktion auf Entzündungsmediatoren und Matrixschäden²².

Eine OA führt allerdings nicht nur zu eingeschränkter Bewegung sondern wahrscheinlich in Folge dessen auch zu metabolischen Veränderungen, welche wiederum zu einer erhöhten Morbidität führen²³. So beeinflussen nicht nur das Gewicht⁴ und die Adipozytokine²⁴ den Verlauf der OA, sondern auch die OA den Metabolismus, wodurch ein komplexes Netzwerk gegenseitiger Einflüsse entsteht. Interessanterweise führt eine Adipositas nicht nur zur erhöhten Inzidenz von Knie- und Hüftarthrose sondern auch Gelenke, welche nicht gewichttragend sind wie die Finger, sind häufiger betroffen. Ob diese Effekte über Adipozytokine vermittelt werden, ist noch nicht abschließend geklärt⁹.

Destabilisierung des medialen Meniskus

In retrospektiven Studien über Patienten mit Verletzungen am vorderen Kreuzband zeigte sich, dass diese nach einigen Jahren eine Arthrose entwickelten^{25,26}. Dieser Verlauf lässt sich im Tiermodell durch operatives Durchtrennen des vorderen Kreuzbandes oder des medialen Meniskus nachstellen²⁷. In der folgenden Arbeit wurde ein Mausmodell angewandt, bei welchem der mediale Meniskus operativ durchtrennt wurde (Abbildung 2). Der durchtrennte Meniskus führt zur Destabilisierung des Gelenks und dadurch zur Abnutzung der Knorpelflächen. Vorteil dieses Modells ist, dass der Verlauf der Arthrose über einen relativ langen Zeitraum stattfindet und dabei im Vergleich zu anderen murinen Modellen eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht wird²⁷.

Generell sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Tierversuche nur mit Bedacht durchgeführt werden sollen und dürfen. Da die OA bisher nicht geheilt werden kann und sich Therapien nur auf das Verlangsamen der Gelenksdegradation und die Abmilderung der Schmerzen konzentrieren²⁸, wurde es für dieses Projekt als moralisch vertretbar erachtet, dass ein Tiermodell angewendet wurde, um die Mechanismen dieser Erkrankung, insbesondere bezüglich ihres Verlaufs zu erforschen.

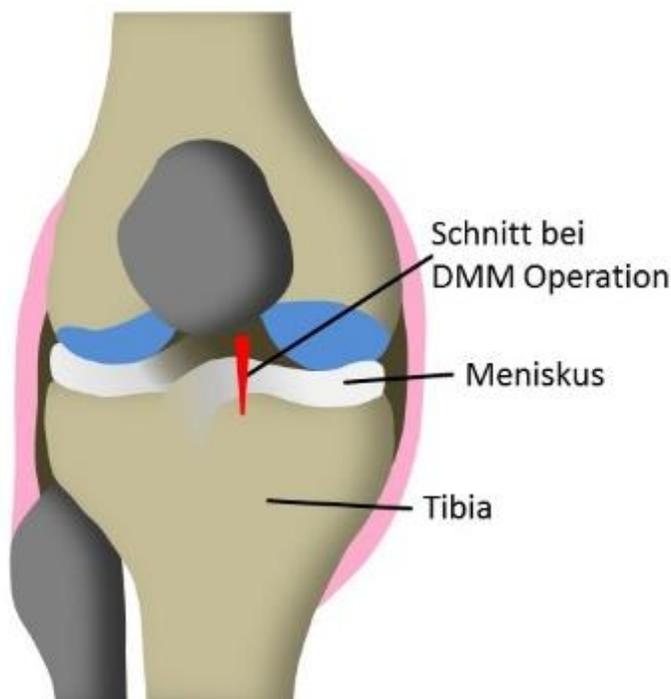


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Präparationsstelle für die DMM-Operation. Durch das Durchtrennen des Meniskus wird das Gelenk destabilisiert und die reibungsfreie Bewegung der Knochen gegeneinander ist nicht mehr optimal möglich.

Rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, von der weltweit ca. 0,5 - 1 % der Bevölkerung betroffen ist. Prinzipiell kann sich die RA in jedem Alter manifestieren, beginnt aber am häufigsten zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr und 2- bis 3-fach häufiger bei Frauen. Die klassischen Symptome sind Gelenkschmerzen, -schwellung und Steifigkeit, die typischerweise vor allem morgens auftreten²⁹. Histologisch wird die RA charakterisiert durch lokal verstärkte Angiogenese²⁹, ein hyperplastisches Synovium mit aktivierten Fibroblasten und progressiver Gelenkschädigung³⁰. Üblicherweise sind zunächst Fingergrund-, Fingermittel- und Handgelenke betroffen und nach und nach werden weitere Gelenke involviert. Für den Verlauf der RA sind viele verschiedene Faktoren verantwortlich unter anderem genetische Prädisposition und epigenetische sowie umweltbedingte Einflüsse wie z. B. Rauchen³⁰. Inzwischen sind sehr viele Mechanismen bekannt, die zur Entstehung der Erkrankung beitragen, jedoch ist nicht endgültig geklärt, wie genau und in welcher Reihenfolge diese zur Krankheitsentstehung führen. Eine Rolle spielen die sog. ACPAs (Anticitrullinated peptide/protein antibodies). Dabei handelt es sich um Antikörper gegen verschiedene citrullinierte Proteine, welche weitgehend spezifisch für die RA sind³¹. Der Einfluss von Zytokinen in der Pathophysiologie der RA zeigt sich z. B. an TNF α (Tumornekrosefaktor α), welcher in großen Mengen in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten nachgewiesen wurde und inzwischen als therapeutisches Zielmolekül etabliert ist²⁹. Auch das pro-entzündliche IL-6 ist ein erfolgreiches Zielmolekül für inhibitorische Antikörper, sodass auch hier ein molekularer Mechanismus mit zentraler Rolle bestätigt ist³². Die Tatsache, dass nicht alle Patienten auf ein Medikament ansprechen, zeigt aber auch, dass noch Bedarf an der Klärung weiterer Mechanismen und der Entdeckung von Biomarkern und Ansatzpunkten zur Krankheitsmodifikation besteht.

Es gibt sowohl Studien, die dafür sprechen, dass die RA Progression vor allem in der frühen Phase stattfindet, als auch Studien, die eher für eine langfristige konstante Progression sprechen. Allen Studien ist aber gemein, dass die RA progressiv verläuft und Gelenkschäden meist nicht regenerieren können, der Patient somit kontinuierlich Gelenkschäden akkumuliert²⁹.

Collagen-induced arthritis (CIA)

Das CIA-Modell ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle der entzündlichen Arthritis. Hierbei werden Mäuse oder Ratten mit einer Emulsion aus Freund-Adjuvans, hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* und Kollagen Typ II immunisiert³³. Nicht alle Mausstämme sind gleichermaßen für dieses Modell geeignet, sodass DBA/1 Mäuse am häufigsten verwendet werden³³. Auch wenn die Immunreaktion im CIA Modell sowohl über T- als auch über B-Zellen abläuft³³, ist doch die Produktion von Antikörpern gegen Kollagen Typ II die treibende Kraft³⁴ und es wird eher eine akute denn eine der humanen RA vergleichbar chronische Entzündung dargestellt. Dabei entwickelt sich in diesem Modell auch eine Infiltration des Synoviums mit Makrophagen, Leukozyten, T- und B-Zellen, was zur hyperplastischen Synovialmembran führt, welche Knorpel und Knochen erodiert³⁵. Im Gegensatz zur RA ist die Entzündungsreaktion im CIA Modell allerdings auf ca. 60 Tage limitiert³⁵.

Fettgewebe

Adipositas ist eine Krankheit, die durch teils extremes Wachstum des Fettgewebes gekennzeichnet ist. Sie ist in Industrie- und Entwicklungsländern, bei Erwachsenen als auch Kindern, weit verbreitet³⁶. Ursächlich ist eine Kombination aus evolutionärem Druck, welcher effizienten Stoffwechsel fördert, und genetischen Prädispositionen³⁷ sowie einem heutzutage günstigen und reichlich verfügbaren hochkalorischen Nahrungsangebot³⁸. Das erhöhte Körpergewicht bei Adipositas resultiert sowohl aus einer vermehrten Einlagerung von Lipiden in Adipozyten, als auch aus einer erhöhten Anzahl von Adipozyten, weshalb im Folgenden auf dieses Fettgewebe eingegangen wird³⁹.

Weißes Fettgewebe setzt sich hauptsächlich aus Adipozyten, Makrophagen, T-Zellen und anderen Immunzellen sowie prä-Adipozyten, Perizyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Mastzellen zusammen. Es kann weiter in subkutanes und viszerales Fettgewebe unterteilt werden, wobei das subkutane Fettgewebe zwar den größeren Anteil ausmacht, das viszerale aber metabolisch aktiver ist⁴⁰. Bis zur Entdeckung von Leptin wurde das Fettgewebe hauptsächlich als Energiereserve gesehen, doch inzwischen ist bekannt, dass es eine Vielzahl an bioaktiven Substanzen freisetzt, welche nicht nur den Metabolismus regulieren, sondern auch andere Körperfunktionen beeinflussen, z. B. das Immunsystem^{6, 41}. Diese Einflüsse auf das Immunsystem manifestieren sich dahingehend, dass Menschen mit Adipositas erhöhte Blutwerte haben in Bezug auf Entzündungsparameter wie TNF α , CRP, IL-6 und andere, sodass eine chronische leichte Entzündung (*chronic low-grade inflammation*) induziert wird⁴². Dieses entzündliche Milieu bewirkt unter anderem, dass vermehrt Makrophagen ins Fettgewebe einwandern und dort selbst zur wichtigsten Quelle von pro-entzündlichen Faktoren desselben werden, es entsteht also eine sich selbst antreibende Entzündung⁴². Histologisch lässt sich dies anschaulich darstellen, da die Makrophagen ringförmig um einzelne abgestorbene Adipozyten angelagert sind und sogenannte „crown-like structures“ (CLS) bilden⁴³. Die Häufigkeit von CLS (später dargestellt als das Verhältnis von CLS zu normalen Adipozyten) lässt wiederum Rückschlüsse auf die Entzündungssituation im Fettgewebe zu⁴⁴.

Die Adipozyten als zentraler Zelltyp des Fettgewebes bestehen hauptsächlich aus einer großen Fettvakuole, welche Zytoplasma und Zellkern an den Rand der Zelle verdrängt. Während der Differenzierung aus mesenchymalen Vorläuferzellen beinhalten die Zellen noch mehrere kleine Fetttröpfchen, diese schließen sich im ausgereiften Adipozyt aber zu einem großen Tropfen zusammen. Zusammengelagert bilden die Zellen oft polygonale Formen aus (Abbildung 35)⁴⁵. Das Fettgewebe ist so gut mit Blutkapillaren durchzogen, dass jeder Adipozyt mit mindestens einer in Verbindung steht⁴⁵.

Insulinresistenz

Insulin wird von den β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse gebildet und sezerniert, wenn der Glukosegehalt des Blutes ansteigt. Es fördert in der Leber und in Skelettmuskeln die Aufnahme von Glukose und die Glykogensynthese, in Adipozyten wird die Fettsynthese stimuliert⁴⁶.

Wenn Insulin an den Insulinrezeptor der Zielzelle bindet, führt dies zur Aktivierung einer komplexen Signalkaskade. Dies beinhaltet intrazellulär die Phosphorylierung des IRS Proteins (insulin receptor substrate), wodurch einerseits der PI3K-AKT (PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen; Akt: Proteinkinasen B) Signalweg aktiviert, die Aufnahme von Glukose gefördert und die Glukoneogenese unterbunden wird, und andererseits der MAPK Signalweg aktiviert wird und die Expression von Genen reguliert, welche wiederum Zellproliferation und -wachstum beeinflussen. Diese Signalwege überschneiden und kreuzen sich zum Teil mit Signalwegen der Entzündungsreaktion des Immunsystems, sodass sich hier gegenseitige Einflüsse auf molekularer Ebene ergeben⁴². Hohe Konzentrationen an Blutfetten können zu Insulinresistenz führen und verändern somit diese Signalkaskaden⁴⁷. Deshalb ist es auch nicht erstaunlich, dass die Prävalenz an Typ-II Diabetes zu erkranken, stark mit dem Maß der Fettleibigkeit einer Person korreliert⁴⁸. Im Tiermodell mit C57Bl/6 Mäusen konnte dieses vom Menschen bekannte Phänomen nachgestellt werden, indem eine sehr fetthaltige Ernährung (high-fat diet, HFD) zu Adipositas und Diabetes Typ II führt^{49, 50}.

Adipokine und Adipozytokine

Der Begriff Adipozytokine definiert sich darüber, dass er alle bioaktiven Substanzen umfasst, die vom Fettgewebe freigesetzt werden, also sowohl Adipokine als auch weitere stoffwechselaktive Substanzen wie TNF- α , die auch von anderen Gewebe- bzw. Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden können. Adipokine dagegen sind diejenigen bioaktiven Substanzen, welche vorwiegend von Adipozyten synthetisiert werden, hierzu gehören unter anderen Adiponektin, Leptin, Resistin oder Visfatin⁵¹. Diese Definitionen werden etwas verkompliziert durch die Tatsache, dass Adipokine nicht ausschließlich von Adipozyten sezerniert werden, sondern von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und sezerniert werden können⁵². Seit der Entdeckung des Leptins ist eine Vielzahl weiterer Adipokine gefunden und mehr oder weniger gut untersucht worden. Einige dieser Adipokine spielen eine Rolle bei Gelenkerkrankungen, Knochenmetabolismus oder den jeweiligen hierzu gehörigen zentralen Zelltypen, weshalb sie auch einen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Therapiekonzepte darstellen können⁵³. Oft kann bei humanen rheumatologischen Studien, sofern es sich nicht um serologische Studien handelt, nur auf Proben von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, nicht aber von gesunden Kontrollen zugegriffen werden. Dies gilt z. B. für Gewebe aus Gelenkersatzoperationen. Deshalb sollte im Rahmen dieses Projekts im Tiermodell zum einen der Vergleich zwischen Adipokinen bei der RA und OA und zum anderen der Vergleich zur gesunden Kontrolle evaluiert werden. Ziel war hierbei, genauer zu entschlüsseln, welche Veränderungen durch Entzündung und Gewebeschädigung im Allgemeinen und welche durch eine autoimmun getriebene chronische Entzündung bewirkt werden.

Adiponektin

Wegen seiner vergleichsweise hohen Serumspiegel von 0,5 – 30 µg / ml (das entspricht 0,01 % aller Plasmaproteine)⁵⁴, ist Adiponektin eines der am intensivsten untersuchten Adipokine. Es wurde von drei Arbeitsgruppen unabhängig entdeckt und erhielt dadurch zunächst drei verschiedene Namen: AdipoQ⁵⁵, apM1⁵⁶ und GBP28⁵⁷. Es liegt in verschiedenen Isoformen vor und wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren. Die Isoformen haben dabei unterschiedliche, teils gegensätzliche Effekte auf die Zielzellen⁵ und können außerdem in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich wirken⁵⁸. Adiponektin-Serumkonzentrationen sind in Maus und Mensch umgekehrt proportional zum BMI/Körpergewicht^{55, 59}. In verschiedenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass Adiponektin einer Insulinresistenz entgegenwirkt, auch wenn diese nicht komplett umgekehrt werden konnte. Dies beruht vermutlich auf einer gesteigerten β -Oxidation von Fettsäuren und einem verstärkten Energieverbrauch der Muskeln und scheint unabhängig von der Leptin-Signalkaskade zu sein⁶⁰. Diese Ergebnisse im Mausmodell wurden durch klinische Studien unterstützt, welche zeigen, dass Punktmutationen (sog. SNPs, single nucleotide polymorphisms) im Adiponektin Gen zu einem erhöhten Typ-2-Diabetesrisiko führen⁶¹. Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass Menschen mit einem höheren Adiponektinspiegel mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit an Typ 2 Diabetes erkranken⁶². Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen zeigte Adiponektin meist eine anti-entzündliche Wirkung⁶³. Im Gegensatz dazu wurden im Kontext rheumatologischer Krankheitsbilder eher pro-entzündliche Einflüsse nachgewiesen, wie z. B. die folgenden Studienergebnisse zeigen:

- RASF sezernieren nach Stimulation mit Adiponektin IL-6 und pro-MMP1⁶⁴.
- Auf mRNA-Ebene werden nach Stimulation von RASF mit Adiponektin unter anderem die Chemokine IP-10, CXCL11 und die Enzyme MMP3 und MMP10 hochreguliert. Im Rahmen der Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bestimmte Faktoren in RASF und OASF unterschiedlich stark durch Adiponektin reguliert werden⁶⁵.
- In bovinen Chondrozyten wurde gezeigt, dass Stimulation mit Adiponektin zu erhöhter Expression von IL-6-, RANTES- und MMP3-mRNA führt⁶⁵.
- In humanen Chondrozyten führte die Stimulierung mit Adiponektin zu einer erhöhten Sekretion von IL-6, GRO α , IL-8, MCP-1, proMMP-1, und MMP-3 auf Proteinebene⁶⁵.
- Osteoblasten reagieren auf Adiponektin *in vitro* mit erhöhter Expression und Sekretion von RANKL bei reduzierter Expression und Sekretion von OPG⁶⁶.

Leptin

1994 wurde Leptin als das erste Adipokin von Zhang *et al.* entdeckt. Es wird durch das *ob* Gen kodiert⁶⁷. Leptin wird hauptsächlich von Fettgewebe, bzw. subkutanem Fettgewebe, synthetisiert und sezerniert⁶⁸. Dies geschieht vor allem etwa 2 – 3 Std. nach den Mahlzeiten. Die Serumleptinspiegel korrelieren mit der Körperfettmasse und sind bei Frauen höher als bei Männern⁶. Die primäre biologische Funktion von Leptin ist die Regulation und Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauchs durch Bindung von Leptin an seinen Rezeptor, welcher im Hypothalamus stark exprimiert wird⁶⁹. Es beeinflusst aber auch andere Prozesse wie z. B. das Immunsystem, die Reproduktion, den Knochenmetabolismus und die Angiogenese⁷⁰. Eine Adipositas geht meist mit einer Hyperleptinämie bzw. Leptinresistenz einher, was zur Beeinträchtigung bzw. Fehlfunktion der Adipozyten und zur Aktivierung von Immunzellen führt⁷¹. Nicht nur die Aktivierung von Immunzellen beinhaltet eine Verbindung zwischen diesem Adipokin und Entzündungsvorgängen. Es wurde auch

gezeigt, dass CRP (C-reaktives Protein), ein Serumprotein und Entzündungsmarker, an Leptin bindet und dessen Fähigkeit, STAT3 und PI3K zu aktivieren, inhibiert⁷².

Der Leptinrezeptor existiert in verschiedenen Formen, unter anderem einer löslichen Form, einer membrangebundenen Form, welche allerdings keine zytoplasmatische Domäne hat, und einer längeren Form mit zytoplasmatischer Domäne. Letztere ist scheinbar die häufigste und auch die einzige, für welche eine Signalweiterleitung an die Zielzelle nachgewiesen werden konnte^{73, 74}. Wenn Leptin an seinen Rezeptor bindet, kann JAK2 an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors binden und sich selbst und STAT3 phosphorylieren^{75, 76}. Der JAK-STAT-Signalweg ist sehr gut untersucht und aktuell sehr präsent in der rheumatologischen Forschung, da einige neuere Medikamente wie z. B. Tofacitinib und Baricitinib in diesen Signalweg eingreifen und ihn inhibieren. Dabei stellte sich heraus, dass diese Medikamente in klinischen Studien auch metabolische Parameter beeinflussen⁷⁷. Ob und inwiefern dies mit dem Signalweg von Leptin zusammenhängt, ist bisher nicht genauer bekannt. Es wurde bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass Leptin nicht nur im Gelenk vorhanden ist⁴¹, sondern auch Auswirkungen auf Zelltypen hat, die im rheumatologischen Kontext eine Rolle spielen:

- *In vitro* exprimieren und sezernieren humane Osteoblasten Leptin. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass durch Leptin die Matrixmineralisierung durch die Osteoblasten verstärkt wird⁷⁸.
- Humane Chondrozyten in nativem Knorpel exprimieren die lange Form des Leptinrezeptors. Bei Stimulation mit Leptin proliferieren die Chondrozyten *in vitro* schneller und reagieren mit gesteigerter Matrixproduktion⁷⁹.
- Ob die Wirkung von Leptin auf Chondrozyten eher anabol oder katabol ist, wird in der Literatur diskutiert. Eine Studie zeigt z. B. die anabole und dadurch protektive Wirkung in murinen Chondrozyten⁸⁰, während eine andere Studie eher katabole Effekte durch erhöhte Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase und daraus resultierende erhöhte Stickstoffmonoxid-Produktion nachwies⁸¹.
- Ebenfalls katabole Wirkung von Leptin auf Knorpel wurde in Ratten gezeigt, wobei intraartikulär injiziertes Leptin zur erhöhten Synthese von MMP-2, MMP-9, Kathepsin D und Kollagen Typ-II führte, während die Synthese von bFGF (basic fibroblast growth factor) reduziert wurde⁸².
- In NK-Zellen zeigen *in vitro* Studien unterschiedliche Ergebnisse, abhängig davon, ob über kurze oder lange Zeiträume mit Leptin stimuliert wurde. Dies entspricht der These, dass Zellen eine Leptinresistenz entwickeln⁴¹.
- Bei adipösen Menschen wurde im Blut eine reduzierte Zahl an NK-Zellen nachgewiesen, verglichen mit der schlanken Kontrollgruppe. Die NK-Zellen der adipösen Menschen zeigten hier außerdem Veränderungen in ihrer Reaktion auf *in vitro* Stimulation mit Leptin⁸³.
- Auch Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen, Dendritische Zellen, Neutrophile, Eosinophile und Basophile exprimieren Leptinrezeptoren und können auf Leptin reagieren⁴¹.

Insgesamt wird die Rolle von Leptin im Kontext der Rheumatologie kontrovers diskutiert⁸⁴. Insbesondere, ob Leptin abhängig vom Krankheitsstadium unterschiedlich reguliert ist oder wirkt und ob systemisch und lokal im Gelenk ähnliche oder gegenläufige Regulationen zu beobachten sind. Leptin wird Desweiteren auch als Bindeglied zwischen Neuroendokrinologie und Immunsystem mit Einfluss auf die „sickness behavior“ diskutiert⁸⁵.

Visfatin

Visfatin ist auch unter den Namen „nicotinamide phosphoribosyltransferase“ (NAMPTase oder Nampt)⁸⁶ oder „pre-B cell colony-enhancing factor 1“ (PBEF1)⁸⁷ bekannt. Intrazelluläres Visfatin trägt durch seine Enzymaktivität zur Regulation der intrazellulären Menge des wichtigen Koenzyms NAD (Nicotinamidadeninucleotid) bei⁸⁸. Es wurde gezeigt, dass Visfatin insulinmimetische Wirkungen hat und mit der Menge an viszeralem Fett korreliert, daher auch der Name Visfatin (*viszeral fat*). Die namensgebende Publikation wurde zwar inzwischen zurückgezogen, der Name bleibt jedoch bestehen⁸⁹. Es wird heute davon ausgegangen, dass Visfatin weder mit der Menge des viszeralen Fettes korreliert, noch insulinmimetisch wirkt, vielmehr ist seine intrazelluläre enzymatische Aktivität für die NAD Biosynthese und damit für die Insulin produzierenden β -Zellen wichtig⁹⁰. Hochkalorische Ernährung und Alterungsprozesse reduzieren allerdings (in Mäusen) die Enzymaktivität von Visfatin und könnten somit zur Pathogenese von Typ-II-Diabetes beitragen⁹¹.

Ebenso wie für die vorher besprochenen Adipokine, wurde für Visfatin gezeigt, dass es im Kontext von Gelenkerkrankungen verschiedene Einflüsse besitzt:

- Visfatin ist in der Synovialflüssigkeit von OA und RA Patienten vorhanden und wird nicht nur von Adipozyten, sondern auch von Zellen der Synovialmembran, Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert⁹².
- In RASF wird die Expression von Visfatin STAT3 abhängig durch IL-6 reguliert. Diese Ergebnisse konnten im Tierversuch bestätigt werden⁹³.
- Visfatin induziert in humanen OASF die Expression und Sekretion von IL-6 und TNF- α über den MAPK Signalweg⁹⁴.
- In Osteophyten konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten Visfatin synthetisieren können. Die Studie zeigt außerdem *in vitro* eine erhöhte Produktion pro-entzündlicher Faktoren von Chondrozyten als Reaktion auf einen Visfatinstimulus⁹⁵.
- Visfatin verstärkt die Bildung von pre-B-Zell-Kolonien, diese Eigenschaft war ausschlaggebend für den Namen PBEF⁸⁷.
- Visfatin inhibiert die Apoptose von Neutrophilen *in vitro* im entzündlichen Kontext⁹⁶.

Fragestellung

Im murinen Tiermodell sollte primär untersucht werden, wie der Verlauf einer RA bzw. OA unter Hochfett-Diät(HFD) bzw. normaler Diät (ND) verläuft. Hierbei sollte insbesondere untersucht werden, inwiefern die Adipozytokine Adiponektin, Leptin und Visfatin sowohl systemisch als auch lokal im Gelenk exprimiert werden. Es sollte daneben ausgearbeitet werden, ob das Vorhandensein von Adipozytokinen vom Stadium der OA oder RA abhängt und wenn ja, ob dies bei allen drei Adipozytokinen gleichermaßen ausgeprägt. In vivo sollte untersucht werden, in welchem Kompartiment in welchem Krankheitsstadium welche Adipokine exprimiert werden und welche Zellen kolokalisiert sind. Durch Korrelationsanalysen sollte nachfolgend bestimmt werden, welche Versuchsparameter miteinander assoziiert sind, d.h. inwiefern der Metabolismus den Verlauf der OA bzw. RA beeinflusst.

Da klinische Studien zum Teil sehr widersprüchliche Wirkungen der Adipozytokine, insbesondere des Adiponektins beschrieben^{51, 63} sollten im Rahmen der Experimente auch mögliche Gründe hierfür evaluiert werden.

Material

Reagenzien

- Albumin Fraktion V (BSA), biotinfrei, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Collagen from chicken sternal cartilage, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Cat#C9301-25G
- Entellan (Microscopy Entellan[®], Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie), Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Essigsäure, Rotipuran[®] 100 %, p.a., Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol vergällt, ≥ 99,8 %, mit ca. 1 % MEK, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Fast-Green FCF, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Fetal Bovine Serum (FCS), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Freund's Adjuvant, Incomplete, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Cat#F5506 6 x 10 ml
- Formaldehyd 37 %, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Hühnerserum, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Kat. Nr.: C5405
- Kaisers Glyceringelatine, Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Narkosedikation für C57Bl/6 Mäuse Ketamin:Xylazin:NaCl im Verhältnis 1:1:2
- Milchpulver Blotting grade, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- M. tuberculosis H37RA, BD (Franklin Lakes, USA)
- Proteinase K-Lösung (Rnase frei), PeqLab (Erlangen, Deutschland)
- Safranin-O für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Trichrome stain-Kit, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Triton[®] X 100, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Veet Enthaarungscreme, Reckitt Benckiser (Slough, Vereinigtes Königreich)
- Wasserstoffperoxid 30 % (H₂O₂), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (Isomere) >98 %, rein, für die Histologie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Antikörper

- Mouse Adiponectin/Acrp30 Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Goat IgG, Katalog Nummer: AF1119, Lot: GQD0513081, R&D Systems (Minneapolis, USA)
- RAT ANTI MOUSE F4/80 (Cl:A3-1), purified Monoclonal Antibody, Kat. Nr.: MCA497R, Lot: H1412, abdserotec
- normal goat IgG, Kat. Nr.: sc-2028, Lot: H2813, Santa Cruz Biotechnology, INC. (Dallas, Texas, USA)
- N-Histofine[®] Simple Stain MAX PO (G) anti-goat, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414162F, Lot: H1603
- N-Histofine[®] Simple Stain MAX PO (G) anti-rabbit, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414341F, Lot: H1508
- N-Histofine[®] Simple Stain MAX PO (G) anti-rat, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414311F, Lot: H1511-1
- Anti-Leptin antibody, abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich), Kat. Nr.: ab3583, Lot: GR186176-15

- RAT IgG2b NEGATIVE CONTROL, abdsertec, Kat. Nr.: MCA1125, Lot: GR261813-1
- Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction, Dako (Santa Clara, USA), Kat. Nr.: X0936, Lot: 00010830
- Purified Rat IgG2a κ Isotype Control, BD Pharmingen (San Diego, USA), Kat. Nr.: 559073, Lot: 34872
- Monoclonal Antibody to CD68, Acris (Herford, Deutschland), Kat. Nr.: SM1550PS, Lot: 1602
- Collagen, Type X (COL10) Antikörper, Abbiotec (San Diego, USA), Kat. Nr.: ABIN1584273, Lot: 17081118
- CD45 Antibody (30-F11), Novusbio (Centennial, USA), Kat. Nr.: NB100-77417, Lot: B-4
- vimentin antibody, R&D Systems (Minneapolis, USA), Kat. Nr.: MAB2105, Lot: UUQ0212051

Kits

- AEC Peroxidase Substrate Kit; Kat. Nr. SK-4200, Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- Visfatin (NAMPT) Mouse/Rat ELISA, BioVendor (Heidelberg, Deutschland), Kat. Nr. RAG009R, Lot 1. ELISA Kits: X15-113, Lot 2. ELISA Kits: X16-150
- Quantikine ELISA Mouse IL-6, R&D (Minneapolis, USA), Kat. Nr.: M6000B, Lot: 337305
- Quantikine ELISA Mouse Adiponectin/Acrp30, R&D (Minneapolis, USA), Kat. Nr.: MRP300
- Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin; R&D (Minneapolis, USA); Kat. Nr.: MOB00
- Quantikine ELISA Mouse C-Reactive Protein/CRP, R&D (Minneapolis, USA), Kat. Nr. MCPP00, Lot: P165855

Puffer und Lösungen

- Citrat puffer (10mM Citrat, 0,05 % Tween20, pH 6)
- PBS 10x (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄*2H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; mit NaOH und HCl pH 7,4; mit dH₂O auf 100 ml auffüllen)
- PBST (1 l 1 x PBS; 1 ml Tween-20)
- Proteinase K: 2,5 μ l Proteinase K Stock 20 mg / ml + 250 μ l 1M Tris (pH 8) + 50 μ l 0,5M NaEDTA (pH 8)
- Hämalaun:
 - 1 g Hämatoxylin (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
 - 1 l H₂O
 - 0,2 g Natriumjodat NaJO₃ (Sodium iodate, Minimum 99 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
 - 50 g Kalilaun (Kaliumaluminiumsulfat)
 - (Aluminium potassium sulfate dodecahydrate, Minimum 98,0 %, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
 - vollständig lösen
 - 50 g Chloralhydrat, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
 - 1 g Citric acid monohydrate , Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Eosin:
 - 10 g Eosin G (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
 - 1 l H₂O
 - vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure in die Küvette geben
- NaEDTA-Lösung (20 %):

100 g EDTA-Dinatriumsalz
400 ml Millipore
mit NaOH-Plätzchen pH 7,4 (rühren + erhitzen)
mit Millipore Wasser auf 500 ml auffüllen

- Weigert'sche Lösung

Lösung A:

1 g Hämatoxylin (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
100 ml 95 % Ethanol

Lösung B:

4 ml 29 % Eisen-III-chlorid-Hexahydrate (Roth) in H₂O
95 ml dH₂O
1 ml konz. Salzsäure (≥32 %, p.a. ISO, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
1:1 Mischung, stabil für ca.4 Wochen

Gefäße und Materialien

- BD Microtainer SST tubes
- Deckgläser 20 x 20 mm, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Deckgläser 25 x 50 mm, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Einbettkassetten, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Eppendorf Safe lock tubes 1,5 ml, Neolab (Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorf Safe lock tubes 2 ml, Neolab (Heidelberg, Deutschland)
- Färbegestell, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Färbekasten mit Deckel, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Objektträger Superfrost plus 25 x 75 mm, Langenbrinck
- Pap Pen Immunostaining Pen, G. Kisker (Steinfurt, Deutschland)
- PP-Röhrchen steril 50 ml, Greiner (Kremsmünster, Österreich)
- PP-Röhrchen steril 15 ml, Greiner (Kremsmünster, Österreich)
- Roti®-Plast (Paraffin Pastillen), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Stripette 5 ml, Corning (Corning, USA)
- Stripette 10 ml, Corning (Corning, USA)
- Stripette 25 ml, Corning (Corning, USA)

Geräte

- Sunrise-basic Tecan (Tecan Austria GmbH)
- Cryostat: CM5050S (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Rotationsmikrotom: Microm HM340E (ThermoScientific, Waltham, USA) mit Section Transfer System (ThermoScientific, Waltham, USA)

Software

- Magellan V. 7.2 (©1998-2016 Tecan Austria GmbH)
- Graph Pad Prism
- Microsoft Office

Methoden

Mäuse

Verwendet wurden männliche C57Bl/6 Mäuse. Diese wurden im Alter von 10 Wochen aus dem Franz-Penzoldt-Zentrum bezogen und im Tierstall von Frau Prof. Dr. rer. nat. Aline Bozec (Universität Erlangen) für den weiteren Versuchsverlauf gehalten. Tierversuche wurden vom örtlichen Ethikausschuss genehmigt unter der Protokollnummer 54-2532.1-44/12. Ermöglicht wurde dies durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des METARTHROSE (Projekt 01EC140B) als eine Kooperation mit der Universität Erlangen und dort im Speziellen Herrn Prof. Dr. med. Georg Schett und Frau Prof. Dr. rer. nat. Aline Bozec.

Futter:

- HFD (high-fat diet): D12331 von ResearchDiets, USA
- ND (normal diet): D12329 von ResearchDiets, USA

Induktion einer Adipositas durch HFD

Mit den im Folgenden beschriebenen Tiermodellen sollte experimentell simuliert werden, wie adipöse Menschen im Vergleich zu Personen mit gesundem Körpergewicht eine OA oder RA entwickeln. Hierfür wurde eine HFD mit 58 % Fettgehalt verwendet, hauptsächlich bestehend aus gesättigten Fettsäuren. Zunächst wurden die Tiere ab einem Alter von 10 Wochen für einen Zeitraum von drei Monaten mit HFD oder passender ND gefüttert. Dieser Zeitraum ist bei diesem speziellen Futter ausreichend, um bei C57Bl/6 Mäusen eine Gewichtszunahme und metabolische Veränderungen zu etablieren, und wurde gewählt, um die metabolischen Veränderungen abzuschließen, bevor OA bzw. RA induziert wurden. Die Tiere entwickelten nach der Induktion der jeweils „zweiten“ Erkrankung (RA oder OA) weiterhin die HFD bzw. ND.

Induktion einer Arthrose durch Destabilisierung der medialen Menisci

Nach etablierter Adipositas durch die HFD wurde die Arthrose operativ durch Destabilisierung des Meniskus induziert, wie bereits von Glasson *et al.* beschrieben²⁷. Hierbei wurden die Mäuse zunächst mit 100 µl der Narkosemischung (ketamin:xylazin:NaCl) intraperitoneal narkotisiert. Den Tieren wurde dann mit einem Langhaarschneider das Fell der Hinterbeine vorsichtig soweit möglich entfernt und anschließend rund um den OP-Bereich mit Veet-Enthaarungscreme und handelsüblichen Wattestäbchen das verbliebene Fell vorsichtig entfernt.

DMM Modell in C57Bl/6

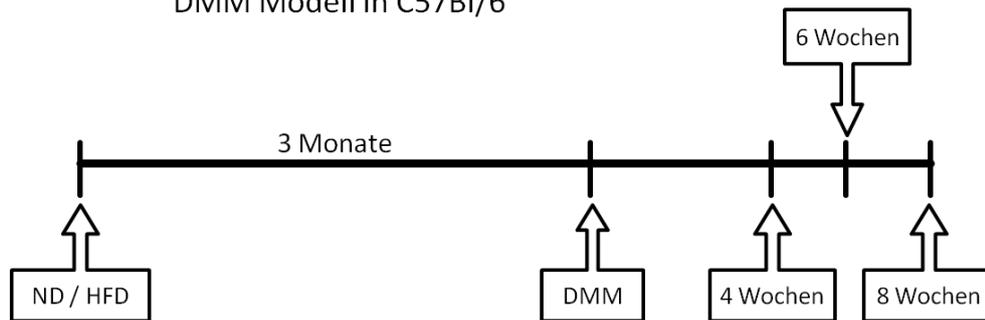


Abbildung 3: Zeitverlauf der Kombination von HFD mit dem DMM-Modell in C57Bl/6 Mäusen. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass bei der Versuchsplanung davon ausgegangen werden konnte, dass zum Zeitpunkt der DMM-Operation bereits ein deutliches Übergewicht durch die Diät induziert war und die Zeitpunkte der Nekropsie möglichst ein frühes, ein mittleres und ein schweres bzw. spätes Stadium der Arthrose darstellen.

Hieraus ergaben sich folgende Tiergruppen:

Tabelle 1: Übersicht der Behandlungsgruppen im DMM-Experiment an C57Bl/6 Mäusen.

| Gruppe | Zeitraum zwischen OP und Nekropsie | Futter | DMM | Anzahl der Tiere bei Nekropsie |
|--------|------------------------------------|--------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 4 | HFD | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 2 | 4 | ND | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 3 | 4 | HFD | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 10 |
| 4 | 4 | ND | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 10 |
| 5 | 6 | HFD | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 6 | 6 | ND | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 7 | 6 | HFD | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 7 |
| 8 | 6 | ND | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 10 |
| 9 | 8 | HFD | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 10 | 8 | ND | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 11 | 8 | HFD | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 10 |
| 12 | 8 | ND | rechtes Bein DMM, linkes Bein sham | 10 |

Die Gruppeneinteilung ermöglichte, dass beim Vergleich der Gewebe sowohl zwischen sham-OP und DMM-OP im selben Tier verglichen werden konnte und somit der OP-Effekt, sofern vorhanden, sichtbar wurde. Außerdem konnte lokal im Gewebe auch mit unbehandelten Tieren mit der entsprechenden Diät verglichen werden. Systemisch, also im Serum, konnte zwischen operierten und nicht operierten Tieren mit den jeweiligen Diäten verglichen werden. Da bei jeder operierten Maus sowohl ein Bein mit DMM- und eines mit sham-OP zur Analyse zur Verfügung stand, konnte nicht zwischen DMM- und sham-Gruppen unterschieden werden.

Vier, sechs und acht Wochen (Abbildung 3) nach OP wurden die Tiere getötet und folgende Gewebe entnommen:

Tabelle 2: Übersicht aller entnommener Gewebe von C57Bl/6 Mäusen

| Formalinfixiert und in Paraffin | In Tissue Tek |
|----------------------------------|---|
| Knie mit Ober- und Unterschenkel | Lymphknoten |
| Epididymales Fettgewebe | Leber |
| Leber | Milz |
| Milz | Von ca. 1/3 der Tiere außerdem: - Lunge - Herz - Niere |
| Von 12 Tieren das Gehirn | |

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6 Mäusen

Für die CIA wurden männliche C57Bl/6 Mäuse im Alter von ca. 10 Wochen zunächst für 3 Monate mit HFD oder ND gefüttert, bevor die erste Immunisierung durchgeführt wurde (Abbildung 4).

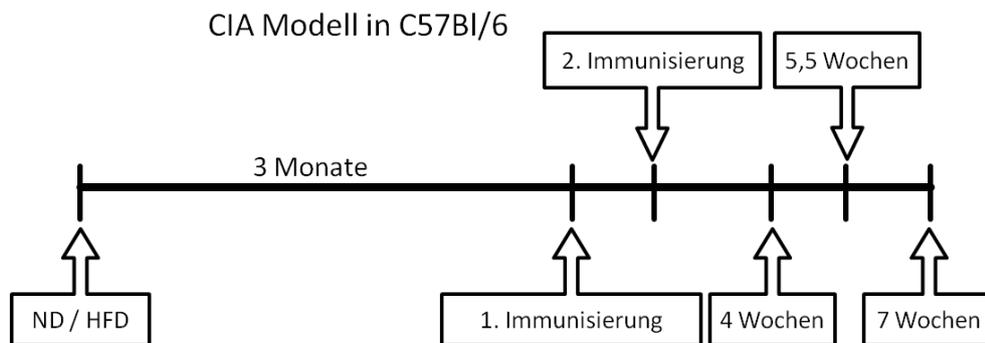


Abbildung 4: Zeitverlauf der Kombination von HFD mit dem CIA-Modell in C57Bl/6 Mäusen. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass bei der Versuchsplanung davon ausgegangen werden konnte, dass zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung bereits ein deutliches Übergewicht durch die Diät induziert war und die Zeitpunkte der Nekropsie möglichst ein frühes-, ein mittleres- und ein schweres- bzw. spätes Stadium der Arthritis darstellen.

Die Immunisierungen wurden wie folgt durchgeführt⁹⁷:

1) Herstellung der Kollagen-Verdünnung:

5 mg Hühnerkollagen Typ II (Produktnr.: C 9301, Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)) wurden in 1,25 ml 10 mM Essigsäure über Nacht bei 4 °C rollend resuspendiert. So erhielt man eine Lösung 4 mg Kollagen pro ml Essigsäure. Diese Lösung konnte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2) Herstellung des kompletten Freundschens Adjuvans (CFA):

10 ml Freund's Adjuvant wurden mit 50 mg hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* versetzt (Endkonzentration 5 mg / ml). Diese Lösung konnte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3) Erste Immunisierung (Tag 0):

500 µl der Kollagen-Verdünnung (aus Schritt 1) werden mit 500 µl CFA (aus Schritt 2) in ein 1,5 ml Gefäß gegeben und durch Ultraschall 3 mal 20 Sek gemischt. Zwischen den Mischschritten wurde jeweils auf Eis gekühlt.

Von dieser Emulsion werden je Maus 100 µl subkutan in die Schwanzwurzel injiziert.

4) Zweite Immunisierung (Tag 21):

Wie erste Immunisierung.

Die Progression der CIA wurde ab Tag 28 wie folgt von Yubin Luo gemessen⁹⁷:

0 – keine Rötungen oder Schwellungen

1 – Rötung und leichte Schwellung, beschränkt auf Fußwurzel oder Knöchel

2 – Rötung und leichte Schwellung von Knöchel bis Fußwurzel

3 – Rötung und mäßige Schwellung von Knöchel bis Mittelfußknochen

4 – Rötung und starke Schwellung, die den Knöchel und den Fuß bis zu den Zehen umfasst und/oder Versteifung der Gelenke.

Tabelle 3: Übersicht der Behandlungsgruppen im CIA-Experiment an C57Bl/6 Mäusen

| Gruppe | Zeitraum zwischen 1. Immunisierung und Nekropsie | Futter | CIA | Anzahl der Tiere bei Nekropsie |
|---------------|---|---------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1 | 4 | HFD | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 2 | 4 | ND | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 3 | 4 | HFD | CIA induziert | 10 |
| 4 | 4 | ND | CIA induziert | 9 |
| 5 | 5,5 | HFD | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 6 | 5,5 | ND | Gesunde Kontrolle | 3 |
| 7 | 5,5 | HFD | CIA induziert | 10 |
| 8 | 5,5 | ND | CIA induziert | 10 |
| 9 | 7 | HFD | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 10 | 7 | ND | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 11 | 7 | HFD | CIA induziert | 10 |
| 12 | 7 | ND | CIA induziert | 8 |

Vier, fünfzehn und sieben Wochen (Abbildung 4) nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere getötet und die gleichen Gewebe wie in Tabelle 2 für das DMM-Modell aufgelistet entnommen.

Die Tiere, welche als Kontrollen verwendet wurden, erhielten ausschließlich die Diäten aber keine Immunisierungen.

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1JRj Mäusen

(Durchführung der Tierversuche durch die Firma Aurigon, Budapest, Ungarn)

Für die CIA wurden männliche DBA/1JRj Mäuse im Alter von 3 – 4 Wochen verwendet. Zunächst wurden die Tiere über sechs Wochen mit HFD bzw. ND gefüttert, bevor die erste Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II und CFA durchgeführt wurde. Der Tag der ersten Immunisierung wurde als Tag 0 definiert und eine zweite Immunisierung an Tag 21 durchgeführt (Abbildung 5).

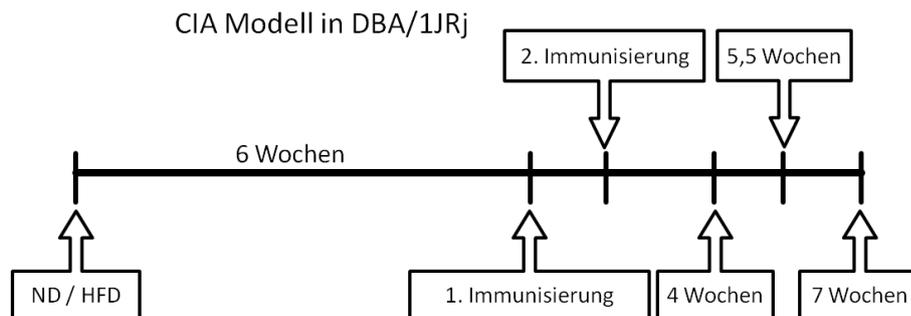


Abbildung 5: Zeitverlauf der Kombination von HFD mit dem CIA-Modell in DBA/1Rj Mäusen. Die Dauer der Fütterung wurde im Vergleich zu den Modellen in C57Bl/6 verkürzt, mit dem Ziel, die Inzidenz der Gelenkveränderungen zu steigern. Trotzdem sollte auch hier das Übergewicht vor der ersten Immunisierung bestehen und die Nekropsien verschiedene Arthritisstadien abdecken.

Vor der ersten Immunisierung wurden die Tiere in 12 Gruppen unterteilt wie in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht der Behandlungsgruppen im CIA-Experiment an DBA/1 Mäusen

| Gruppe | Zeitraum zwischen 1. Immunisierung und Nekropsie | Futter | CIA | Anzahl der Tiere bei Nekropsie |
|--------|--|--------|-------------------|--------------------------------|
| 1 | 4 | HFD | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 2 | 4 | ND | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 3 | 4 | HFD | CIA induziert | 7 |
| 4 | 4 | ND | CIA induziert | 7 |
| 5 | 5,5 | HFD | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 6 | 5,5 | ND | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 7 | 5,5 | HFD | CIA induziert | 9 |
| 8 | 5,5 | ND | CIA induziert | 10 |
| 9 | 7 | HFD | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 10 | 7 | ND | Gesunde Kontrolle | 4 |
| 11 | 7 | HFD | CIA induziert | 15 |
| 12 | 7 | ND | CIA induziert | 15 |

Bei der Nekropsie wurden durch die Firma Aurigon Plasmaproben entnommen und bei -80 °C bis zum Versand auf Trockeneis an unser Forschungslabor gelagert. Analysen der Plasmaproben wurden durch mich und Frau Schreyäck (Biologisch-technische Assistentin) durchgeführt.

Des Weiteren wurden die Knie der Hinterbeine, Lymphknoten, Leber und Fettgewebe durch die Firma Aurigon, wenn nötig, entkalkt, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden an unser Labor bei Raumtemperatur versandt. Auch hier erfolgten alle weiteren Analysen in unserem Labor.

ELISA

Für alle ELISAs wurden fertige Kits nach den jeweiligen Herstellerangaben verwendet. Die Proben wurden im empfohlenen Puffer verdünnt, sofern sie höher konzentriert waren als der höchste Standard.

Histologische Färbungen

HE-Färbung

- 2 x 10 min Xylol
- je 10 min 100 %, 96 % EtOH
- je 5 min 80 %, 70 %, 50 % EtOH
- 5 min PBS
- 7 – 10 min Hämalaun
- in H₂O waschen
- 7 – 10 min Eosin
- in H₂O waschen
- je 5 min 50 %, 70 %, 96 %, 100 % EtOH
- 3 x 5 min Xylol
- eindeckeln mit Entellan

Masson-Goldner-Färbung

- Entparaffinieren
 - 2 x 10 min Xylol
 - je 10 min 100 %, 96 % EtOH
 - je 5 min 80 %, 70 %, 50 % EtOH
 - 2 min H₂O
- 5 min Weigert´s Reagenz (Verhältnis Lösung A:B = 1:1)
- 5 min warmes, fließendes H₂O + 5 min warmes H₂O
- 1 min d H₂O
- 15 min Bieberich Scarlet-Acid-Fuchsin (Trichrome Stain Kit)
- 1 min H₂O + 2 min fließendes H₂O
- 15 min Phosphomolybdic Acid / Phosphotungstic Acid-Lösung / H₂O (Verhältnis 1:1:2) (Trichrome stain-Kit)
- 20 min Anilin-Blau (Trichrome Stain Kit)
- 5 min 1 % Essigsäure

- 1 min H₂O + 2 min fließendes H₂O
- je 2 x 2 min 96 %, 100 % EtOH
- 2 x 2 min Xylol
- eindeckeln mit Entellan

Safranin-O-Färbung

- Entparaffinieren:
 - 2 x 10 min Xylol
 - je 10 min 100 %, 96 % EtOH
 - je 5 min 80 %, 70 %, 50% EtOH
 - 5 min H₂O
- 5 min Weigert'sche Lösung
- 3 x 5 min H₂O
- 5 min 0,001 % Fast-Green
- 15 s 1 % Essigsäure
- 9 min 0,5 % Safranin-O
- je 2 x 2 min 96 %, 100 % Ethanol
- 2 x 2 min Xylol
- eindeckeln mit Entellan

Toluidinblau-Färbung

- Entparaffinieren:
 - 2 x 5 min Xylol
 - je 5 min 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 % EtOH
 - 5 min H₂O
- ca. 20 Sek. 0,5 % Toluidinblau in dH₂O
- 3 x in H₂O je ca. 10 mal kurz eintauchen
- kurz in 96 % EtOH ca. 5 – 10 mal eintauchen
- 2 x 10 Sek. in Xylol
- eindeckeln mit Entellan

Immunohistochemische Färbungen

Adiponektin-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|-----------------|-----------------------|---------------|------------|------------|
| 1. Antikörper | Adiponektin (Maus) | 0,2 mg/ml | 1:100 | AF1119 |
| Isotypkontrolle | Ziege IgG | 0,4 mg/ml | 1:200 | Sc-2028 |

- Entparaffinieren:
2 x 5 min Xylol
je 5 min 100 %, 96 %, 70 % EtOH
2 x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Puffer gefüllte Küvette im Wasserbad in der Mikrowelle)
Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
30 min abkühlen lassen bei RT
2 x 2 min dH₂O
5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
8 min Methanol + 3 % H₂O₂
5 min dH₂O
5 min PBS
- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
45 min 10 % BSA, 10 % FCS, 10 % Hühnerserum
- Erster Antikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht in 1 % BSA bei 4 °C
- 2 x 5 min PBS + 0,3 % Triton-X100
- 1 x 5 min PBS
- 30 min Histofine anti-goat
- 2 x 5 min PBS + 0,3 % Triton-X100
- 1 x 5 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindeckeln mit Glyceringelatine (diese vorher im Wasserbad leicht erwärmen)

CD45-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|-------------|---------------|------------|------------|
| 1. Antikörper | CD45 (Maus) | 0,5 mg/ml | 1:100 | 11-0451-82 |
| Isotypkontrolle | Ratte IgG2b | 1 mg/ml | 1:50 | MCA1125 |

- Entparaffinieren:
2 x 5 min Xylol
je 5 min 100 %, 96 %, 70 % EtOH
2 x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Puffer-gefüllte Küvette im Wasserbad in der Mikrowelle)
Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
30 min abkühlen lassen bei RT
2 x 2 min dH₂O
5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:

10 min Methanol + 3 % H₂O₂

2 x 5 min PBS

- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
60 min 5 % BSA
- Erster Antikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht in 5 % BSA bei 4 °C
- 2 x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rat
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)

Eindeckeln mit Glyceringelatine (diese vorher im Wasserbad leicht erwärmen)

CD68-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|-------------|---------------|------------|------------|
| 2. Antikörper | CD68 (Maus) | 1 mg/ml | 1:500 | SM1550PS |
| Isotypkontrolle | Ratte IgG2a | 0,5 g/l | 1:250 | 559073 |

- Entparaffinieren:
2 x 5 min Xylol
je 5 min 100 %, 96 %, 70 % EtOH
2 x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Puffer gefüllte Küvette im Wasserbad in der Mikrowelle)
Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
30 min abkühlen lassen bei RT
3 x 5 min dH₂O
5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
10 min Methanol + 3 % H₂O₂
2 x 5 min PBS
- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
60 min 5 % Milchpulver
- Erster Antikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht in 5 % Milchpulver bei 4 °C
- 2 x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rat
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindeckeln mit Glyceringelatine (diese vorher im Wasserbad leicht erwärmen)

F4/80-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|--------------|---------------|------------|------------|
| 3. Antikörper | F4/80 (Maus) | 1 mg/ml | 1:100 | MCA497R |
| Isotypkontrolle | Ratte IgG2b | 1 mg/ml | 1:100 | MCA1125 |

Das verwendete Protokoll entspricht dem des Kollagen CD45-Antikörpers.

Kollagen X-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|-----------------|---------------|------------|-------------|
| 4. Antikörper | Kollagen (Maus) | X 1 mg/ml | 1:250 | ABIN1584273 |
| Isotypkontrolle | Kaninchen IgG | 15 g/l | 1:3700 | X0936 |

- Entparaffinieren:
 - 2 x 5 min Xylol
 - je 5 min 100 %, 96 %, 70 % EtOH
 - 2 x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
 - Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Puffer gefüllte Küvette im Wasserbad in der Mikrowelle)
 - Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
 - 30 min abkühlen lassen bei RT
 - 2 x 2 min dH₂O
 - 5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
 - 10 min Methanol + 3 % H₂O₂
 - 2 x 5 min PBS
- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
 - 60 min 5 % BSA
- Erster Antikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht in 5 % BSA bei 4 °C
- 2 x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rabbit
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindeckeln mit Glyceringelatine (diese vorher im Wasserbad leicht erwärmen)

Leptin-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|---------------|---------------|------------|------------|
| 1. Antikörper | Leptin (Maus) | 2 mg/ml | 1:285 | ab3583 |
| Isotypkontrolle | Kaninchen IgG | 0,4 mg/ml | 1:30 | ab27478 |

- Entparaffinieren:
2 x 5 min Xylol
je 5 min 100 %, 96 %, 70 % EtOH
2 x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
5 min Proteinase K bei 37 °C
5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
10 min Methanol + 3 % H₂O₂
2 x 5 min PBS
- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
60 min 5 % BSA
- Erster Antikörper bzw. Isotypkontrolle über Nacht in 5 % BSA bei 4 °C
- 2 x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rabbit
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindeckeln mit Glyceringelatine (diese vorher im Wasserbad leicht erwärmen)

Visfatin-Färbung von Paraffinschnitten

| | Spezifität | Konzentration | Verdünnung | Katalognr. |
|------------------------|-----------------|---------------|------------|------------|
| 5. Antikörper | Visfatin (Maus) | 0,2 mg/ml | 1:100 | sc67020 |
| Isotypkontrolle | Kaninchen IgG | 15 g/l | 1:7500 | X0936 |

Das verwendete Protokoll entspricht dem des Kollagen X-Antikörpers.

Histologische Beurteilungen (Scoring)

Durch den Leber-Score wurde bemessen, wie groß der Anteil der Hepatozyten ist, welche Fettvakuolen gebildet haben (Methode nach Gilat *et al.*⁹⁸).

Für den Tibia-Score wurde wie durch Glasson *et al.*⁹⁹ beschrieben die Gelenkschädigung in sechs Schweregrade unterteilt (Tabelle 5). Dabei wurden histologische Safranin-O und H/E Färbungen als Grundlage für den Score verwendet.

Tabelle 5: OA-Score modifiziert nach Glasson *et al.*

| Schweregrad | Definition |
|-------------|---|
| 0 | Keine Knorpelveränderung |
| 0,5 | Veränderung der Safranin-O Färbung ohne strukturelle Schäden |
| 1 | Leichte oberflächliche Knorpelveränderungen (z. B. einzelne Fasern oberflächlich) |
| 2 | Vertikale Spalten nur innerhalb der obersten Knorpelschicht |
| 3 | Vertikale Spalten und Erosionen bis in den kalzifizierten Knorpel, max. 25 % der Gelenksoberfläche betroffen. |
| 4 | Vertikale Spalten und Erosionen bis in den kalzifizierten Knorpel, 25 – 50 % der Gelenksoberfläche betroffen. |
| 5 | Vertikale Spalten und Erosionen bis in den kalzifizierten Knorpel, 50 – 75 % der Gelenksoberfläche betroffen. |
| 6 | Vertikale Spalten und Erosionen bis in den kalzifizierten Knorpel, max. 75 – 100 % der Gelenksoberfläche betroffen. |

Der CIA-Score (siehe S. 28) beschreibt den klinischen Verlauf der arthritischen Veränderungen und wurde in Anlehnung an den von Meng *et al.*⁹⁷ beschriebenen Score angewendet.

Statistische Auswertungen

Der Vergleich der CIA-Scores in DBA/1Rj Mäusen zwischen HFD und ND Gruppen wurde mittels ungepaartem, parametrischem Mann-Whitney-Test durchgeführt (Abbildung 12).

Der Vergleich des Körpergewichts zwischen HFD und ND DBA/1Rj Mäusen wurde mittels ungepaartem, parametrischem t-Test mit Welch's Korrektur durchgeführt (Abbildung 13).

ELISA-Daten wurden mittels einfaktoriellem ANOVA und anschließendem multiplem Tukey's Vergleichstest mit einer einzelnen zusammengefassten Varianz ausgewertet.

Ergebnisse

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6 Mäusen

Das Arthritis-Modell war so aufgebaut, dass zum Tag 0 und 21 immunisiert wurde. Ab Tag 28 wurden die Tiere drei Mal pro Woche untersucht, wobei der Durchmesser der Sprunggelenke und die Dicke der Pfoten als gemessene Parameter und außerdem der Arthritis-Score als Maß für den Verlauf dienten.

Die Tiere, welche vier Wochen nach der ersten Immunisierung getötet wurden, wurden nicht gescored, da die vier Wochen genau dem Tag 28 der ersten Untersuchung entsprachen.

Nach 5,5 Wochen der ND (Abbildung 6 und Abbildung 7) zeigte sich in diesem Zeitraum keine Veränderung. Der Score stieg zwar leicht über die Zeit an, erreichte aber nur Höchstwerte von weniger als 1,25.

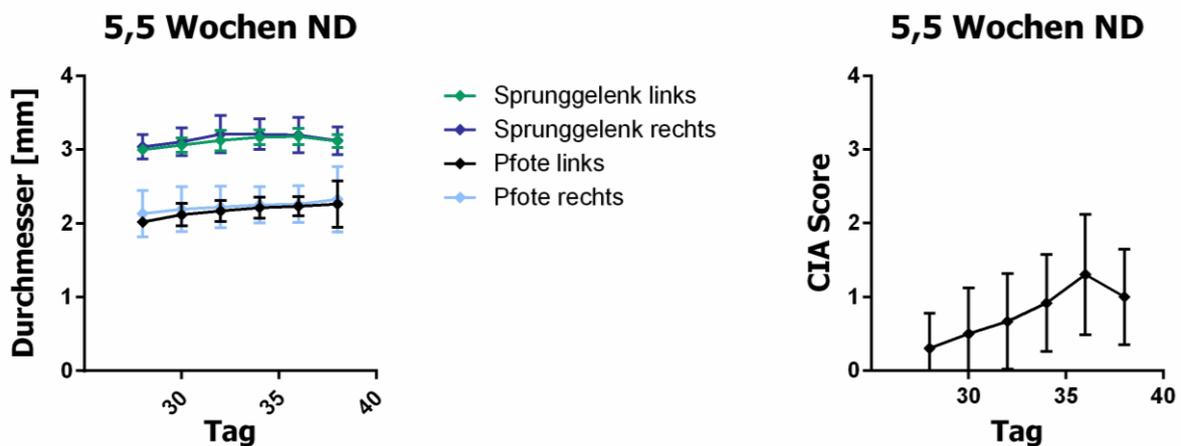


Abbildung 6: Gelenkdurchmesser und Arthritis-Score der Tiere mit Nekropsie nach 5,5 Wochen im CIA Modell unter ND. Links: Durchmesser an Tagen 28 bis 38. Es zeigte sich ein lediglich minimaler Anstieg, welcher nicht auf einen entzündlichen Prozess im Gelenk hindeutete. Rechts ist der CIA-Score dargestellt, welcher deutlich stärker anstieg, jedoch im Durchschnitt im Maximum einen Wert von knapp über 1 erreichte, was bei dem hier verwendeten Score lediglich eine Rötung der Pfoten bedeutete.

Die Tiere, welche mit der HFD gefüttert wurden, zeigen vergleichbare Messwerte für die Dicke der Sprunggelenke und Pfoten zur ND, hier zeigte die HFD keinen Einfluss auf die Basiswerte. Auch hier veränderten sich die Werte im Laufe der Zeit kaum. Der Score stieg zwar auch unter HFD bis zum Zeitpunkt von 5,5 Wochen kontinuierlich an, jedoch war hier ebenfalls ein Maximalwert von weniger als 1,25 für den durchschnittlichen Score aller vier Pfoten zu verzeichnen.

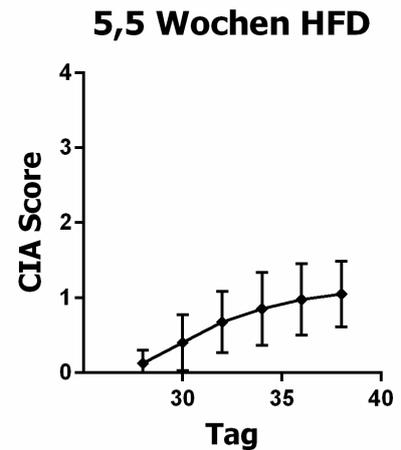
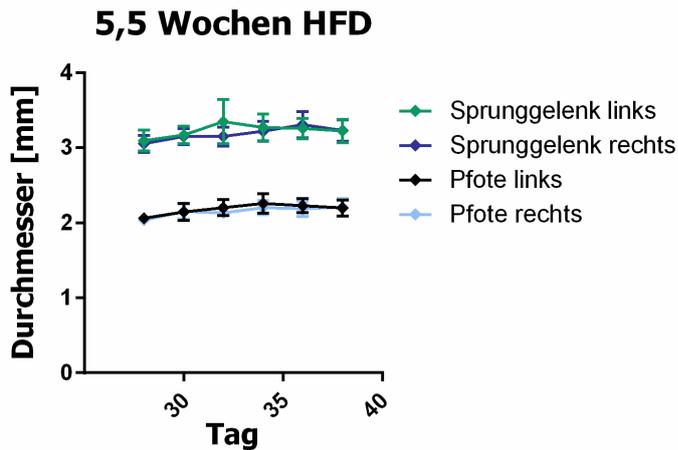


Abbildung 7: Gelenkdurchmesser und Arthritis-Score der Tiere mit Nekropsie nach 5,5 Wochen im CIA-Modell unter HFD. In beiden Abbildungen zeigt sich eine sehr ähnliche Entwicklung wie bereits unter ND beschrieben. Links: Durchmesser an Tagen 28 bis 38. Es zeigte sich ein minimaler Anstieg, welcher nicht auf einen entzündlichen Prozess im Gelenk schließen lässt. Rechts ist der CIA-Score dargestellt, welcher deutlich stärker anstieg als die gemessenen Werte links, jedoch im Durchschnitt einen Maximalwert von nur knapp über 1 (entspricht einer geröteten Pfote) erreicht.

Auch die Versuchsgruppe 7 Wochen nach Immunisierung zeigte im Verlauf keinen signifikanten Anstieg der Messwerte für den Durchmesser von Pfoten und Sprunggelenken. Dies zeigte sich gleichermaßen für die ND- und HFD-Gruppe (Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Werte für den durchschnittlichen Score aller vier Pfoten steigen auch nach sieben Wochen unter beiden Diäten kaum über 1 an, was in einer Rötung der Pfoten ohne Anzeichen einer Schwellung bei den meisten Tieren entsprach. Ohne Veränderung der messbaren Parameter, wie z. B. dem Durchmesser des Gelenks, konnte deswegen nicht von einer erfolgreichen Arthritisinduktion ausgegangen werden.

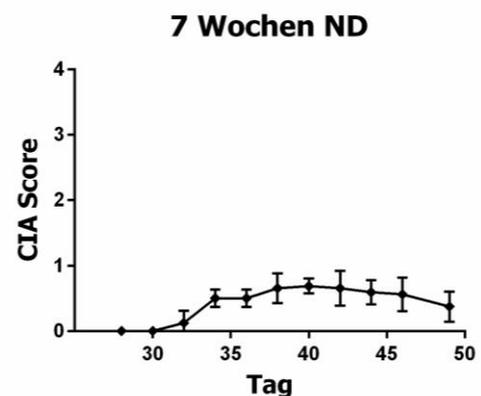
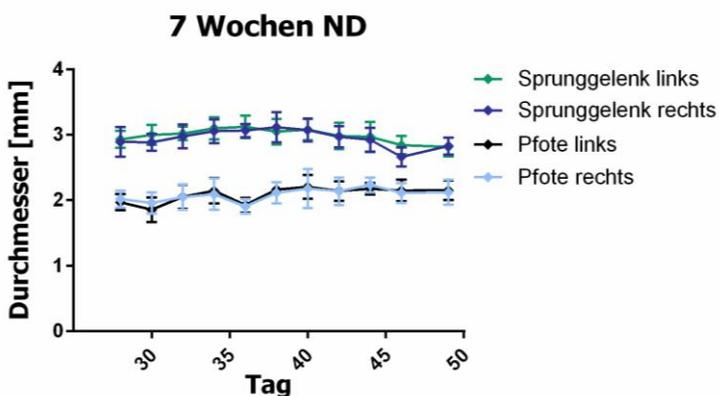


Abbildung 8: Gelenkdurchmesser und Arthritis-Score der Tiere mit Nekropsie nach 7 Wochen im CIA Modell unter ND. Links: Durchmesser an Tagen 28 bis 49. Es zeigten sich zwar leichte Schwankungen der Messwerte, jedoch kein Anstieg, welcher bei einem entzündlichen Prozess zu erwarten gewesen wäre. Rechts ist der CIA-Score dargestellt, welcher anfangs ansteigt, jedoch ab Tag 40 wieder eher abfällt. Selbst die höchsten Werte an Tag 40 sind nur sehr niedrig und deuten nicht auf eine erfolgreiche Arthritisinduktion hin.

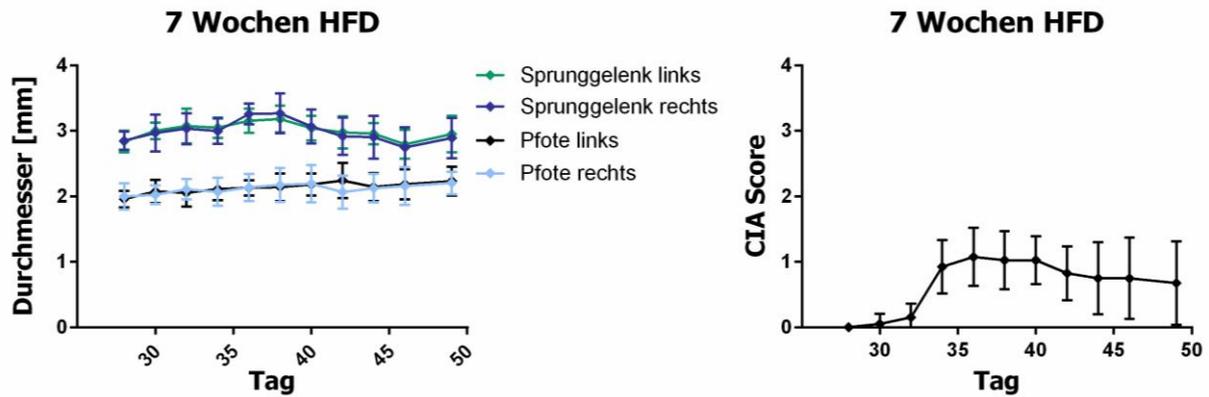


Abbildung 9: Gelenkdurchmesser und Arthritis-Score der Tiere mit Nekropsie nach 7 Wochen im CIA Modell unter HFD. Links: Durchmesser an Tagen 28 bis 49. Es zeigen sich, vergleichbar wie unter ND, leichte Schwankungen der Messwerte, jedoch kein Anstieg, welcher bei einem entzündlichen Prozess zu erwarten gewesen wäre. Rechts ist der CIA-score dargestellt, welcher anfangs ansteigt, jedoch zwischen Tag 35 und 40 ein Plateau erreicht und dann wieder absinkt. Selbst die höchsten Werte sind nur sehr niedrig und deuten nicht auf eine erfolgreiche Arthritisinduktion hin.

Um diese niedrigen Scores zu bestätigen, wurden von einigen Tieren mit den höchsten Scores histologische Färbungen erstellt. Beispielhaft dargestellt in Abbildung 10 für das Tier (Bezeichnung Er1-106), welches den höchsten Score zeigte. Sowohl die genannten gemessenen Parameter als auch die histologischen Färbungen zeigten hier keine Anzeichen einer arthritischen Veränderung des Gelenks. Da dies vermutlich auf den C57Bl/6-Hintergrund der verwendeten Tiere zurückzuführen ist, musste der Versuch mit DBA/1-Mäusen wiederholt werden.

Er1-106

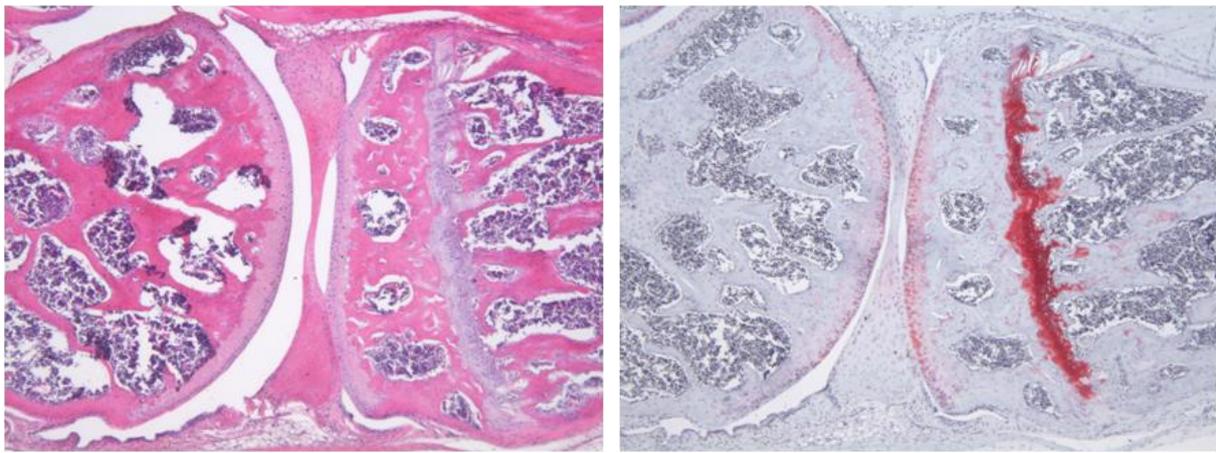
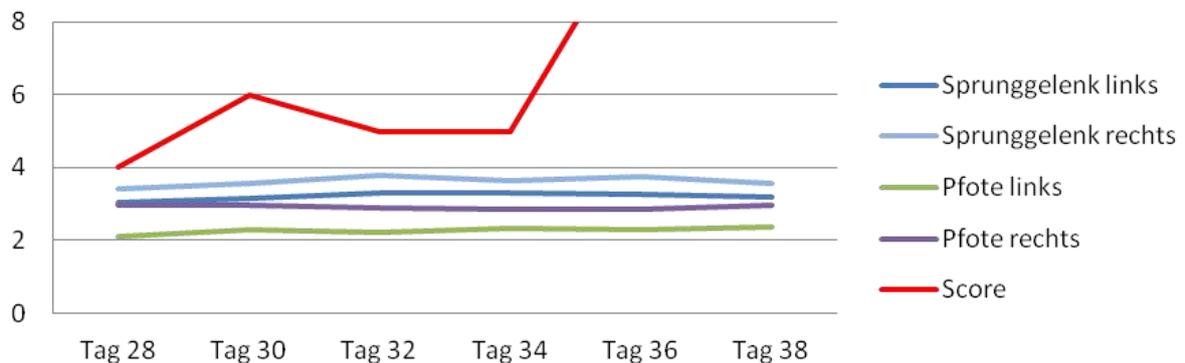


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung desjenigen Tieres mit dem höchsten Arthritis-Score sowie die entsprechenden histologischen Färbungen. Oben sieht man sowohl die gemessenen Durchmesser von Pfoten und Sprunggelenken, welche im Zeitverlauf gleich bleiben und darüber der CIA-Score (rot), welcher stark ansteigt. Unten im linken Bild ist eine histologische Übersichtsfärbung (HE) desselben Gelenks, welches oben ausgewertet wurde. Rechts eine Knorpelfärbung (Safranin-O). In beiden Färbungen wird keine Schädigung des Gelenks sichtbar, welche den Anstieg des CIA-Scores bestätigen könnte.

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1Rj Mäusen

Die Kollagen-induzierte Arthritis wurde durch die Firma Aurigon im Prinzip genauso induziert, wie zuvor im selbst durchgeführten Modell in C57Bl/6 Mäusen. Die wichtigen Unterschiede sind die Verwendung eines anderen Mausstammes (DBA/1Rj), für den bereits bekannt ist³³, dass er für die Arthritisinduktion im CIA-Modell besser geeignet ist und außerdem eine verkürzte Fütterung vor Induktion, da nicht riskiert werden sollte, dass das höhere Lebensalter (im Vergleich zur o.g. Literatur) die Inzidenz beeinflusst. Durch die Firma wurde der klinische Verlauf der Arthritis anhand desselben Scores, wie schon für das CIA Modell in C57/Bl6 beschrieben (Siehe S. 28), quantifiziert. Von Tag 21 bis Tag 28 nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere täglich untersucht, danach dreimal pro Woche bis zum Zeitpunkt der Nekropsie.

Die Gewebe wurden histologisch (durch uns) untersucht, d.h. Paraffinschnitte hergestellt und anschließend verschiedene histologische Färbungen angefertigt. Es war innerhalb des gegebenen Promotionszeitraums nicht mehr möglich alle Gewebe zu färben und auszuwerten, da die

Wiederholung des Versuchs notwendig war. Bereits aus den exemplarischen Bildern ist aber ersichtlich, dass eine deutliche Schädigung des Gelenks bei Arthritis-induzierten Tieren eingetreten ist. Die Gelenkknorpel sind stark beschädigt und die Menisken durch einen zellreichen Pannus im gezeigten Bild komplett zerstört. Bei anderen Tieren waren geschädigte Reste des Meniskus noch vorhanden (Abbildung 11).

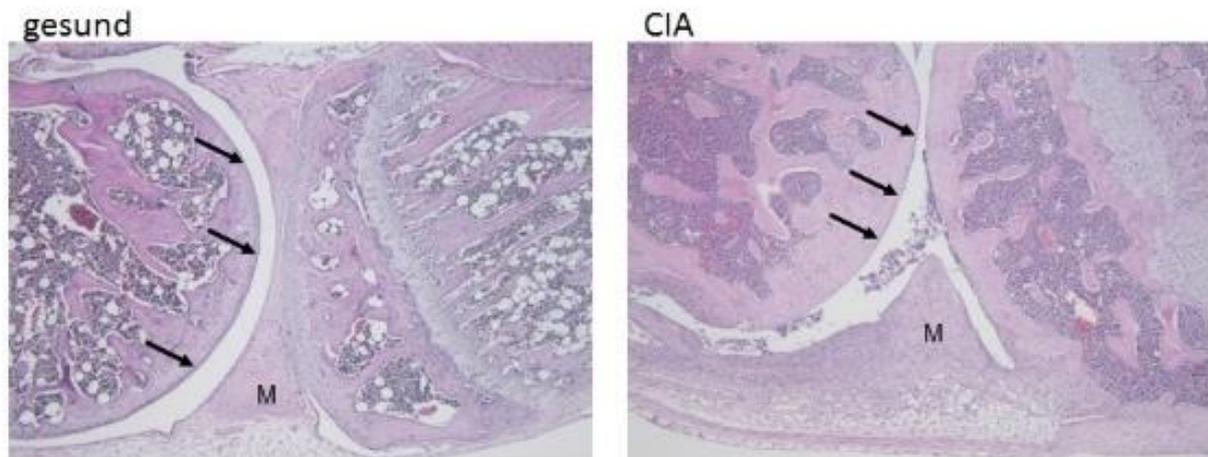


Abbildung 11: Übersichtsfärbung (HE) jeweils eines exemplarischen Gelenks einer gesunden (links) und einer Maus mit CIA (rechts). Im linken Bild sieht man, dass die gesunden Menisken (M) relativ zellarm sind und die Knorpeloberflächen (Pfeile) glatt und intakt. Rechts sieht man im Vergleich zum gesunden Tier deutlich mehr Zellen im Bereich des Meniskus (M), sodass die Faserknorpel-Struktur des Meniskus kaum noch erkennbar ist. Auch die Knorpeloberflächen des hyalinen Knorpels sind aufgeraut und geschädigt (Pfeile). Dies zeigt sich des Weiteren durch Zellen und Gewebereste im Gelenkspalt.

Die Scores der verschiedenen Behandlungsgruppen zeigen, dass zwischen Tag 21 und Tag 28 erste Auswirkungen der CIA sichtbar werden, jedoch erst in den darauffolgenden Tagen beginnt der deutliche Anstieg des Scores, welcher dann ca. ab Tag 35-40 die maximalen Werte erreicht und nicht weiter ansteigt (Abbildung 12). Die Scores der Tiere unter HFD lagen interessanter Weise zu allen Zeitpunkten niedriger (wenn auch nicht signifikant) als diejenigen der Tiere, welche mit ND gefüttert wurden.

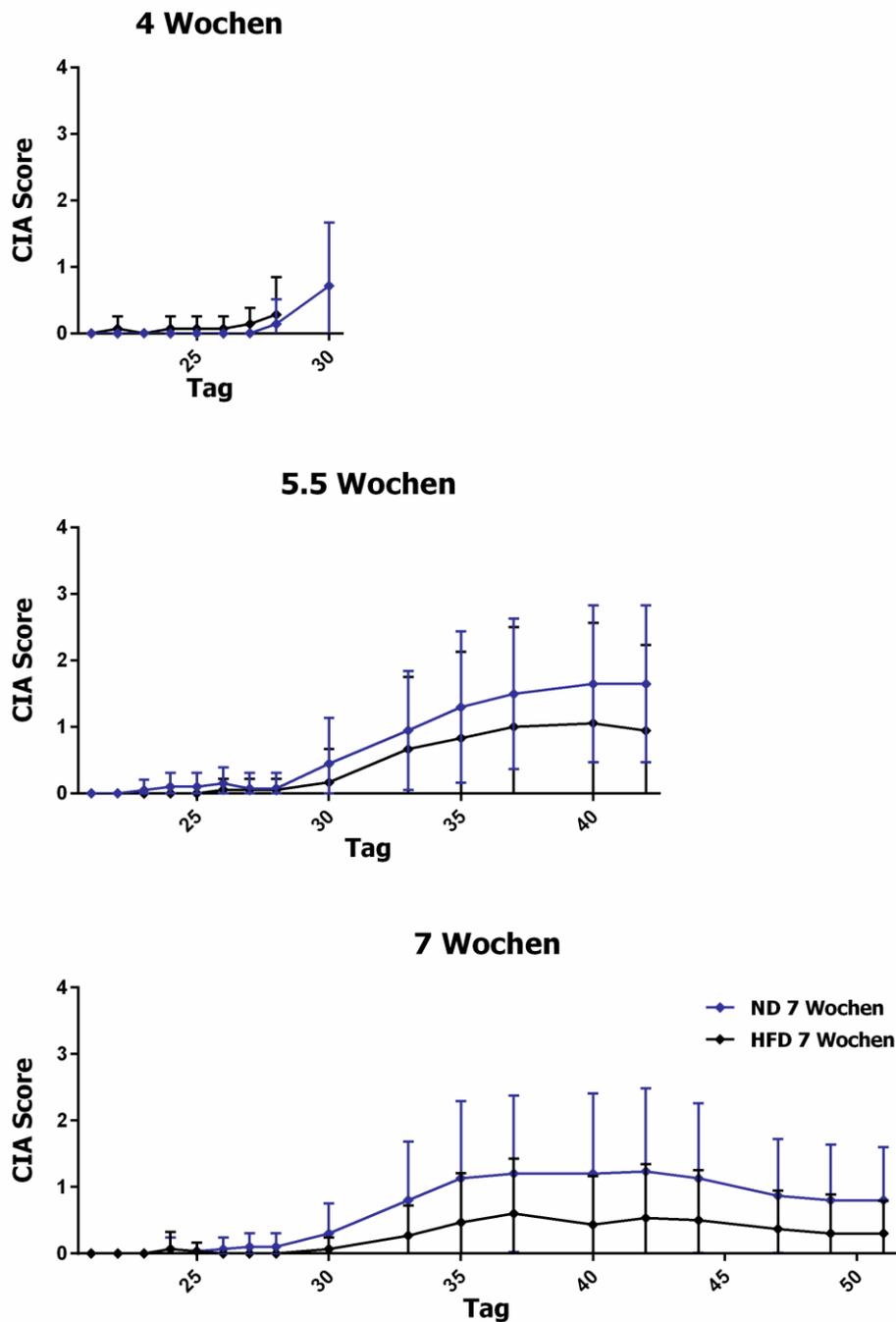


Abbildung 12: Arthritis-Score der DBA/1Rj Mäuse im CIA Modell kombiniert mit ND (blau) und HFD (schwarz) über die Zeiträume von 4 (oben), 5,5 (Mitte) und 7 Wochen (unten). In allen untersuchten Gruppen zeigt sich ein Anstieg des Scores etwa ab Tag 30, dieser steigt bis ungefähr Tag 37 an und flacht dann etwas ab. Die Streuung der Einzelwerte, repräsentiert durch die Fehlerbalken, ist relativ hoch, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sichtbar sind.

Metabolische Veränderungen

Körpergewicht

Da bis zur Immunisierung außer der Unterteilung in HFD und ND kein Unterschied zwischen den Tiergruppen bestand, sind im Folgenden die Ergebnisse aller Tiere zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die Tiere bereits 5 Tage nach Beginn der Fütterung mit HFD im Vergleich zur ND hochsignifikant erhöhte Körpergewichte hatten (Abbildung 13). Somit war sichergestellt, dass zum Zeitpunkt der ersten Immunisierung bereits deutliche Unterschiede zwischen den Diätgruppen vorhanden sind, trotz der kürzeren Fütterungszeiten im Vergleich zu den Versuchsserien in C57Bl/6 Mäusen.

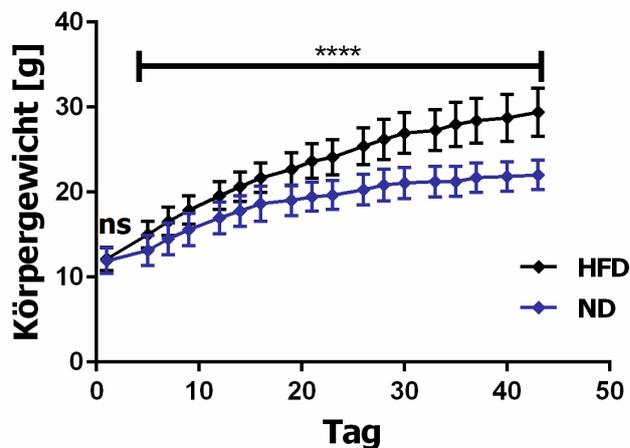


Abbildung 13: Körpergewicht der DBA/1Rj Mäuse im Verlauf der 6 Wochen Vorfütterung. Die Tiere unter HFD (schwarz) waren bereits zum frühesten gemessenen Zeitpunkt hochsignifikant schwerer als diejenigen unter ND (blau) und blieben dies auch über den gesamten Zeitverlauf.

Systemische Adipokinspiegel

Die systemischen Adipokinspiegel wurden im Plasma der Tiere gemessen. Die Blutentnahme erfolgte durch die Firma Aurigon, welche das Plasma gefroren zur weiteren Analyse an unser Forschungslabor verschickte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die zentralen Adipokine Adiponektin und Leptin und außerdem als Marker der Entzündung IL-6 und CRP im Serum gemessen.

Adiponektin

Vergleicht man die Adiponektinspiegel der jeweiligen Gruppen zu einem der jeweiligen Zeitpunkte, stellen sich die Plasmaspiegel des Adiponektins sehr homogen dar. Lediglich 4 Wochen nach der ersten Immunisierung zeigte sich bei denjenigen Tieren, welche HFD erhielt, eine signifikante Reduktion des Adiponektins durch die CIA (HFD gesund 6124 ng/ml; HFD CIA 4987 ng/ml; $p = 0,0278$) (Abbildung 14,

Tabelle 6). Unter ND wird Adiponektin nicht signifikant verändert (ND gesund 5401 ng/ml; ND CIA 5081 ng/ml; $p = 0,8162$). 5,5 Wochen nach CIA Induktion war diese Reduktion unter beiden Diäten noch sichtbar, allerdings jetzt unter keiner Diät mehr signifikant verändert (HFD gesund 6384 ng/ml; HFD CIA 5891 ng/ml; $p = 0,8158$) (ND gesund 6839 ng/ml; ND CIA 5935 ng/ml; $p = 0,3794$). Am spätesten Zeitpunkt, 7 Wochen nach CIA Induktion, waren ebenfalls keine signifikanten Einflüsse der CIA vorhanden (Abbildung 14) (HFD gesund 5603 ng/ml; HFD CIA 5882 ng/ml; $p = 0,8797$) (ND gesund 5931 ng/ml; ND CIA 6245 ng/ml; $p = 0,8371$).

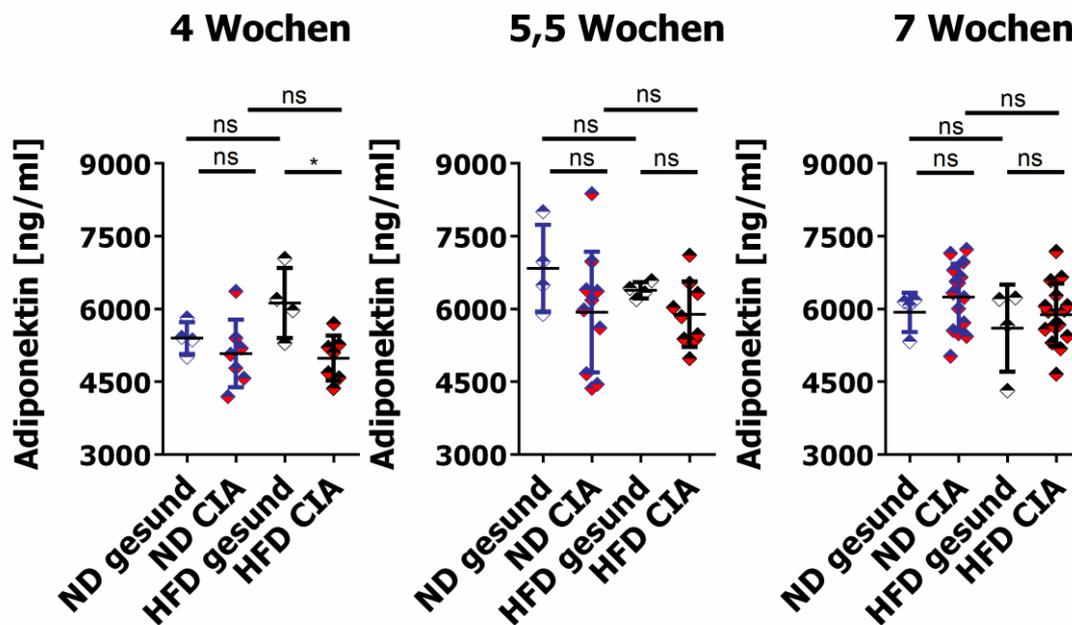


Abbildung 14: Adiponektin Plasmaspiegel 4 (links), 5,5 (Mitte) oder 7 Wochen (rechts) nach der Nekropsie in DBA/1Rj Mäusen. Die Adiponektinspiegel werden zu keinem Zeitpunkt signifikant durch die Diät beeinflusst. Die CIA bewirkt ausschließlich zum frühesten Zeitpunkt unter HFD eine signifikante Reduktion des Adiponektinspiegels (HFD gesund 6124 ng/ml; HFD CIA 4987 ng/ml; $p = 0,0278$).

In der Zeitkinetik der jeweiligen Gruppen steigt der Adiponektinspiegel bei den CIA Tieren über die Zeit an (Abbildung 15). Dies zeigt sich sowohl in einem signifikanten Unterschied unter ND zwischen dem 4- und dem 7-Wochen Zeitpunkt (4 Wochen 5081ng/ml; 7 Wochen 6245 ng/ml, $p = 0,0219$), als auch unter HFD in signifikanten Unterschieden zwischen 4- und 5,5- und 4- und 7-Wochen Zeitpunkten (4 Wochen 4987 ng/ml; 5,5 Wochen 5891 ng/ml; $p = 0,019$; 7 Wochen 5882 ng/ml, $p = 0,0101$).

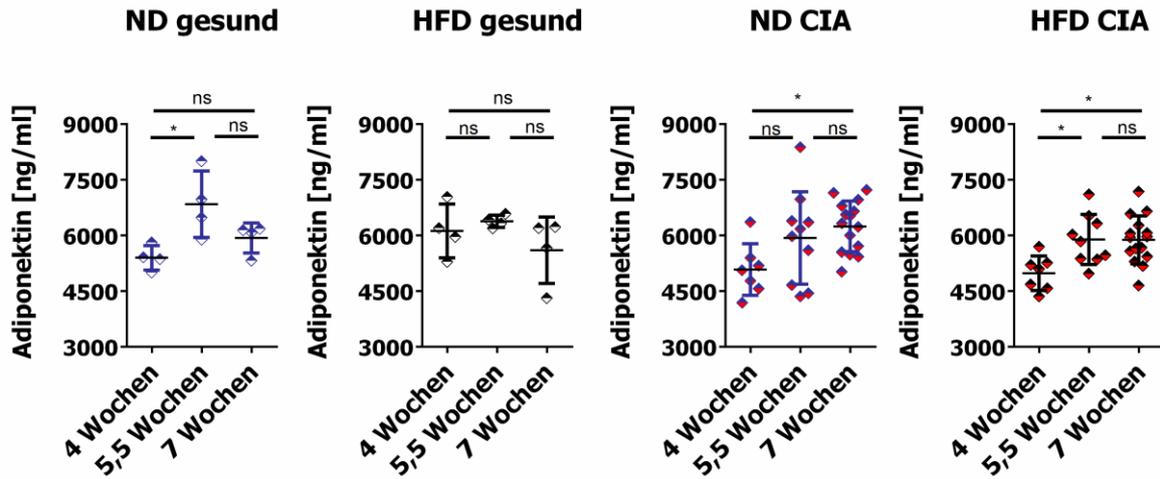


Abbildung 15: Adiponektin Plasmaspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in DBA/1Rj Mäusen. Unter ND ohne DMM zeigt sich ein Anstieg zwischen Woche 4 und 5,5, dieser flacht allerdings bis Woche 7 wieder ab (links). Unter HFD verändert sich der Adiponektinspiegel bei sonst gesunden Tieren im Zeitverlauf nicht (zweite Grafik von links). Bei Tieren mit CIA Induktion steigt der Adiponektinspiegel im Zeitverlauf an, unter beiden Diäten signifikante zwischen den 4- und 7 Wochen Gruppen, unter HFD ist außerdem der Unterschied zwischen 4 und 5,5 Wochen signifikant.

Tabelle 6: Die serologischen Adiponektinspiegel wurden mittels ELISA in den DBA/1Rj Mäusen aller Behandlungsgruppen bestimmt.

| 4 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
|--------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 7 | 4 | 7 |
| Minimum [ng/ml] | 5007 | 4190 | 5292 | 4363 |
| 25 % Perzentile | 5097 | 4570 | 5460 | 4583 |
| Median [ng/ml] | 5392 | 5068 | 6082 | 5102 |
| 75 % Perzentile | 5715 | 5402 | 6831 | 5265 |
| Maximum [ng/ml] | 5814 | 6367 | 7042 | 5702 |
| Mittelwert [ng/ml] | 5401 | 5081 | 6124 | 4987 |
| Standardabweichung | 330,3 | 696,9 | 722,3 | 464,3 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 165,1 | 263,4 | 361,2 | 175,5 |
| 5,5 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 10 | 4 | 9 |
| Minimum [ng/ml] | 5892 | 4363 | 6193 | 4974 |
| 25 % Perzentile | 6040 | 4613 | 6227 | 5371 |
| Median [ng/ml] | 6729 | 6078 | 6378 | 5843 |
| 75 % Perzentile | 7747 | 6543 | 6547 | 6426 |
| Maximum [ng/ml] | 8005 | 8377 | 6587 | 7110 |
| Mittelwert [ng/ml] | 6839 | 5935 | 6384 | 5891 |
| Standardabweichung | 894,2 | 1243 | 165,5 | 676,1 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 447,1 | 393,2 | 82,77 | 225,4 |
| 7 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 15 | 4 | 15 |
| Minimum [ng/ml] | 5327 | 5027 | 4318 | 4655 |
| 25 % Perzentile | 5514 | 5555 | 4655 | 5437 |
| Median [ng/ml] | 6110 | 6331 | 5933 | 5949 |
| 75 % Perzentile | 6170 | 6802 | 6222 | 6273 |
| Maximum [ng/ml] | 6179 | 7231 | 6229 | 7185 |
| Mittelwert [ng/ml] | 5931 | 6245 | 5603 | 5882 |
| Standardabweichung | 405,3 | 682 | 895,3 | 640,3 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 202,7 | 176,1 | 447,6 | 165,3 |

Leptin

Die systemischen Leptinspiegel waren im DBA/1Rj Mausstamm hochsignifikant höher bei gesunden Tieren unter HFD als unter ND (4 Wochen ND 10987 ng/ml; HFD 40158 ng/ml; $p = 0,0003$; 5,5 Wochen ND 8354 ng/ml; HFD 29951 ng/ml; $p = < 0,0001$; 7 Wochen ND 10237 ng/ml; HFD 74956 ng/ml; $p = < 0,0001$). Tiere mit induzierter Arthritis zeigen jedoch einen sehr niedrigen Leptinspiegel, sowohl unter ND als auch unter HFD, wobei die Reduktion des Leptinspiegels durch die CIA so ausgeprägt war, dass jeglicher Einfluss der HFD nicht mehr nachweisbar war. Die Reduktion des Leptins durch CIA war unter ND lediglich zum 5,5 Wochen Zeitpunkt signifikant (ND gesund 8354 ng/ml; ND CIA 183,2 ng/ml; $p = 0,0062$). Dass die anderen Zeitpunkte unter ND keine signifikante Leptinreduktion durch die CIA zeigen, lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Werte der gesunden Tiere bereits niedrig waren. Unter HFD war der Unterschied zwischen dem erhöhten Spiegel durch die Diät und der Reduktion durch CIA so deutlich, dass er zu jedem Zeitpunkt hochsignifikant war (4 Wochen HFD gesund 40158

ng/ml; HFD CIA 1048 ng/ml; $p = < 0,0001$; 5,5 Wochen HFD gesund 29951 ng/ml; HFD CIA 1190 ng/ml; $p = < 0,0001$; 7 Wochen gesund 74956 ng/ml; HFD CIA 591,4 ng/ml; $p = < 0,0001$) (Abbildung 16, Tabelle 7).

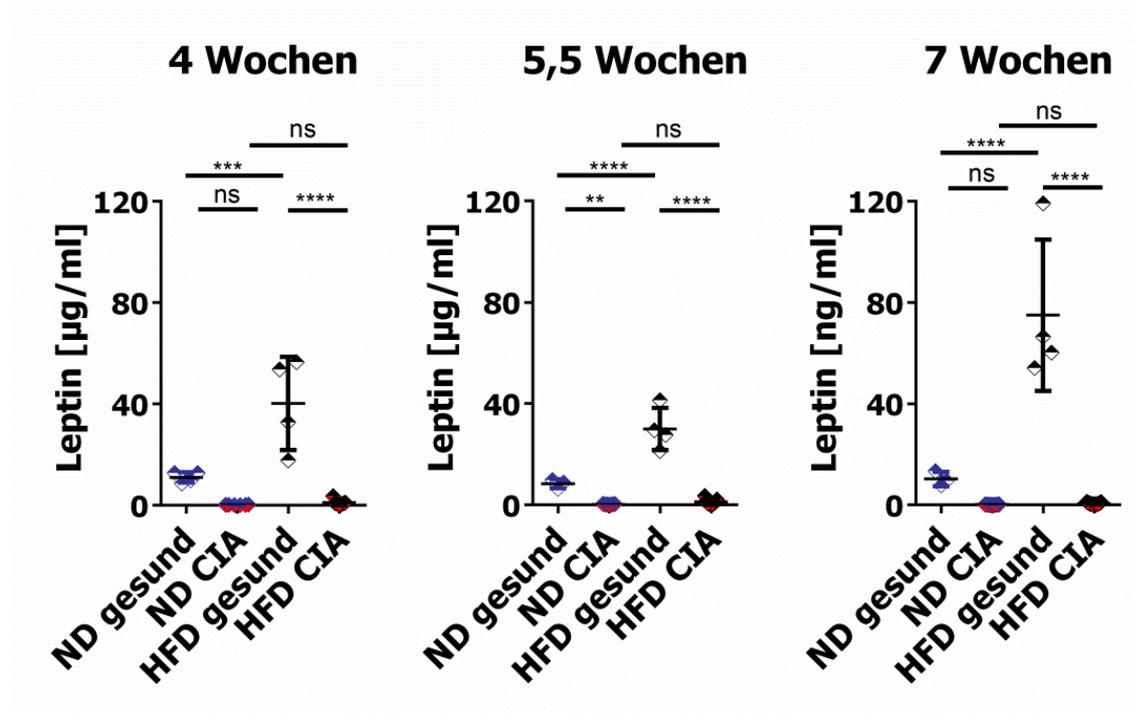


Abbildung 16: Leptin Plasmaspiegel 4 (links), 5,5 (Mitte) oder 7 Wochen (rechts) nach CIA Induktion in DBA/1Rj Mäusen. Der Leptinspiegel war zu jedem Zeitpunkt innerhalb der gesunden Tiere signifikant durch die HFD erhöht (4 Wochen $p = 0,0003$, 5,5 Wochen $p = < 0,0001$, 7 Wochen $p = < 0,0001$). Die CIA bewirkt stets eine Reduktion der Leptinwerte, unter ND war die Differenz zu gesunden Tieren wegen niedrigerer Werte geringer, jedoch trotzdem nach 5,5 Wochen signifikant (Mitte). Unter HFD bewirkte die CIA im Vergleich zur gesunden Kontrolle stets eine hochsignifikante Reduktion des Leptins (4 Wochen $p = < 0,0001$, 5,5 Wochen $p = < 0,0001$, 7 Wochen $p = < 0,0001$).

Betrachtet man die Entwicklung des Leptinspiegels im Zeitverlauf, so zeigte sich ein sehr homogenes Bild, lediglich bei den gesunden Tieren mit HFD lagen die Spiegel insgesamt höher und die Werte zum spätesten Zeitpunkt waren noch höher als die beiden vorherigen. Die Erhöhung wurde aber hauptsächlich durch ein einzelnes Tier verursacht. Innerhalb der CIA Gruppen waren die Werte zu allen Zeitpunkten gleichmäßig im sehr niedrigen Bereich. Hier zeigte sich kein Einfluss über die hier dargestellten Zeiträume (Abbildung 17, Tabelle 7).

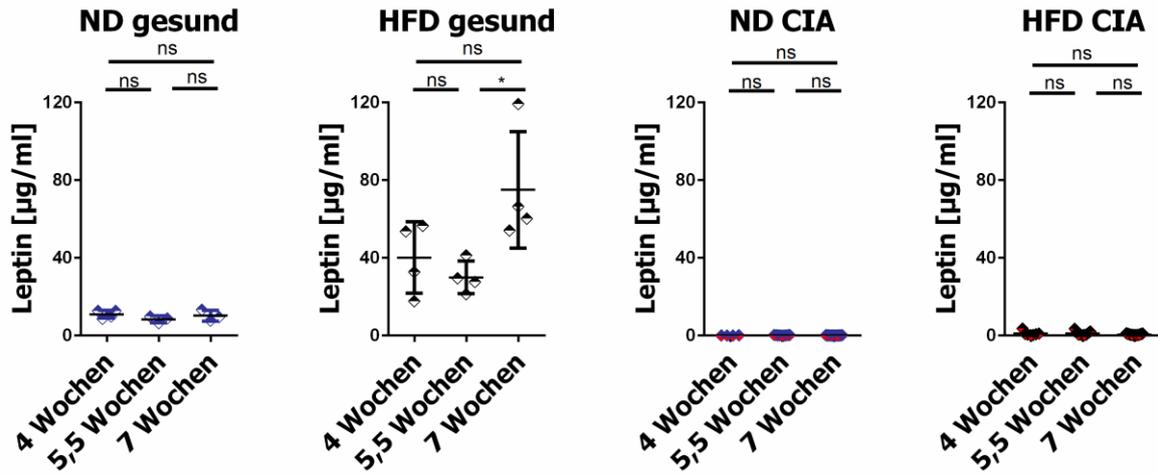


Abbildung 17: Leptin Plasmaspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in DBA/1Rj Mäusen. Hier zeigte sich, dass der Zeitpunkt in Bezug auf die Leptinwerte keine Rolle spielt. Lediglich innerhalb der gesunden Tiere unter HFD zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem 5,5 und dem 7 Wochen Zeitpunkt ($p = 0,0331$). Nach induzierter CIA ist der Leptinspiegel stets gleichmäßig sehr niedrig.

Tabelle 7: Die serologischen Leptinspiegel wurden mittels ELISA in den DBA/1Rj Mäusen aller Behandlungsgruppen bestimmt.

| 4 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
|--------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 6 | 4 | 7 |
| Minimum [ng/ml] | 8669 | 67,89 | 17740 | 246 |
| 25 % Perzentile | 8970 | 77,57 | 21485 | 311,3 |
| Median [ng/ml] | 11288 | 118,6 | 43176 | 770,6 |
| 75 % Perzentile | 12703 | 172,1 | 55813 | 1017 |
| Maximum [ng/ml] | 12703 | 233 | 56540 | 3631 |
| Mittelwert [ng/ml] | 10987 | 128,5 | 40158 | 1048 |
| Standardabweichung | 2042 | 60,87 | 18329 | 1172 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 1021 | 24,85 | 9164 | 443 |
| 5,5 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 3 | 9 | 4 | 9 |
| Minimum [ng/ml] | 6370 | 65,09 | 21290 | 240,4 |
| 25 % Perzentile | 6370 | 92,07 | 22876 | 384,4 |
| Median [ng/ml] | 8817 | 186,1 | 28601 | 534,1 |
| 75 % Perzentile | 9873 | 285,1 | 38375 | 1832 |
| Maximum [ng/ml] | 9873 | 317,3 | 41311 | 3556 |
| Mittelwert [ng/ml] | 8354 | 183,2 | 29951 | 1190 |
| Standardabweichung | 1797 | 96,52 | 8358 | 1103 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 1037 | 32,17 | 4179 | 367,5 |
| 7 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 3 | 15 | 4 | 15 |
| Minimum [ng/ml] | 7789 | 63,7 | 54078 | 246 |
| 25 % Perzentile | 7789 | 70,72 | 55600 | 270,6 |
| Median [ng/ml] | 9569 | 95,69 | 63277 | 413,1 |
| 75 % Perzentile | 13353 | 160,2 | 105990 | 838,7 |
| Maximum [ng/ml] | 13353 | 261,1 | 119190 | 1278 |
| Mittelwert [ng/ml] | 10237 | 121,3 | 74956 | 591,4 |
| Standardabweichung | 2842 | 65,26 | 29915 | 351 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 1641 | 16,85 | 14957 | 90,63 |

Systemische Entzündungsparameter

CRP

CRP ist in der klinischen Diagnostik ein Markerprotein für eine lokale oder systemische Entzündung¹⁰⁰. Um den entzündlichen Prozess der CIA charakterisieren zu können, wurde im Plasma der Mäuse das CRP quantifiziert (Tabelle 8).

Es zeigte sich, dass HFD in fast allen Vergleichsgruppen zu höheren CRP-Werten führte. Diese Beobachtung war 4 Wochen nach der ersten Immunisierung zwischen den gesunden Kontrollgruppen signifikant ($p = 0,0461$). Die CIA bewirkte zu allen Zeitpunkten unter beiden Diäten eine Erhöhung des CRP-Wertes. Diese war bis auf eine Vergleichsgruppe (7 Wochen HFD) ebenfalls signifikant (Abbildung 18) (4 Wochen ND gesund 7033 ng/ml, ND CIA 15442 ng/ml $p = < 0,0001$; HFD gesund 10586 ng/ml,

HFD CIA 16568 ng/ml $p = 0,0002$; 5,5 Wochen ND gesund 7480 ng/ml, ND CIA 12909 ng/ml $p = 0,0013$; HFD gesund/HFD CIA $p = 0,0353$; 7 Wochen ND gesund 7791 ng/ml, ND CIA 10873 $p = 0,0351$; HFD gesund 9994 ng/ml, HFD CIA 10080 ng/ml $p = 0,9998$).

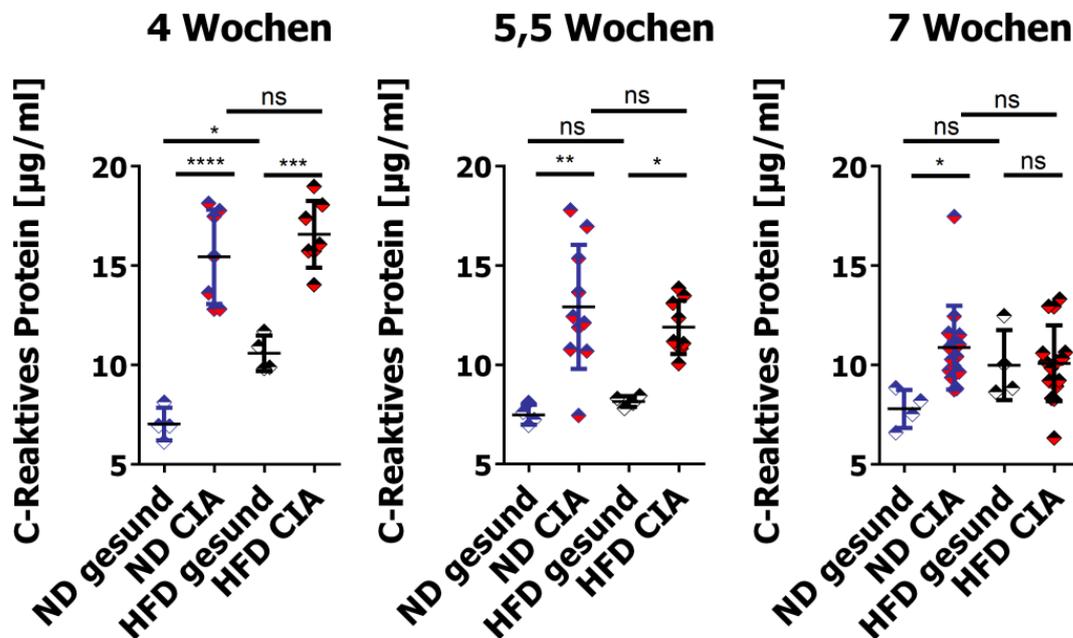


Abbildung 18: CRP-Plasmaspiegel 4 (links), 5,5 (Mitte) oder 7 Wochen (rechts) nach CIA Induktion in DBA/1Rj Mäusen. Der CPR-Wert wurde durch die CIA deutlich erhöht, dies war bis auf die HFD-Gruppe nach 7 Wochen stets signifikant (4 Wochen ND $p < 0,0001$, HFD $p = 0,002$; 5,5 Wochen ND $p = 0,0013$, HFD $p = 0,0353$; 7 Wochen ND $p = 0,0351$, HFD $p = 0,9998$). Am frühesten Zeitpunkt (4 Wochen) lag außerdem der CRP-Wert der gesunden Tieren mit HFD signifikant höher als der mit ND ($p = 0,0461$).

Die Darstellung des Zeitverlaufs der CRP-Werte im Plasma zeigte, dass unter ND bei gesunden Tieren keine Veränderung stattfand. Unter HFD sank der Wert zwischen 4 und 5,5 Wochen etwas ab, stieg aber bis zum 7 Wochenzeitpunkt wieder etwas an, sodass lediglich zwischen 4 und 5,5 Wochen ein signifikanter Unterschied messbar war ($p = 0,0372$).

Bei Tieren mit CIA-Induktion zeigte sich bezüglich CRP im Zeitverlauf eine Abwärtsentwicklung, sowohl unter ND, als auch – noch deutlicher – unter HFD. Dies zeigte sich durch signifikant niedrigere CRP-Werte, zum 7 Wochen Zeitpunkt unter ND im Vergleich zum entsprechenden 4 Wochen Zeitpunkt ($p = 0,0013$). Unter HFD waren sowohl der Unterschied zwischen 4 und 5,5 ($p < 0,0001$) als auch der zwischen 4 und 7 ($p < 0,0001$) und der zwischen 5,5 und 7 ($p = 0,0472$) Wochen signifikant (Abbildung 19, Tabelle 8).

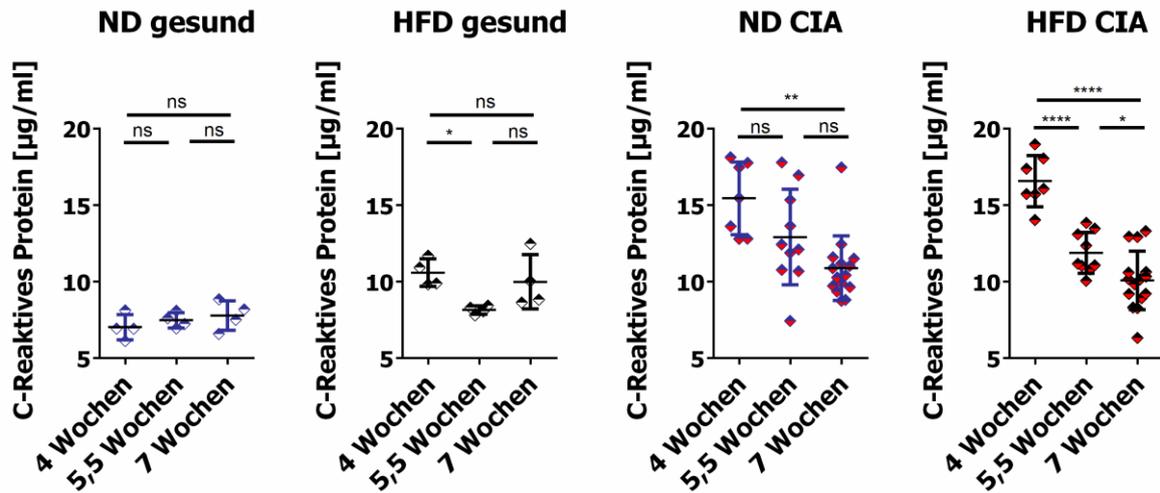


Abbildung 19: CRP-Plasmaspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in DBA/1Rj Mäusen. Unter ND blieb der CRP-Wert bei gesunden Tieren über die Zeit konstant, wohingegen er unter HFD etwas abfiel zwischen Woche 4 und 5,5 ($p = 0,0372$). Bei Tieren mit induzierter CIA sinkt der CRP Spiegel zwischen Woche 4 und 7 ab, wobei unter ND lediglich der Unterschied zwischen Woche 4 und 7 signifikant war ($p = 0,0013$), während unter HFD sowohl die Reduktion von Woche 4 bis Woche 5 ($p < 0,0001$), als auch von 4 bis 7 ($p < 0,0001$) und die Differenz zwischen 5,5 und 7 Wochen signifikant war ($p = 0,0472$).

Tabelle 8: ELISA-Daten der CRP-Plasmaspiegel in DBA/1Rj Mäusen

| 4 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
|--------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 7 | 4 | 7 |
| Minimum [ng/ml] | 6135 | 12794 | 9828 | 14037 |
| 25 % Perzentile | 6333 | 12812 | 9843 | 15722 |
| Median [ng/ml] | 6935 | 15476 | 10407 | 16067 |
| 75 % Perzentile | 7832 | 17771 | 11507 | 18056 |
| Maximum [ng/ml] | 8129 | 18138 | 11700 | 18981 |
| Mittelwert [ng/ml] | 7033 | 15442 | 10586 | 16568 |
| Standardabweichung | 822 | 2382 | 897,9 | 1672 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 411 | 900,4 | 449 | 632,1 |
| 5,5 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 10 | 4 | 9 |
| Minimum [ng/ml] | 6958 | 7445 | 7801 | 10062 |
| 25 % Perzentile | 7030 | 10755 | 7868 | 10927 |
| Median [ng/ml] | 7429 | 12271 | 8186 | 11177 |
| 75 % Perzentile | 7981 | 15750 | 8402 | 13289 |
| Maximum [ng/ml] | 8104 | 17791 | 8435 | 13846 |
| Mittelwert [ng/ml] | 7480 | 12909 | 8152 | 11884 |
| Standardabweichung | 494,9 | 3125 | 278,3 | 1343 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 247,5 | 988,3 | 139,1 | 447,6 |
| 7 Wochen | ND gesund | ND CIA | HFD gesund | HFD CIA |
| Anzahl der Werte pro Gruppe | 4 | 15 | 4 | 15 |
| Minimum [ng/ml] | 6597 | 8752 | 8635 | 6334 |
| 25 % Perzentile | 6827 | 9655 | 8683 | 8929 |
| Median [ng/ml] | 7856 | 10421 | 9436 | 10167 |
| 75 % Perzentile | 8689 | 11519 | 11863 | 10633 |
| Maximum [ng/ml] | 8853 | 17477 | 12469 | 13308 |
| Mittelwert [ng/ml] | 7791 | 10873 | 9994 | 10080 |
| Standardabweichung | 964,5 | 2112 | 1764 | 1904 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 482,3 | 545,3 | 882 | 491,6 |

IL-6

Um die systemischen Effekte der Entzündung durch die CIA auf Zytokinebene zu evaluieren, wurde neben dem CRP das IL-6 im Plasma gemessen. Hier zeigte sich vor allem, dass die Werte, sofern sie erhöht waren, innerhalb der Gruppen sehr stark schwankten (Abbildung 20 und Abbildung 21). Signifikante Unterschiede waren lediglich im Zeitverlauf sichtbar und dies nur bei Tieren mit HFD und CIA.

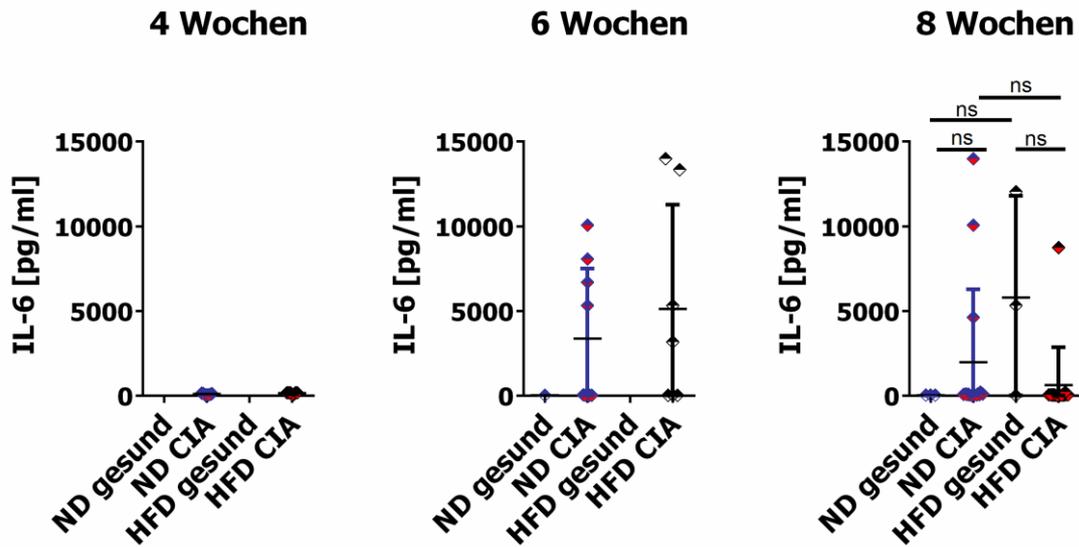


Abbildung 20: IL-6 Plasmaspiegel 4 (links), 5,5 (Mitte) oder 7 Wochen (rechts) nach der CIA Induktion in DBA/1Rj Mäusen. Zwischen den Behandlungsgruppen gibt es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Es wurde außerdem deutlich, dass viele Tiere nicht erfasst werden konnten, da die Messwerte außerhalb des Messbereichs des Tests liegen.

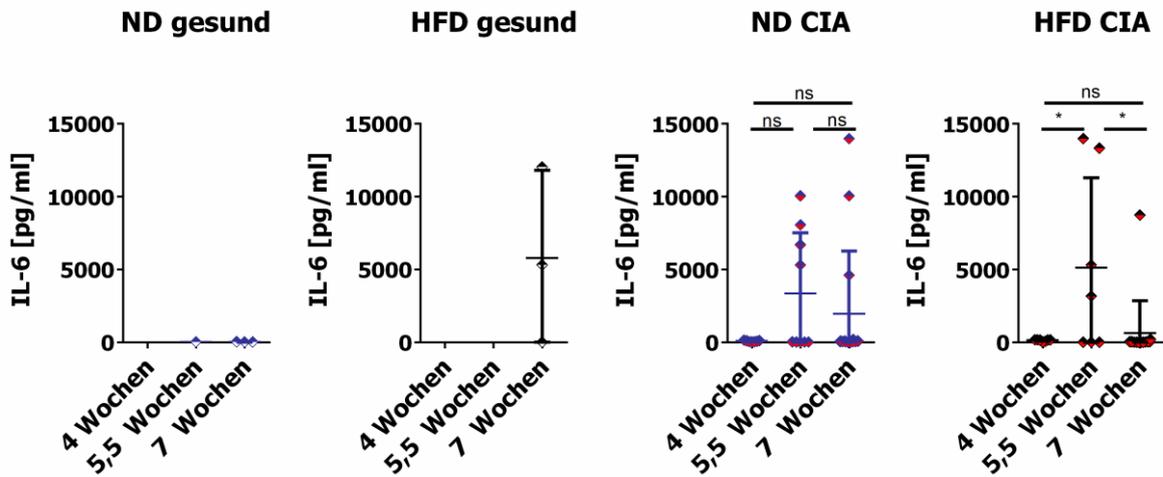


Abbildung 21: IL-6 Plasmaspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in DBA/1Rj Mäusen. Auch über den Zeitverlauf ließen sich keine klaren Entwicklungen feststellen. Sowohl CIA als auch HFD führte zu vereinzelt erhöhten Werten, allerdings nicht konstant bei allen Tieren einer Gruppe.

Arthroseinduktion

Die Induktion der Arthrose wurde durch operatives Durchtrennen des medialen Meniskus am jeweils rechten Hinterbein erwirkt. Dies führte zur Destabilisierung der Gelenke und zu einer verstärkten Degeneration des Knorpels. Das linke Hinterbein wurde operativ genauso eröffnet wie das rechte, jedoch der Meniskus nicht durchtrennt. Dies dient als „sham“-OP, um innerhalb des Individuums den OP-Effekt vom Arthrose-Effekt unterscheiden zu können. Durch diese Methode des Operierens gibt es innerhalb des einzelnen Individuums den Vergleich zwischen DMM und sham Bein, diesen aber nur auf histologischer Ebene. Zwischen den Individuen gab es außerdem den Vergleich zwischen Tieren mit OP (DMM und sham) und Tieren, welche lediglich die Diäten bekamen (ND gesund und HFD gesund). Systemische Werte konnten daher nur zwischen gesunden und operierten Tieren verglichen werden, da das Serum in sham und DMM Bein identisch ist.

Die operativ induzierte Veränderung im Gelenk wurde durch histologische Untersuchungen dargestellt. Hierbei wurde von allen Gelenken eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE) gefertigt. In dieser zeigte sich, dass je nach Schnitttiefe im Gelenk die Durchtrennung der Menisken sichtbar war. Weiterhin wurde deutlich, dass in den geschädigten Bereichen viele Zellen in das Gewebe einwanderten (Beispiel in Abbildung 23 zeigt den geschädigten Meniskus nach DMM).

Eine Safranin-O-Färbung stellt Knorpelmatrix rötlich dar, diese Färbung wurde daher als Grundlage für den Tibia-Score verwendet. Die Pappenheim-Färbung färbt ebenfalls die Knorpelmatrix an und diente als Alternative zur Safranin-O-Färbung. Da sich die Safranin-O-Färbung als besser auswertbar darstellte, wurde die Pappenheim-Färbung nicht für alle Gelenke durchgeführt und die Safranin-O-Färbung für die Auswertung verwendet.

Insgesamt stellte sich heraus, dass einige Tiere keine Arthrose entwickelt hatten. Diese Tiere wurden aus sämtlichen Auswertungen herausgenommen, sofern dies nicht anders gekennzeichnet ist.

Die Masson-Goldner-Färbung dient wie die HE-Färbung zum einen der Übersicht über die Gelenke, zum anderen stellt sich in der kontrastreichen Färbung besonders gut dar, wie sich die Menisken zum Teil durch eingewanderte Zellen nach Induktion der OA sehr stark verändern. Hierbei wurden im Einzelfall starke Gewebeumbauten beobachtet (Seite 62).

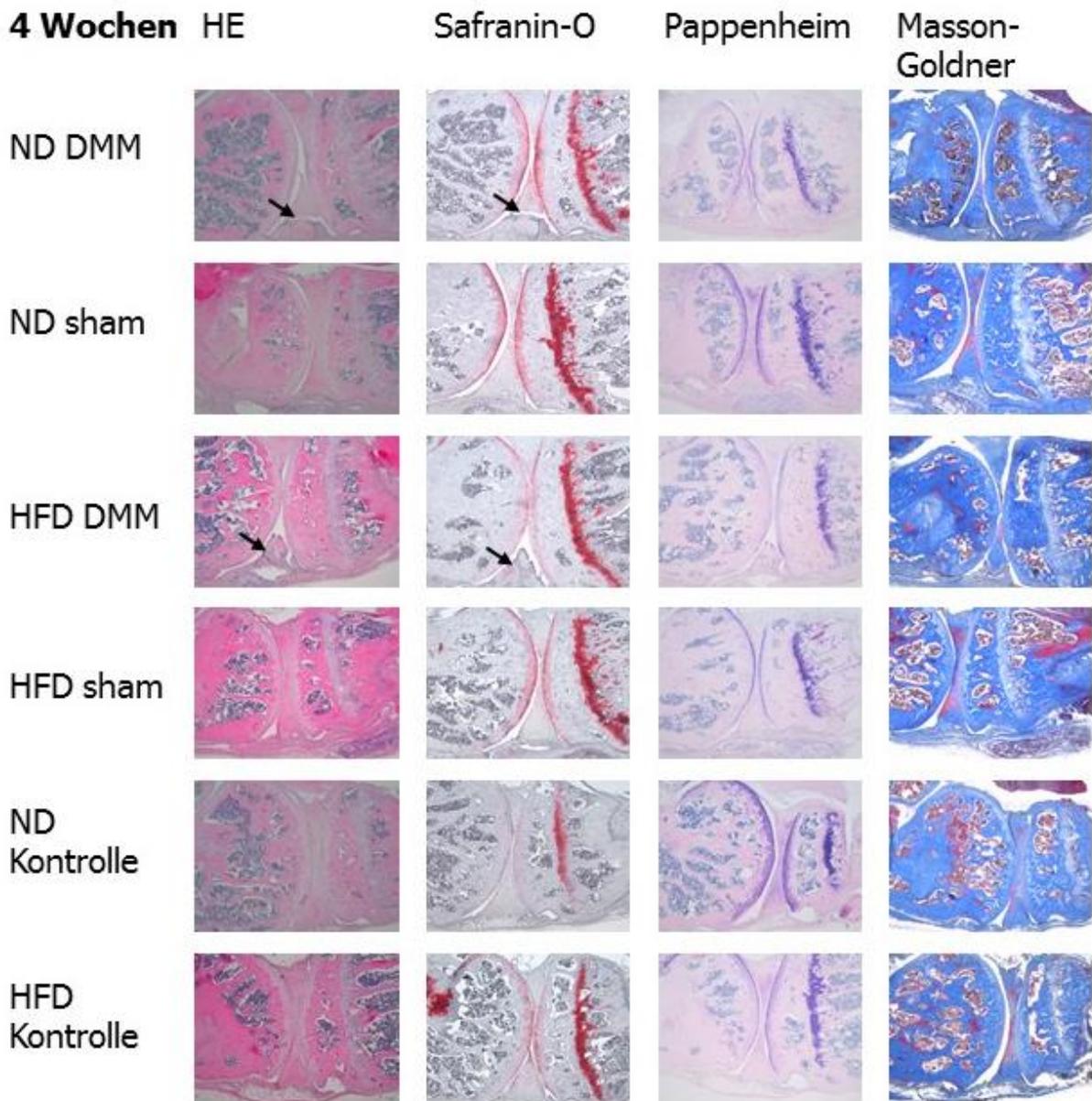


Abbildung 22: Histologische Übersichtsfärbungen (von links nach rechts in jeder Reihe: H/E, Safranin-O, Pappenheim und Masson-Goldner) der verschiedenen Behandlungsgruppen vier Wochen nach DMM-Operation. Dabei zeigt die oberste Reihe das rechte, DMM-operierte Knie der operierten Mäuse unter ND, die zweite Reihe das linke Knie desselben Tiers mit sham-OP. Die durch die DMM durchtrennten Menisken sind deutlich sichtbar (Pfeil). Die dritte Reihe zeigt das rechte, DMM-operierte Knie einer Maus unter HFD und in der vierten Reihe das linke, sham-operierte Knie desselben Tiers. Hier ist die Schädigung des Meniskus kein klarer Schnitt mehr, sondern ein insgesamt von Zellen infiltriertes Gewebe. Die vorletzte Reihe zeigt das Knie eines völlig unbehandelten Tieres unter ND und in der letzten Reihe wird ein unbehandeltes Knie einer Maus unter HFD dargestellt. Ohne OP sind die Gelenke unter beiden Diäten histologisch gesehen völlig unbeschadet.

Vier Wochen nach OA-Induktion zeigten sich in den Gelenken mit durchtrennten Menisken erste Verschleißerscheinungen, allerdings noch kaum stärkere Schäden des Knorpels. Lediglich ein Tier (aus der Gruppe mit HFD) hatte einen Tibia-Score von über 3 (Tabelle 9). Diejenigen Tiere, welche eine HFD bekamen, hatten im Durchschnitt einen etwas höheren OA-Score (2,466 bei HFD; 1,501 bei ND). Des Weiteren zeigten sich beim Vergleich zwischen ND und HFD aber keine histologischen Unterschiede im Gelenk (Abbildung 22).

Tabelle 9: Der Tibia-Score (hier dargestellt die Werte nach 4 Wochen) diente als Maß für die Schädigung des Gelenks, er quantifiziert den Knorpelschaden im hyalinen Knorpel über der Tibia. Hierbei wurde zwischen den DMM-operierten, rechten Knien und den gesunden unbehandelten Tieren mit jeweils entsprechender Diät verglichen.

| | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|--------------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 7 | 6 | 5 |
| Minimum | 0 | 0,67 | 0 | 1,33 |
| 25 % Perzentile | 0 | 0,67 | 0 | 1,665 |
| Median | 0,085 | 1,5 | 0,17 | 2,33 |
| 75 % Perzentile | 0,21 | 2 | 0,17 | 3,335 |
| Maximum | 0,33 | 2,67 | 0,17 | 3,5 |
| Mittelwert | 0,1117 | 1,501 | 0,1133 | 2,466 |
| Standardabweichung | 0,1356 | 0,7135 | 0,08779 | 0,8791 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,05534 | 0,2697 | 0,03584 | 0,3931 |

Bereits nach vier Wochen waren die Menisken zum Teil stark geschädigt, sodass deutlich sichtbar Zellen in den Knorpel einwanderten (Abbildung 23).



Abbildung 23: Unter HFD zeigte sich bereits 4 Wochen nach DMM-Operation, dass Zellen in den geschädigten Meniskus einwanderten (roter Kreis) und diesen weiter schädigten (100x Vergrößerung einer HE-Färbung).

Sechs Wochen nach Induktion der Arthrose war die Schädigung der Menisken und Knorpeloberflächen deutlich fortgeschritten und es konnte auch eindeutig zwischen Tieren mit erfolgreicher OA-Induktion und einigen wenigen, welche keine Symptome zeigten, unterschieden werden.

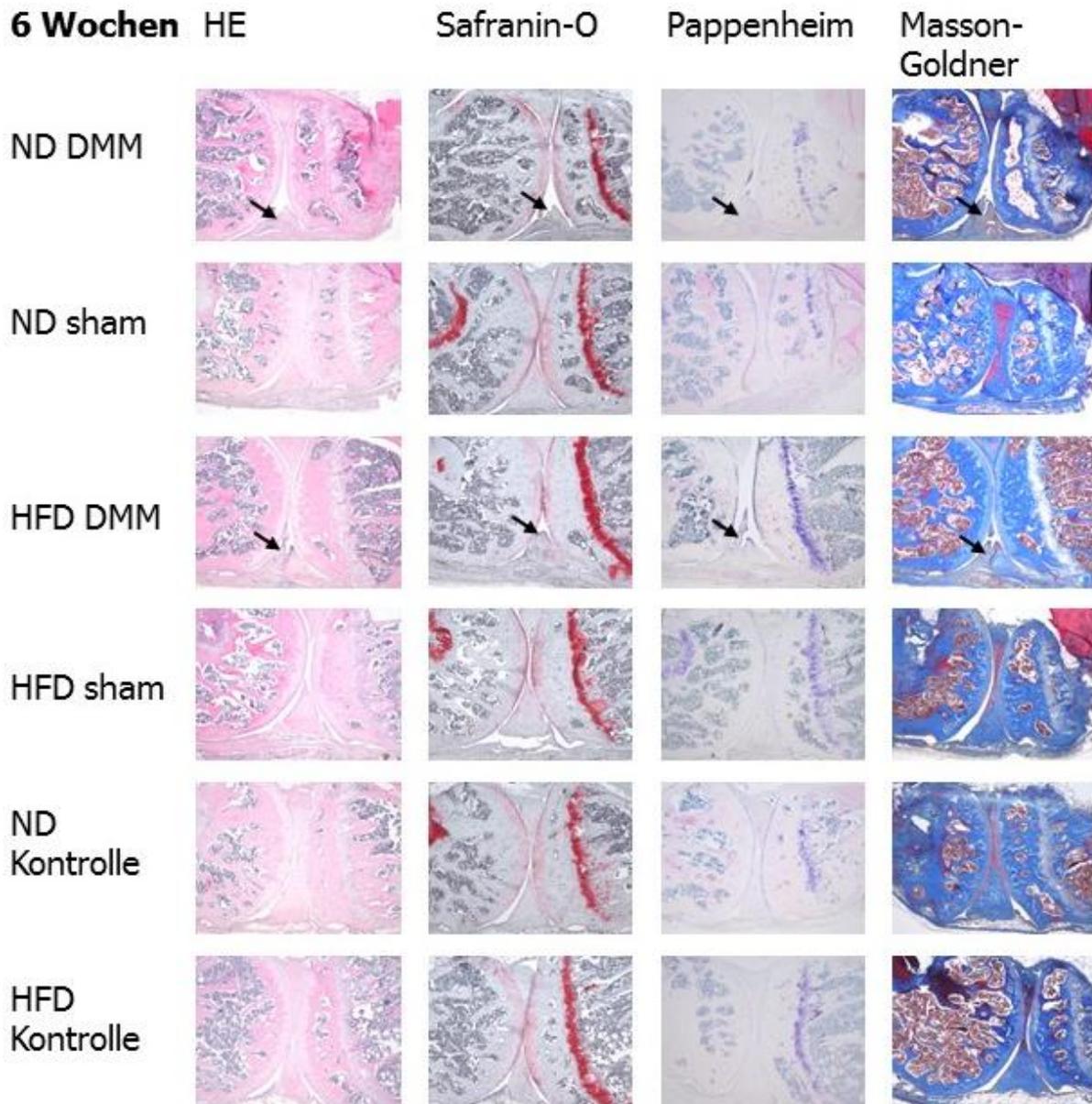


Abbildung 24: Histologische Übersichtsfärbungen (von links nach rechts in jeder Reihe: H/E, Safranin-O, Pappenheim und Masson-Goldner) der verschiedenen Behandlungsgruppen sechs Wochen nach DMM-Operation. Dabei zeigt die oberste Reihe das rechte, DMM-operierte Knie der operierten Mäuse unter ND, die zweite Reihe das linke Knie desselben Tiers mit sham-OP. Die durch die DMM durchtrennten Menisken sind als Knorpelgewebe nicht mehr sichtbar, da inzwischen so viele Zellen in die geschädigten Bereiche eingewandert sind (Pfeile). Die dritte Reihe zeigt das rechte, DMM-operierte Knie einer Maus unter HFD und in der vierten Reihe das linke, sham-operierte Knie desselben Tiers. Hier ist die Schädigung ebenfalls durch invadierende Zellen in das vormals knorpelige Gewebe charakterisiert (Pfeile). Die vorletzte Reihe zeigt das Knie eines völlig unbehandelten Tieres unter ND und in der letzten Reihe wird ein unbehandeltes Knie einer Maus unter HFD dargestellt. Ohne OP sind die Gelenke unter beiden Diäten histologisch gesehen weiterhin völlig unbeschadet.

Auch 6 Wochen nach OA-Induktion waren diejenigen Tiere, welche mit einer HFD gefüttert wurden stärker betroffen, sie hatten im Durchschnitt einen OA-Score von 4 im Vergleich zu 3,064 bei ND (Tabelle 10).

Tabelle 10: Der Tibia-Score sechs Wochen nach DMM-Operation. Hierbei wurde zwischen den DMM-operierten, rechten Knien und den Knien der gesunden, unbehandelten Tiere mit jeweils entsprechender Diät verglichen.

| | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|---|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 5 | 6 | 6 |
| Minimum | 0 | 1,33 | 0 | 2,33 |
| 25 % Perzentile | 0 | 1,33 | 0 | 2,585 |
| Median | 0 | 3,33 | 0 | 4,5 |
| 75 % Perzentile | 0,0425 | 4,665 | 0,33 | 5 |
| Maximum | 0,17 | 5 | 0,33 | 5 |
| Mittelwert | 0,02833 | 3,064 | 0,11 | 4 |
| Standardabweichung | 0,0694 | 1,691 | 0,1704 | 1,193 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,02833 | 0,7561 | 0,06957 | 0,487 |

Acht Wochen nach Arthroseinduktion war bei einigen Tieren die Gelenksoberfläche bis in den Knochen hinein erodiert, so dass in den Knorpelfärbungen kaum noch Signal sichtbar war. Dies war insbesondere bei Tieren unter HFD sichtbar (Abbildung 25).

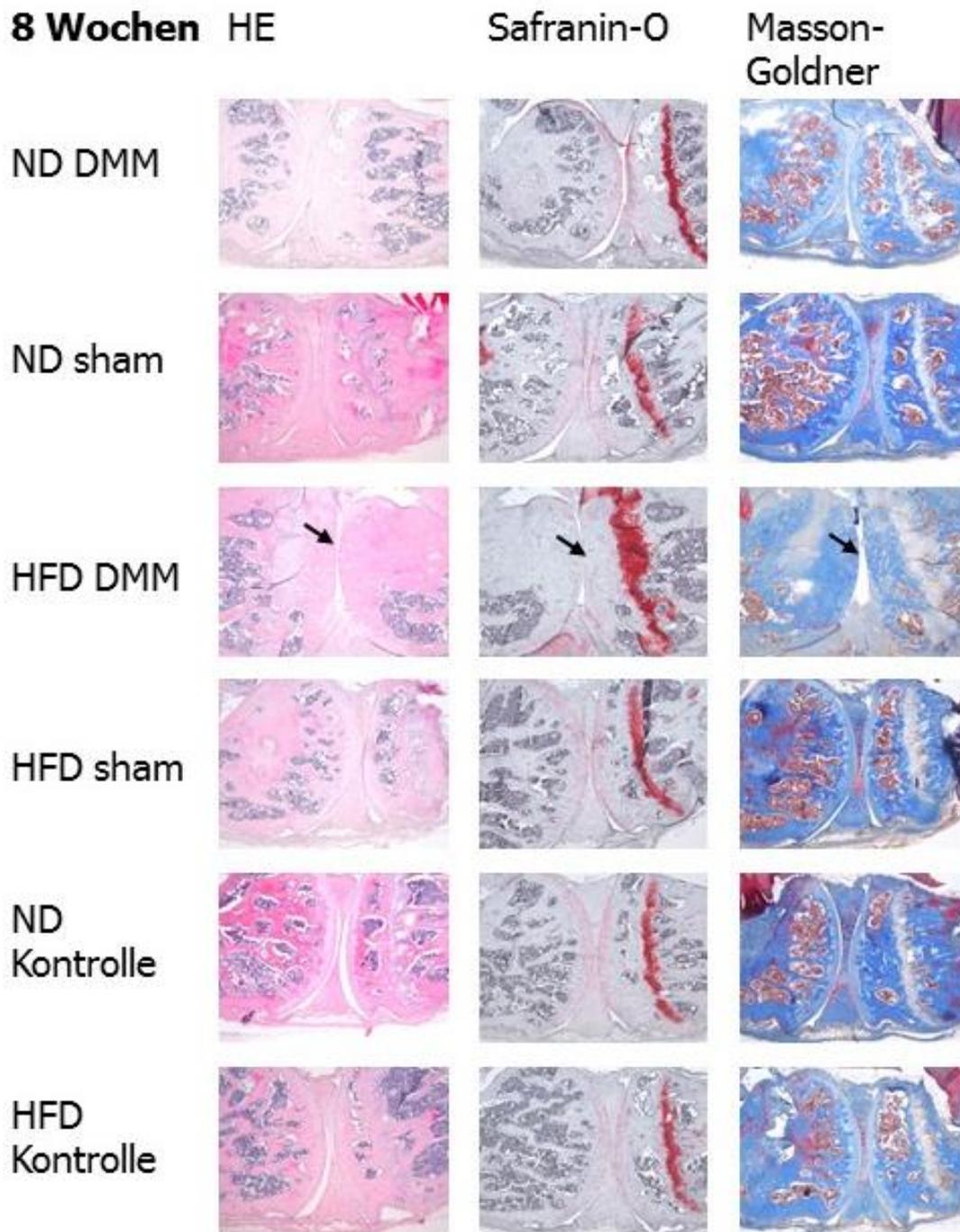


Abbildung 25: Histologische Übersichtsfärbungen (von links nach rechts in jeder Reihe: H/E, Safranin-O, Pappenheim und Masson-Goldner) der verschiedenen Behandlungsgruppen acht Wochen nach DMM-Operation. Dabei zeigt die oberste Reihe das rechte, DMM-operierte Knie der operierten Mäuse unter ND, die zweite Reihe das linke Knie desselben Tiers mit sham-OP. Die durch die DMM durchtrennten Menisken sind in einem vergleichbaren Zustand wie nach sechs Wochen (Pfeile). Die dritte Reihe zeigt das rechte, DMM-operierte Knie einer Maus unter HFD und in der vierten Reihe das linke, sham-operierte Knie desselben Tiers. Hier ist die Schädigung im Vergleich zum sechs Wochen Zeitpunkt nicht stagniert, sondern betrifft nun auch sehr stark die Knorpeloberflächen des hyalinen Knorpels (Pfeile). Die vorletzte Reihe zeigt das Knie eines völlig unbehandelten Tieres unter ND und in der letzten Reihe wird ein unbehandeltes Knie einer Maus unter HFD dargestellt. Ohne OP sind die Gelenke unter beiden Diäten histologisch gesehen weiterhin völlig unbeschadet.

Zu diesem Zeitpunkt war besonders deutlich, dass die HFD zu einer stärkeren Ausprägung der OA führt (OA-Score bei ND 2,625; bei HFD 4,666; Tabelle 11).

Tabelle 11: Der Tibia-Score acht Wochen nach DMM-Operation. Hierbei wurde zwischen den DMM-operierten, rechten Knien und den Knien der gesunden, unbehandelten Tiere mit jeweils entsprechender Diät verglichen.

| | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|---|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 7 | 8 | 8 | 5 |
| Minimum | 0 | 0,83 | 0 | 3,33 |
| 25 % Perzentile | 0 | 1,67 | 0 | 3,665 |
| Median | 0,17 | 1,915 | 0,085 | 4,67 |
| 75 % Perzentile | 0,33 | 4,418 | 0,4175 | 5,665 |
| Maximum | 0,33 | 5,33 | 0,67 | 6 |
| Mittelwert | 0,1671 | 2,625 | 0,1888 | 4,666 |
| Standardabweichung | 0,1347 | 1,649 | 0,2596 | 1,055 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,05093 | 0,5829 | 0,09178 | 0,4716 |

Insgesamt zeigte sich zu allen Zeitpunkten, dass die jeweiligen Kontrollgruppen (ND gesund und HFD gesund) ein Maximum von weniger als 1 im Tibia-Score hatten. Da Veränderungen zwischen 0 und 1 am schwersten einzustufen sind, weil hier schwache Veränderungen der Färbung auch Artefakte der Methode sein können, ist nicht davon auszugehen, dass die Tiere spontan eine Arthrose im Zeitraum dieses Experiments entwickelt haben. Dies ist insbesondere wichtig, da bereits beschrieben ist, dass C57Bl/6 Mäuse in höherem Alter eine spontane OA entwickeln¹⁰¹. Die Zeiträume des hier durchgeführten Experiments liegen jedoch früher als die in der Literatur beschriebenen für eine spontane OA-Entstehung.

Zunächst wurden zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten die verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich Tibia-Score verglichen. Vergleicht man die Tiere mit DMM-Induktion, so war zu jedem Zeitpunkt die Gelenksdegradation stärker bei den Tieren, welche eine HFD bekamen. Die Unterschiede zwischen den Diäten waren zwar nicht signifikant, entsprechen aber den Beobachtungen bei Menschen⁴. Bezogen auf die jeweilige Vergleichsgruppe, also z. B. zum Vier-Wochen-Zeitpunkt, die DMM-Tiere unter ND im Vergleich zu gesunden Tieren unter ND, war die Induktion der Arthrose signifikant und das Modell somit erfolgreich (Abbildung 26).

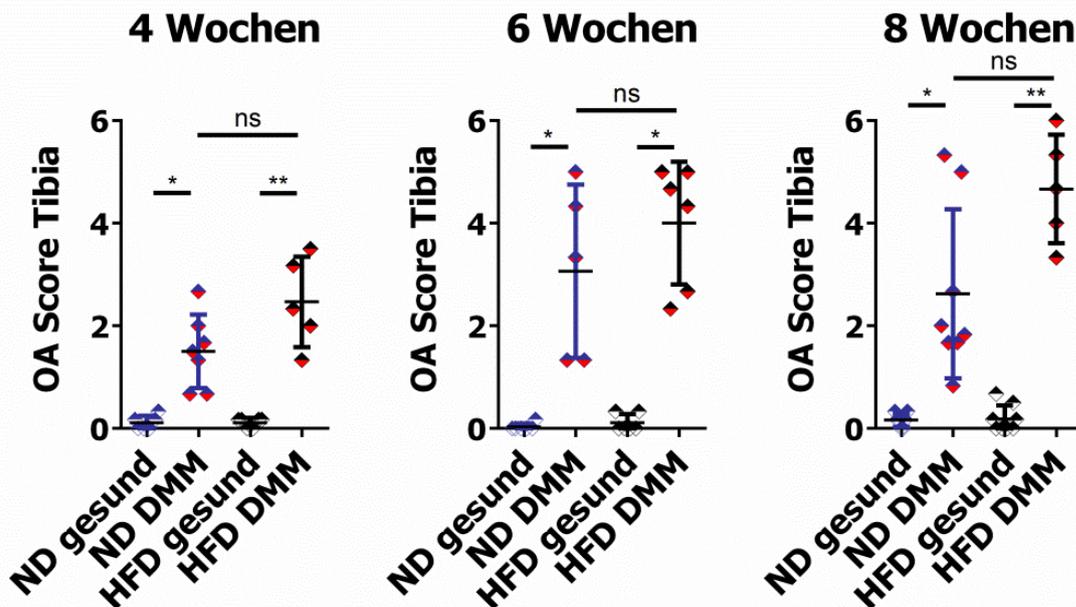


Abbildung 26: Tibia-Score 4 (links), 6 (Mitte) oder 8 Wochen (rechts) nach der DMM-Operation, wobei der Vergleich zwischen dem Score der DMM-operierten Beinen und den gesunden Tieren ohne Operation dargestellt ist. Der Tibia-Score wurde durch die DMM-Operation zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht (4 Wochen ND $p = 0,0362$, HFD $p = 0,0059$; 6 Wochen ND $p = 0,0323$, HFD $p = 0,0116$; 8 Wochen ND $p = 0,0294$, HFD $p = 0,0015$). Es zeigte sich außerdem, dass zu allen Zeitpunkten der Score von Tieren mit DMM und HFD höher war als derjenigen Tiere mit ND und DMM.

Betrachtet man nun die Entwicklung des OA-Scores über die Zeit, so zeigte sich ebenfalls, dass sich in den gesunden Gruppen keine spontane OA entwickelte, welche das Modell verfälschen könnten. Außerdem erreichten Tiere unter ND früher eine Plateauphase, sodass der Unterschied zwischen den Sechs- und Acht-Wochen-Zeitpunkten kaum vorhanden war und generell keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten zu sehen waren. Im Unterschied dazu stieg der OA-Score unter HFD konstant an und die Tiere wiesen acht Wochen nach OA-Induktion signifikant stärkere Gelenkdegradation als nach vier Wochen auf (Abbildung 27).

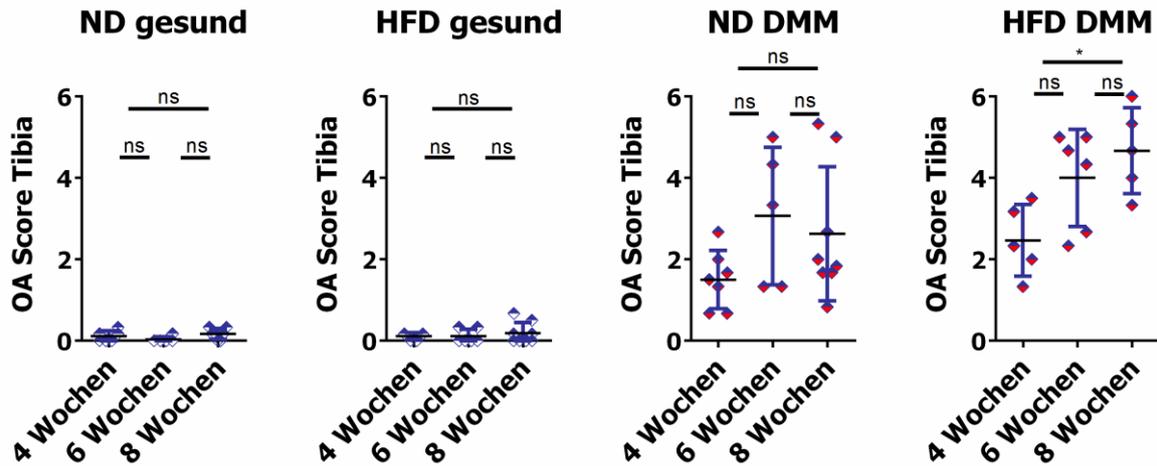


Abbildung 27: Tibia-Score im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen. Sowohl unter ND als auch unter HFD (dargestellt in den beiden linken Grafiken) blieb der Tibia-Score bei gesunden Tieren über die Zeit konstant bei knapp über Null. Bei Tieren mit induzierter Arthrose war der Score unter ND zwar deutlich höher als bei gesunden Tieren, zeigte aber im Zeitverlauf keinen signifikanten Anstieg. Unter HFD (rechts) stieg der Tibia-Score allerdings im Zeitverlauf weiter an, sodass ein signifikanter Anstieg im zwischen dem 4 und 8 Wochen Zeitpunkt sichtbar wurde ($p = 0,0343$).

Besonderheiten und Einzelfälle bei der Gelenkdegradation

In einigen Fällen zeigten Tiere im Meniskus Strukturen, die sich histologisch wie Knochen darstellten. Dies trat vor allem in DMM-operierten Beinen auf, aber auch teilweise nach sham-OP oder bei unbehandelten Tieren. In Abbildung 28 wird dies anhand eines stark geschädigten Gelenks beispielhaft dargestellt. Der hier dargestellte, veränderte Meniskus bestand hauptsächlich aus eingewanderten Zellen und kaum noch aus Faserknorpel. Im Zentrum zeigten sich Strukturen, welche sich wie trabekuläre Knochenareale mit Knochenmark darstellten und anfärbten (B). Auch bei der Knorpelfärbung mit Safranin-O (C) und der Übersichtsfärbung nach Masson-Goldner (D) sah man, dass diese Bereiche des Meniskus nicht mehr wie Knorpelgewebe angefärbt wurden, sondern ein Färbeverhalten wie Knochen aufwiesen.

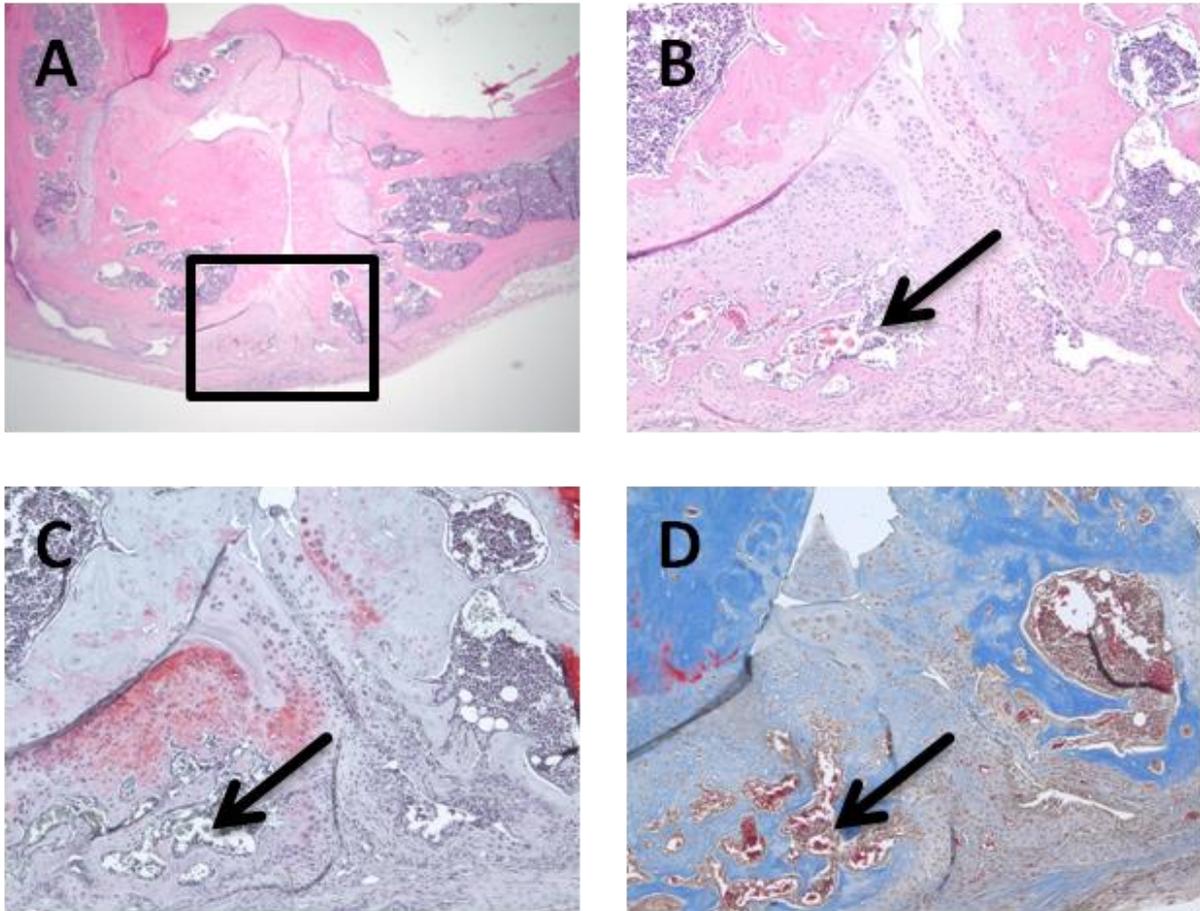


Abbildung 28: Verknöcherung im geschädigten Meniskus einer C57Bl/6 Maus mit DMM-Operation. A zeigt den Bereich im Gelenk, in welchem die Verknöcherungen zu finden waren (25x Vergrößerung, HE Färbung). B: Im Bereich der Menisken befinden sich Gewebestrukturen, welche sich wie trabekulärer Knochen mit Knochenmark anfärbte (Pfeil) (50x Vergrößerung, HE-Färbung). C: Die Safranin-O-Färbung ist eine Knorpelfärbung, um darzustellen, dass die beschriebenen Strukturen nicht angefärbt werden (Pfeil) und somit nicht aus Knorpelgewebe bestehen (100x Vergrößerung). D: In der Masson-Goldner Färbung zeigte sich eine starke Blaufärbung von mineralisiertem Knochen und eine dunkle Rotfärbung des Knochenmarks (Pfeil) (100x Vergrößerung).

Metabolische Veränderungen

Körpergewicht

Das Körpergewicht aller Mäuse wurde zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme bestimmt, und später mit anderen Parametern korreliert. Es wurde davon ausgegangen, dass die Gewichte innerhalb der einzelnen Gruppen zufällig verteilt sind. Zur Überprüfung wurde daher für die 10 Tiere, welche unter ND und mit DMM-Operation gehalten wurden, ein Test auf Normalverteilung gemacht, welcher negativ ausfiel (D'Agostino & Pearson omnibus normality test zeigte einen p-Wert von 0,4997). Daher wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass die Verteilung in allen Gruppen zufällig ist.

Bei der Auswertung der Gewichte zeigte sich, dass bei gesunden Kontrolltieren ohne operativen Eingriff das Körpergewicht sowohl mit ND als auch mit HFD über die Zeit von 4 bis 8 Wochen weitgehend konstant blieb. Dies war von Bedeutung, da für das Tiermodell zunächst durch die Umstellung des Futters vor der DMM-Induktion eine metabolische Veränderung bewirkt werden sollte

und sich dann erst die OA entwickeln sollte. Es sollten nicht beide Veränderungen parallel stattfinden. Dies wurde über die Untersuchung des Gewichts der Tiere bestätigt. Die DMM-Tiere unter ND zeigten einen konstanten Anstieg des Körpergewichts, wobei der Unterschied zwischen Woche vier und acht signifikant ist. Unter HFD stieg das Gewicht der DMM-Tiere zwischen Woche vier und sechs signifikant an, sank dann jedoch wieder etwas ab (Abbildung 29).

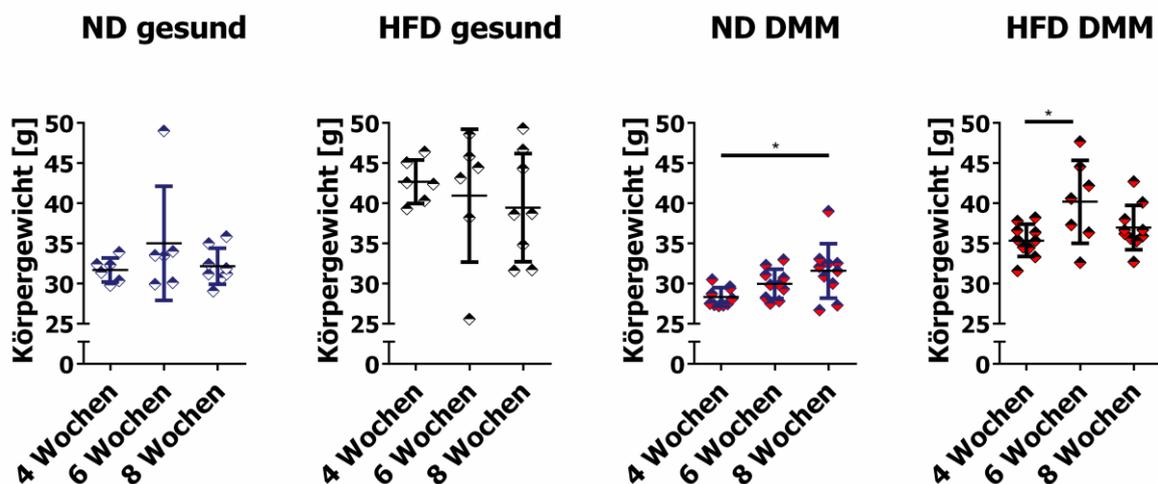


Abbildung 29: Körpergewicht im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD und mit bzw. ohne DMM-Operation. Sowohl unter ND als auch unter HFD (dargestellt in den beiden linken Grafiken) blieb das Körpergewicht im untersuchten Zeitraum bei gesunden Tieren über die Zeit relativ konstant. Bei Tieren mit induzierter Arthrose stieg das Körpergewicht unter ND konstant an, sodass sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem 4 und 8 Wochenzeitpunkt ergab ($p = 0,0116$). Unter HFD und nach induzierter Arthrose stieg das Gewicht signifikant an zwischen 4 und 6 Wochen ($p = 0,0189$), ging dann jedoch wieder leicht zurück.

Betrachtet man nun die verschiedenen Behandlungsgruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten, so zeigte sich, dass vier Wochen nach OP sowohl die DMM-Tiere unter ND, als auch die unter HFD signifikant leichter waren als die entsprechende gesunde Kontrollgruppe ohne operativen Eingriff. Der Gewichtsverlust könnte somit auf den operativen Eingriff zurückzuführen sein. Nach sechs und acht Wochen war kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den DMM-Gruppen und den entsprechenden gesunden Kontrollen ohne OP zu sehen. Die HFD-Tiere mit DMM waren zu allen Zeitpunkten signifikant schwerer als die ND-Tiere der mit DMM (4 Wochen $p = < 0,0001$; 6 Wochen $p = 0,0055$; 8 Wochen $p = 0,0263$). Auch in der gesunden Kontrollgruppe ohne OP waren die HFD-Tiere signifikant schwerer nach 4 und 8 Wochen (4 Wochen $p = < 0,0001$; 8 Wochen $p = 0,0055$) jedoch nicht signifikant nach 6 Wochen ($p = 0,2807$) (Abbildung 30). Die HFD zeigt somit in C57Bl/6-Mäusen die erwartete Gewichtszunahme.

Die Werte der Körpergewichte mit entsprechender statistischer Auswertung sind in Tabelle 12 dargestellt.

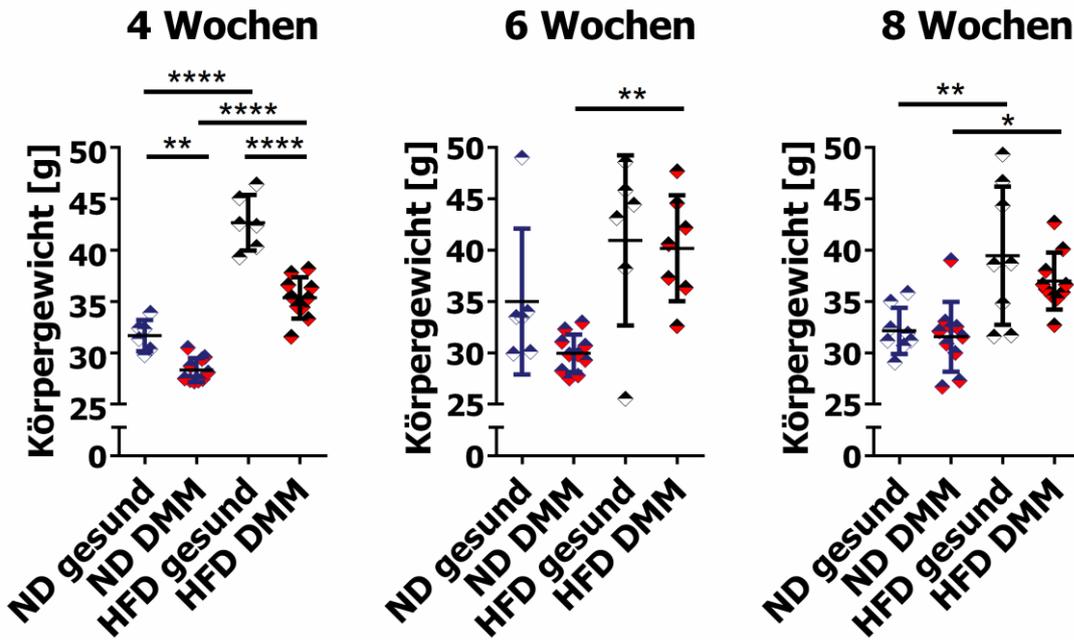


Abbildung 30: Körpergewicht 4 (links), 6 (Mitte) und 8 Wochen (rechts) nach der DMM-Operation. Das Körpergewicht war bei DMM-operierten Tieren durch die HFD immer signifikant höher als unter ND (4 Wochen $p < 0,0001$; 6 Wochen $p = 0,0055$; 8 Wochen $p = 0,0263$). Bei gesunden Tieren war das Körpergewicht ebenfalls immer höher unter HFD, dies war jedoch nur zum frühen und späten Zeitpunkt signifikant (4 Wochen $p < 0,0001$; 6 Wochen $p = 0,2807$; 8 Wochen $p = 0,0055$). Die Arthrose führte immer zu einer Verringerung des Gewichts im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe, dies war allerdings nur zum frühesten Zeitpunkt signifikant (ND gesund vs. DMM $p = 0,0081$; HFD gesund vs. DMM $p < 0,0001$).

Tabelle 12: Körpergewichte der verschiedenen Behandlungsgruppen vier, sechs und acht Wochen nach DMM-Operation

| 4 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|--------------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 10 | 6 | 10 |
| Minimum [g] | 29,76 | 27,22 | 39,29 | 31,57 |
| 25 % Perzentile | 30,2 | 27,32 | 40,06 | 34,14 |
| Median [g] | 31,83 | 27,8 | 42,48 | 35,42 |
| 75 % Perzentile | 32,78 | 29,45 | 45,4 | 36,9 |
| Maximum [g] | 33,9 | 30,5 | 46,4 | 38,21 |
| Mittelwert [g] | 31,68 | 28,31 | 42,67 | 35,36 |
| Standardabweichung | 1,51 | 1,174 | 2,71 | 2,021 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,6163 | 0,3712 | 1,106 | 0,6391 |
| 6 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 10 | 6 | 7 |
| Minimum [g] | 29,92 | 27,5 | 25,53 | 32,6 |
| 25 % Perzentile | 30,05 | 28,12 | 35,03 | 36,35 |
| Median [g] | 33,47 | 29,85 | 43,78 | 40,57 |
| 75 % Perzentile | 37,76 | 31,37 | 46,49 | 44,55 |
| Maximum [g] | 49,02 | 32,98 | 48,55 | 47,68 |
| Mittelwert [g] | 34,99 | 29,96 | 40,94 | 40,18 |
| Standardabweichung | 7,102 | 1,842 | 8,288 | 5,163 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 2,899 | 0,5824 | 3,383 | 1,952 |
| 8 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 8 | 10 | 8 | 10 |
| Minimum [g] | 29,05 | 26,7 | 31,6 | 32,7 |
| 25 % Perzentile | 30,81 | 29,33 | 32,48 | 35,53 |
| Median [g] | 31,54 | 31,83 | 38,65 | 36,43 |
| 75 % Perzentile | 34,35 | 32,67 | 46,06 | 38,53 |
| Maximum [g] | 35,85 | 39,03 | 49,3 | 42,7 |
| Mittelwert [g] | 32,16 | 31,57 | 39,46 | 36,98 |
| Standardabweichung | 2,253 | 3,412 | 6,729 | 2,759 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,7966 | 1,079 | 2,379 | 0,8726 |

Leber-Score

Bei der Erstellung des Leber-Scores zeigte sich, dass die verfetteten Leberzellen teilweise in Clustern vorlagen, teilweise aber auch gleichmäßig verteilt waren (Abbildung 31).

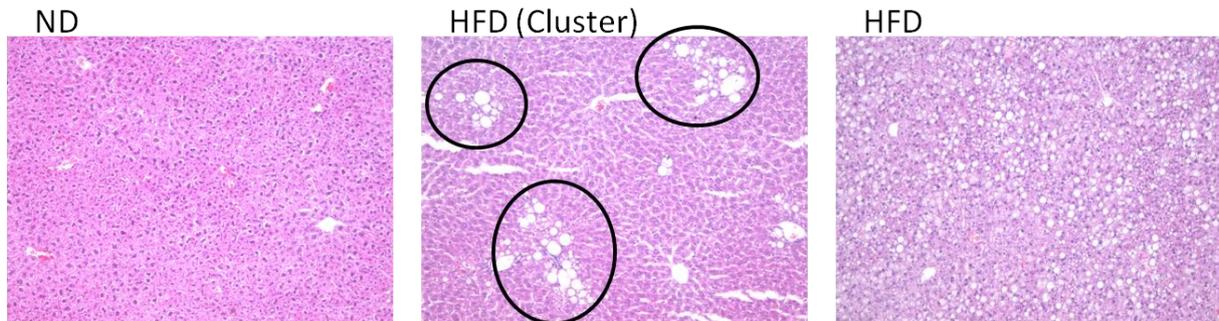


Abbildung 31: Histologische Übersichtsfärbung (H/E) der Leber zur Auswertung der Verfettung des Gewebes im Vergleich zwischen HFD und ND. Links die Leber eines gesunden Tiers unter ND zeigte keine Fettvakuolen innerhalb der Zellen. Unter HFD (Mitte und rechts) waren Fettvakuolen in den Zellen sichtbar, je nachdem, ob der Leberlappen der Länge nach oder quer geschnitten wurde, waren die Fettvakuolen in Clustern angeordnet oder gleichmäßig verteilt.

Der Grad der Verfettung der Leber wurde wie auf Seite 35 beschrieben gescored. Hierbei zeigt sich, dass die Kontrolltiere (komplett ohne OP) über die Zeit keine Veränderungen des Leber-Scores aufweisen (Abbildung 32). Auch Tiere der DMM-Gruppe unter ND hatten einen konstanten Leber-Score über die Zeit. Bei der Kombination von DMM und HFD stieg der Leber-Score über die Zeit an und unterschied sich signifikant zwischen dem 4- und 8-Wochen-Zeitpunkt (Abbildung 32, rechts). Dabei war der Vier-Wochen-Zeitpunkt der DMM/HFD deutlich niedriger als in der HFD/gesunden Kontrollgruppe, über die Zeit gleich sich der Leber-Score dann etwa an den dieser Kontrollgruppe, also den gesunden Tiere mit HFD, an.

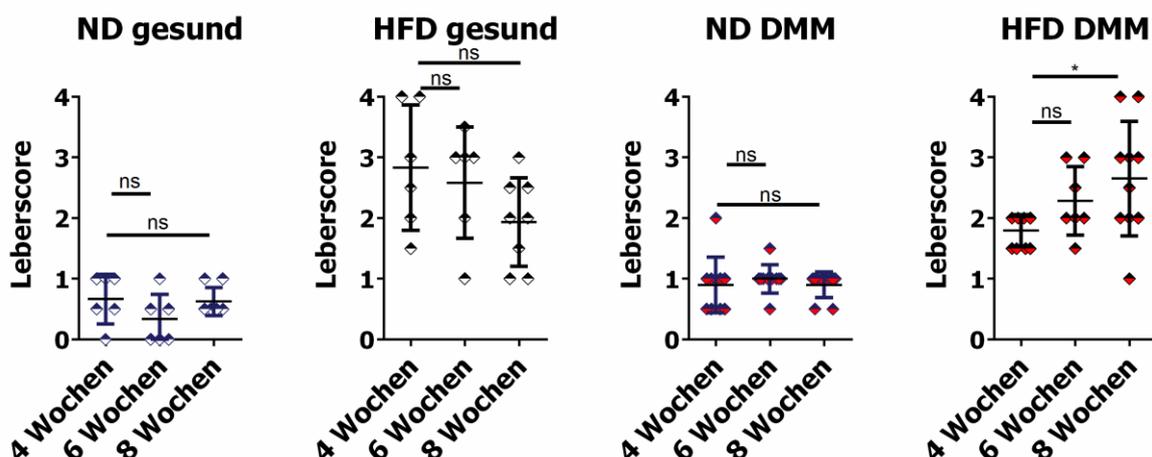


Abbildung 32: Leber-Score im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD und mit bzw. ohne DMM-Operation. Bei den gesunden Tieren und auch den Tieren unter ND kombiniert mit Arthroseinduktion, veränderte sich der Leber-Score nicht signifikant im Zeitverlauf. Wenn eine Arthrose induziert wurde und die Tiere eine HFD bekamen (rechts), stieg der Leber-Score über die Zeit an, sodass ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren nach 4 und 8 Wochen darstellbar ist ($p = 0,0246$).

Der Vergleich der Leber-Scores zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen, also ND gesund mit HFD gesund und ND DMM mit HFD DMM zum jeweiligen Zeitpunkt, zeigte, dass dieser durch die HFD immer erhöht wird, in fünf Fällen signifikant, im letzten nicht (Abbildung 33). Hierdurch wurde bestätigt, dass die HFD die Physiologie der Leber und somit auch den Metabolismus der Tiere deutlich beeinflusste und veränderte.

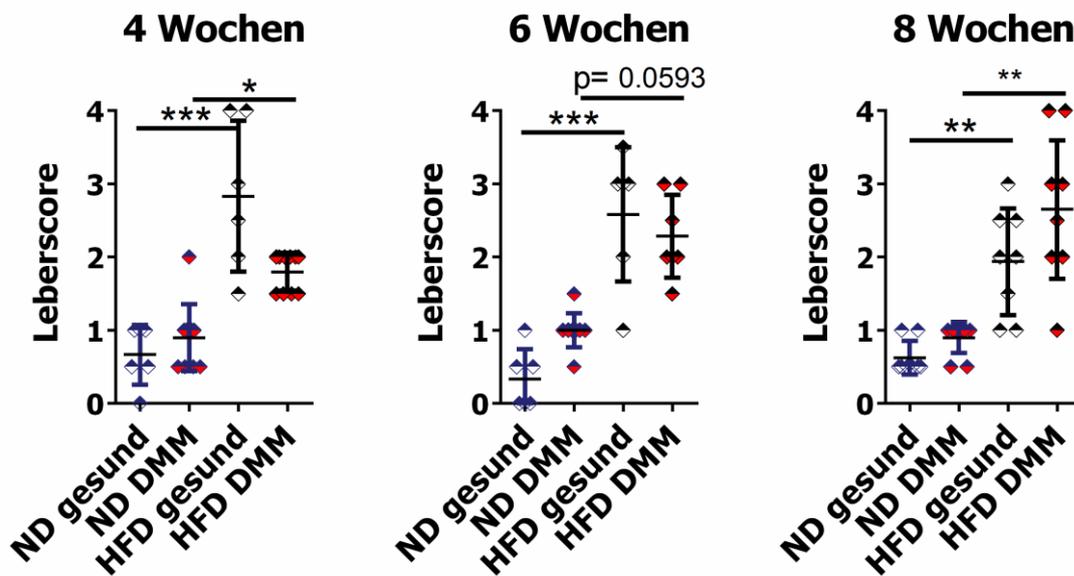


Abbildung 33: Leber-Score 4 (links), 6 (Mitte) und 8 Wochen (rechts) nach DMM-Operation in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD. Der Leber-Score war immer erhöht unter HFD im Vergleich zur entsprechenden ND Gruppe, dies war nach 4 und 8 Wochen immer signifikant, nach 6 Wochen nur bei den gesunden Tieren signifikant. (4 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p = 0,0010$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,0226$; 6 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p = 0,0006$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,0593$; 8 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p = 0,0054$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,0031$).

Die Werte der Leber-Scores sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Leber-Score der verschiedenen Behandlungsgruppen vier, sechs und acht Wochen nach DMM-Operation

| 4 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|--------------------------------------|-----------|---------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 10 | 6 | 10 |
| Minimum | 0 | 0,5 | 1,5 | 1,5 |
| 25 % Perzentile | 0,375 | 0,5 | 1,875 | 1,5 |
| Median | 0,75 | 1 | 2,75 | 2 |
| 75 % Perzentile | 1 | 1 | 4 | 2 |
| Maximum | 1 | 2 | 4 | 2 |
| Mittelwert | 0,6667 | 0,9 | 2,833 | 1,8 |
| Standardabweichung | 0,4082 | 0,4595 | 1,033 | 0,2582 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,1667 | 0,1453 | 0,4216 | 0,08165 |
| 6 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 6 | 10 | 6 | 7 |
| Minimum | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 |
| 25 % Perzentile | 0 | 1 | 1,75 | 2 |
| Median | 0,25 | 1 | 3 | 2 |
| 75 % Perzentile | 0,625 | 1 | 3,125 | 3 |
| Maximum | 1 | 1,5 | 3,5 | 3 |
| Mittelwert | 0,3333 | 1 | 2,583 | 2,286 |
| Standardabweichung | 0,4082 | 0,2357 | 0,9174 | 0,5669 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,1667 | 0,07454 | 0,3745 | 0,2143 |
| 8 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 8 | 10 | 8 | 10 |
| Minimum | 0,5 | 0,5 | 1 | 1 |
| 25 % Perzentile | 0,5 | 0,875 | 1,125 | 2 |
| Median | 0,5 | 1 | 2 | 2,75 |
| 75 % Perzentile | 0,875 | 1 | 2,5 | 3,25 |
| Maximum | 1 | 1 | 3 | 4 |
| Mittelwert | 0,625 | 0,9 | 1,938 | 2,65 |
| Standardabweichung | 0,2315 | 0,2108 | 0,7289 | 0,9443 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 0,08183 | 0,06667 | 0,2577 | 0,2986 |

Um auszuschließen, dass die Tiere eine Leberfibrose entwickelt haben, welche den Leber-Score oder auch generell den Gesundheitszustand der Tiere beeinflussen könnte, wurden histologische Schnitte von den Lebern einiger Tiere nach Masson-Goldner gefärbt. Dabei würden sich fibrotische Veränderungen blau darstellen. Es konnte jedoch in keinem der untersuchten Gewebe eine Fibrose nachgewiesen werden (Abbildung 34).

ND

HFD

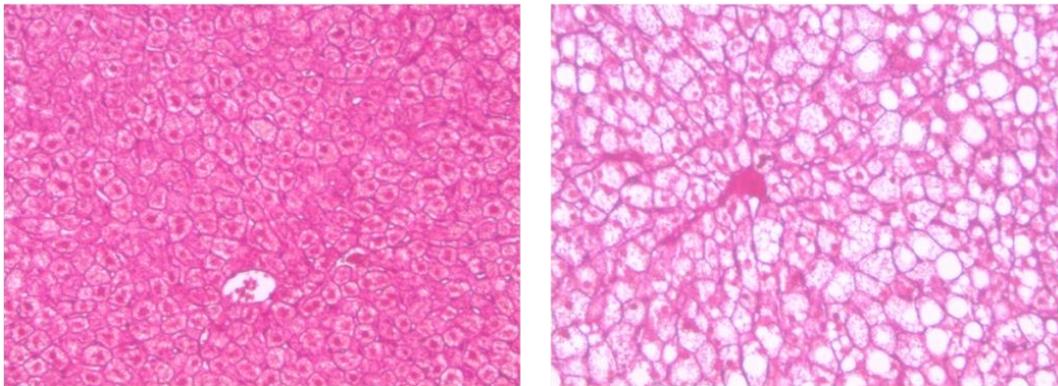


Abbildung 34: Masson-Goldner Färbung der Leber (links ND gesund, rechts HFD gesund) zum Ausschluss einer fibrotischen Veränderung des Lebergewebes. Wäre eine fibrotische Veränderung vorhanden, so würde sich diese blau darstellen.

Toluidinblau-Färbung – chronic low-grade inflammation

Durch die Färbung des Fettgewebes mit Toluidinblau zeigte sich, dass bei Tieren, welche mit ND gefüttert wurden, die Adipozyten relativ klein und gleichmäßig verteilt waren, während durch die Fütterung mit HFD die Adipozyten deutlich größer waren und weitere Zellen in das Gewebe einwanderten, die sog. „crown-like structures“ (CLS) ausbildeten (Abbildung 35). Diese wurden bereits von anderen Forschungsgruppen immunhistologisch charakterisiert. So wurde von Xu *et al.* gezeigt, dass es sich bei den infiltrierten Zellen um Makrophagen handelt⁴³. Zählte man die Anzahl der Adipozyten in einem bestimmten Gesichtsfeld und bestimmte die prozentuale Anzahl derjenigen Zellen, welche CLS aufzeigten, so zeigte sich beim Vergleich der gesunden (ohne DMM) Tiere mit ND und HFD eine signifikante Erhöhung der CLS durch die HFD (Abbildung 35).

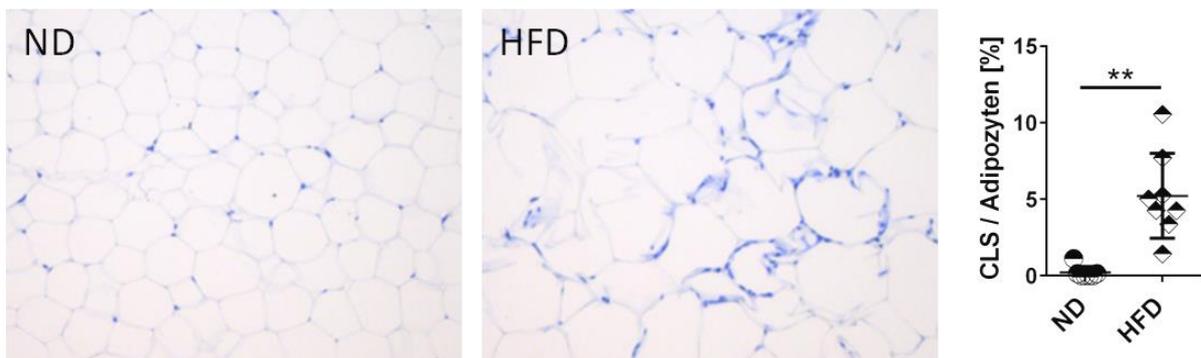


Abbildung 35: Histologische Färbung des Fettgewebes mit Toluidinblau zur Quantifizierung der crown-like structures. Das Fettgewebe verändert sich durch die HFD, sodass die Adipozyten deutlich vergrößert werden (beide Abbildungen links und Mitte 100x Vergrößerung) und mehr Zellen zwischen die Adipozyten einwandern. Pro Bildausschnitt sind signifikant mehr dieser von eigenwanderten Zellen umgebenen Adipozyten (CLS) unter HFD als unter ND (rechts).

Systemische Adipokinspiegel

Um eine systemische Entzündung zum Zeitpunkt der Analyse und eine daraus resultierende Verfälschung der Daten auszuschließen, wurde bei allen Tieren die IL-6-Konzentration im Serum

mittels ELISA gemessen. Das verwendete Kit ist so ausgelegt, dass gesunde IL-6-Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits liegen, bei systemischer Entzündung jedoch IL-6 detektiert wird. Für alle Tiere der DMM-Serie konnte wie erwartet im Gegensatz zur CIA kein IL-6 gemessen und somit eine systemische Entzündung ausgeschlossen werden.

Adiponektin

Die Serumspiegel von Adiponektin unterschieden sich zwischen den meisten Gruppen nicht signifikant. Vier und sechs Wochen nach Arthroseinduktion waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Erst nach acht Wochen wiesen die gesunden Kontrollmäuse unter HFD einen signifikant niedrigeren Adiponektinspiegel als diejenigen unter ND auf. Einzig zum spätesten Zeitpunkt führte die DMM-Induktion zur Erhöhung des Adiponektins und war in Kombination mit HFD signifikant, jedoch nicht unter ND ($p = 0,0008$) (Abbildung 36).

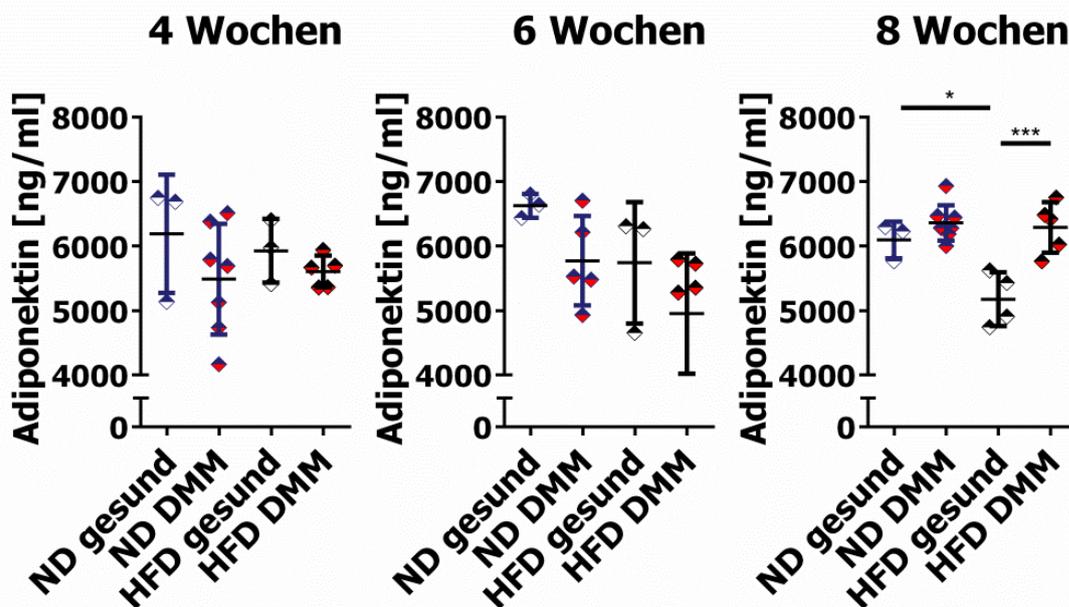


Abbildung 36: Serologische Adiponektinspiegel 4, 6 und 8 Wochen nach DMM-OP in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD. Nach 4 (links) und 6 (Mitte) Wochen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen sichtbar. Am spätesten Zeitpunkt, 8 Wochen nach DMM-OP, war in den gesunden Kontrollgruppen eine signifikante Herunterregulation des Adiponektins durch HFD im Vergleich zu ND sichtbar ($p = 0,0127$). Unter HFD zeigte sich außerdem 8 Wochen nach DMM-OP eine signifikante Erhöhung des Adiponektins durch die DMM-Induktion ($p = 0,0008$).

In den gesunden Kontrolltieren ohne OP veränderte sich der Adiponektinspiegel über die Zeit nicht signifikant, sowohl unter HFD als auch ND. Der Verlauf der Arthrose unter DMM führte jedoch bei Tieren mit ND zu einem konstanten Anstieg und zu einem signifikant höheren Adiponektinspiegel nach acht Wochen, im Vergleich zum Vier-Wochen-Zeitpunkt (Abbildung 37). Die Konzentration von Adiponektin im Serum wurden mittels ELISA gemessen und sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

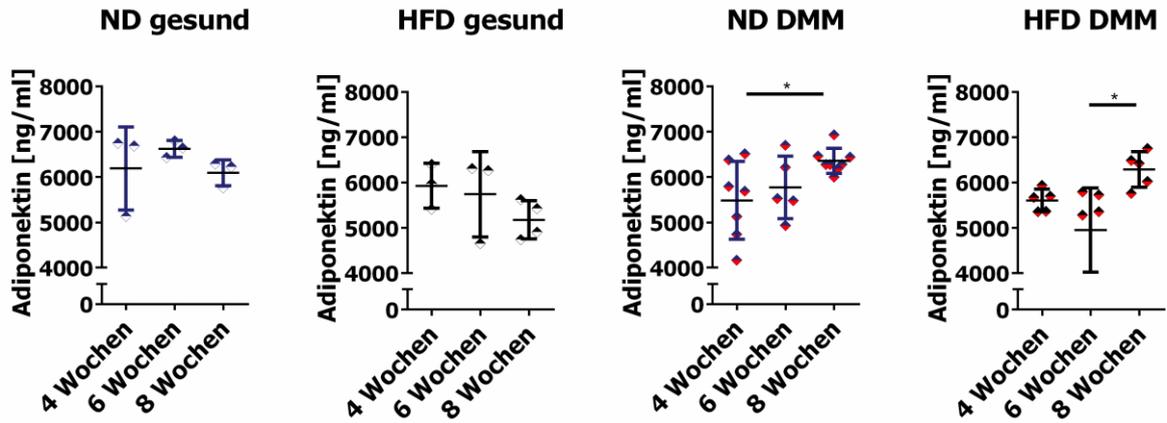


Abbildung 37: Serologische Adiponektinspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD und mit bzw. ohne DMM-Operation. Innerhalb der gesunden Tiergruppen zeigte sich im Verlauf keine Veränderung an, wohingegen nach DMM-Operation der Adiponektinspiegel zwischen der vierten und achten Woche anstieg, was sich unter ND in einem signifikanten Unterschied zwischen 4 und 8 Wochen ($p = 0,0419$) und unter HFD in einem signifikanten Unterschied zwischen 6 und 8 Wochen ($p = 0,0103$) zeigte.

Tabelle 14: Serologische Adiponektinspiegel der verschiedenen Behandlungsgruppen vier, sechs und acht Wochen nach DMM-Operation

| 4 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|--------------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 7 | 3 | 5 |
| Minimum [ng/ml] | 5134 | 4168 | 5410 | 5359 |
| 25 % Perzentile | 5134 | 4735 | 5410 | 5361 |
| Median [ng/ml] | 6690 | 5690 | 5975 | 5669 |
| 75 % Perzentile | 6749 | 6381 | 6399 | 5817 |
| Maximum [ng/ml] | 6749 | 6512 | 6399 | 5940 |
| Mittelwert [ng/ml] | 6191 | 5486 | 5928 | 5605 |
| Standardabweichung | 915,8 | 858,2 | 496,1 | 246,6 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 528,7 | 324,4 | 286,4 | 110,3 |
| 6 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 5 | 3 | 6 |
| Minimum [ng/ml] | 6435 | 4929 | 4653 | 3718 |
| 25 % Perzentile | 6435 | 5204 | 4653 | 3810 |
| Median [ng/ml] | 6639 | 5526 | 6264 | 5316 |
| 75 % Perzentile | 6800 | 6459 | 6309 | 5745 |
| Maximum [ng/ml] | 6800 | 6703 | 6309 | 5790 |
| Mittelwert [ng/ml] | 6625 | 5770 | 5742 | 4952 |
| Standardabweichung | 182,7 | 692,9 | 943,2 | 930,8 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 105,5 | 309,9 | 544,6 | 380 |
| 8 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 8 | 4 | 5 |
| Minimum [ng/ml] | 5764 | 6001 | 4743 | 5764 |
| 25 % Perzentile | 5764 | 6210 | 4785 | 5894 |
| Median [ng/ml] | 6228 | 6282 | 5168 | 6421 |
| 75 % Perzentile | 6291 | 6461 | 5576 | 6619 |
| Maximum [ng/ml] | 6291 | 6933 | 5625 | 6754 |
| Mittelwert [ng/ml] | 6094 | 6359 | 5176 | 6290 |
| Standardabweichung | 287,7 | 273,7 | 417,7 | 393 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 166,1 | 96,77 | 208,9 | 175,7 |

Leptin

Die systemischen Leptinwerte reagierten vor allem auf die HFD, demnach war in allen Vergleichsgruppen der Leptinspiegel bei HFD im Vergleich zur ND höher und dies war stets signifikant, mit Ausnahme der DMM-Tiere nach 8 Wochen. Vergleichsgruppe bedeutet in diesem Zusammenhang, dass gesunde Tiere mit gesunden Tieren zum selben Zeitpunkt aber mit der jeweils anderen Diät verglichen werden. Da bereits beschrieben wurde, dass Insulinresistenz mit Leptinresistenz einhergeht¹⁰², stellen diese Ergebnisse ein starkes Indiz für eine induzierte Insulinresistenz durch die HFD dar. Die Leptinwerte reagierten aber auch auf die OA-Induktion, sodass DMM-Tiere stets einen niedrigeren Leptinspiegel aufwiesen als die entsprechende Kontrollgruppe ohne OP unter HFD sowie ND, dies ist jedoch nur zum frühesten Zeitpunkt unter HFD signifikant (Abbildung 38).

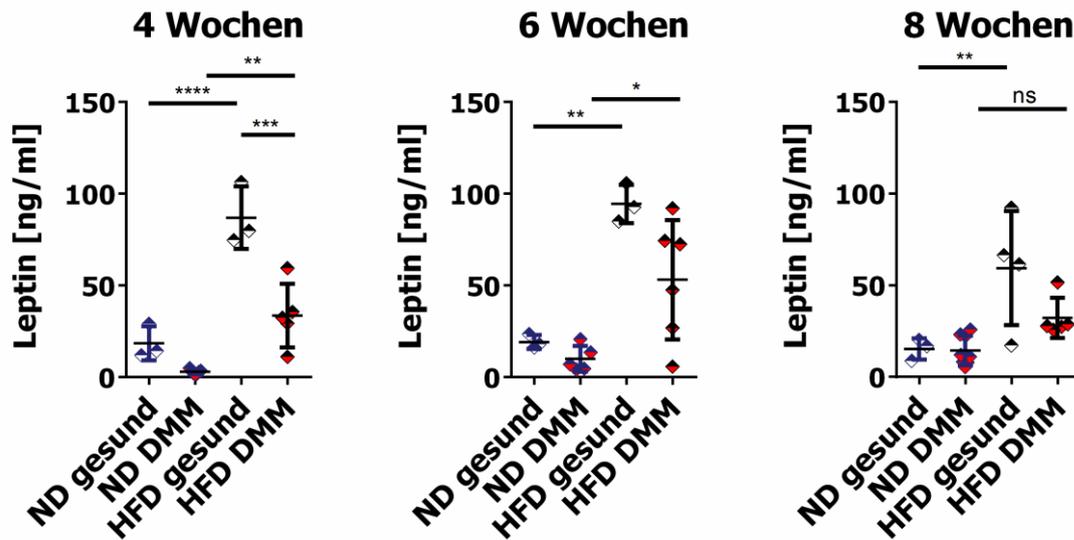


Abbildung 38: Serologische Leptinspiegel 4, 6 und 8 Wochen nach DMM-OP in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD. Deutlich sichtbar war zu jedem Zeitpunkt die Hochregulation des Leptinspiegels durch HFD im Vergleich zur entsprechenden Behandlungsgruppe (4 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p < 0,0001$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,0028$; 6 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p = 0,0036$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,0223$; 8 Wochen ND gesund vs. HFD gesund $p = 0,0095$, ND DMM vs. HFD DMM $p = 0,2292$). Außerdem wurde der Leptinspiegel durch die Arthroseinduktion reduziert, dies war zwar konsistent bei allen DMM Gruppen im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle, jedoch nur unter HFD nach 4 Wochen signifikant ($p = 0,0001$).

Betrachtet man die Entwicklung der Leptinspiegel über die Zeit, so zeigte sich insgesamt ein sehr homogenes Bild bei der ND (Abbildung 38). Die gesunden Kontrolltiere zeigten keine signifikanten Änderungen zu den verschiedenen Zeitpunkten, wobei allerdings die Streuung der Leptin-Einzelwerte unter HFD erhöht war, dies zeigt sich ebenso bei Kombination von DMM und HFD.

Unter ND stieg der Leptinspiegel im Verlauf der OA bei den DMM-Tieren kontinuierlich an, sodass nach acht Wochen signifikant mehr Leptin messbar war als nach vier Wochen. Dieser Effekt ging durch die Einflüsse der HFD verloren (Abbildung 39). Die Leptinwerte im Serum wurden mittels ELISA gemessen und sind in Tabelle 15 dargestellt.

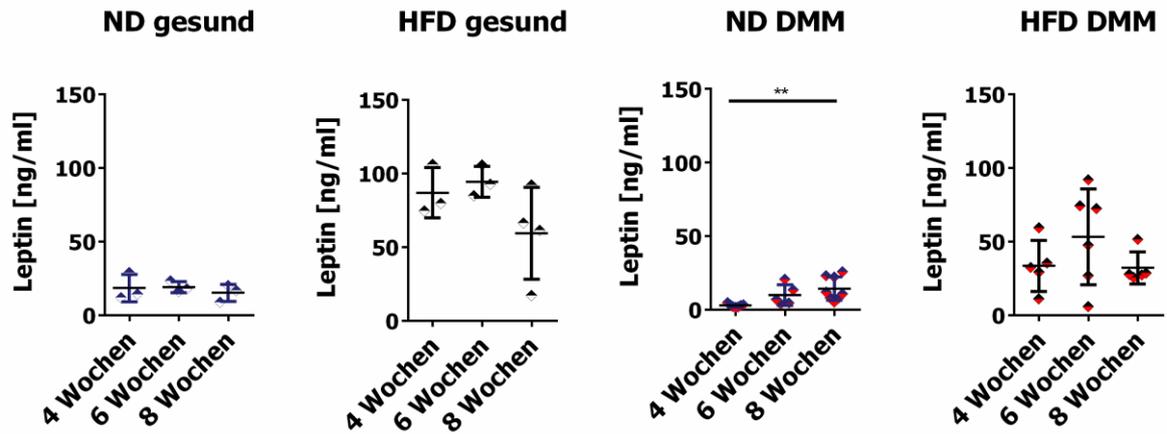


Abbildung 39: Serologische Leptinspiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD und mit bzw. ohne DMM-Operation. Dabei zeigten sich in den gesunden Tieren unter beiden Diäten keine Veränderungen über die Zeit, wohingegen unter ND nach DMM der Leptinspiegel im Verlauf anstieg (signifikanter Unterschied zwischen 4 und 8 Wochen $p = 0,0060$). Unter HFD waren die Werte stärker gestreut, sodass sich keine Signifikanz ergab.

Tabelle 15: Serologische Leptinspiegel der verschiedenen Behandlungsgruppen vier, sechs und acht Wochen nach DMM-Operation

| 4 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|---|------------------|---------------|-------------------|----------------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 7 | 3 | 5 |
| Minimum [ng/ml] | 11,91 | 1,666 | 74,73 | 11,05 |
| 25 % Perzentile | 11,91 | 1,875 | 74,73 | 20,15 |
| Median [ng/ml] | 14,33 | 2,79 | 79,77 | 32,42 |
| 75 % Perzentile | 29,03 | 3,394 | 106,3 | 47,55 |
| Maximum [ng/ml] | 29,03 | 4,976 | 106,3 | 59,48 |
| Mittelwert [ng/ml] | 18,42 | 2,882 | 86,94 | 33,56 |
| Standardabweichung | 9,267 | 1,134 | 16,97 | 17,34 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 5,35 | 0,4285 | 9,798 | 7,753 |
| 6 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 5 | 3 | 6 |
| Minimum [ng/ml] | 16,13 | 4,217 | 84,96 | 5,752 |
| 25 % Perzentile | 16,13 | 4,47 | 84,96 | 21,55 |
| Median [ng/ml] | 17,94 | 7,061 | 92,69 | 59,95 |
| 75 % Perzentile | 23,42 | 17,15 | 105,8 | 78,73 |
| Maximum [ng/ml] | 23,42 | 20,7 | 105,8 | 92,12 |
| Mittelwert [ng/ml] | 19,16 | 10,06 | 94,47 | 53,14 |
| Standardabweichung | 3,797 | 7,024 | 10,52 | 32,58 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 2,192 | 3,141 | 6,074 | 13,3 |
| 8 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 8 | 4 | 5 |
| Minimum [ng/ml] | 8,844 | 5,266 | 17,2 | 25,68 |
| 25 % Perzentile | 8,844 | 7,921 | 28,27 | 26,51 |
| Median [ng/ml] | 16,8 | 11,49 | 63,98 | 27,85 |
| 75 % Perzentile | 20,18 | 22,91 | 85,82 | 40,13 |
| Maximum [ng/ml] | 20,18 | 25,77 | 92,26 | 51,54 |
| Mittelwert [ng/ml] | 15,27 | 14,42 | 59,35 | 32,23 |
| Standardabweichung | 5,818 | 8,017 | 31,17 | 10,85 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 3,359 | 2,834 | 15,59 | 4,853 |

Visfatin

Visfatin veränderte sich in den Modellen nur gering, so waren bei Visfatin weder durch die Diäten noch durch die DMM-Induktion Veränderungen sichtbar (Abbildung 40).

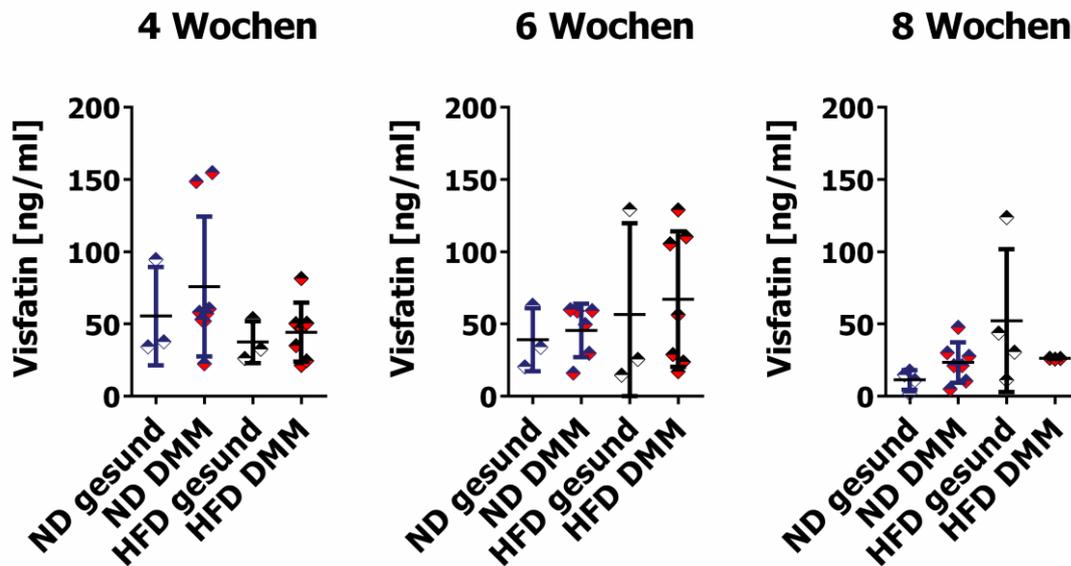


Abbildung 40: Serologische Visfatinspiegel 4, 6 und 8 Wochen nach DMM-OP in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD. Insgesamt zeigten sich kaum Veränderungen der Visfatinspiegel, sowohl durch die Diät als auch durch die Arthrose.

Im Zeitverlauf zeigte sich, dass gesunde Tiere unter ND einen leichten Abfall des Visfatinlevels aufwiesen. Die Werte der gesunden Tiere unter HFD waren deutlich stärker gestreut (größere Standardabweichung) als diejenigen unter ND, zeigten aber ansonsten keine Veränderung über die Zeit. Bei Kombination von ND und DMM sank der Visfatinspiegel kontinuierlich über die Zeit ab, wobei der Unterschied zwischen dem 4- und 8-Wochen-Zeitpunkt signifikant war. Dieser Effekt war unter HFD nicht mehr sichtbar, hier war die Streuung der Werte nach sechs Wochen zu groß, um eine gerichtete Entwicklung abbilden zu können (Abbildung 41). Die einzelnen Werte sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

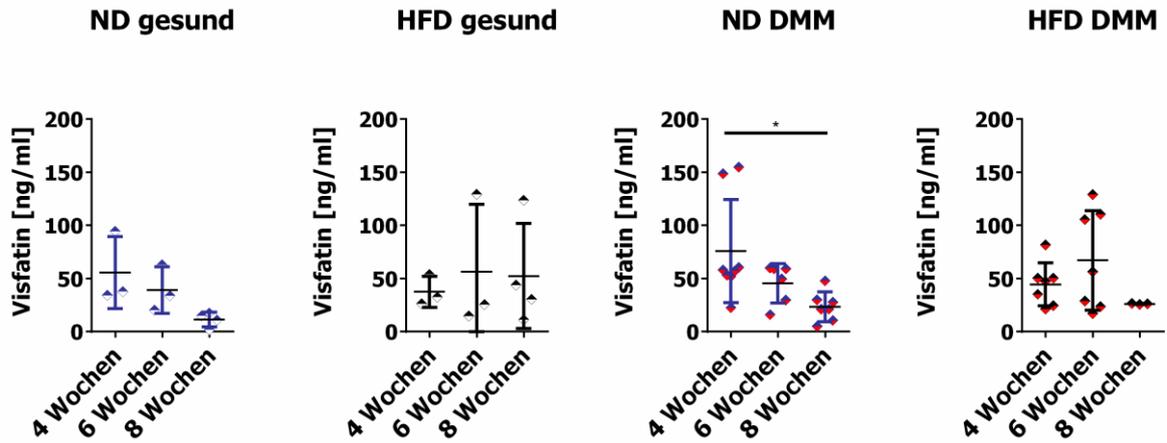


Abbildung 41: Serologische Visfatin Spiegel im Zeitverlauf innerhalb der Behandlungsgruppen in C57Bl/6 Mäusen mit ND bzw. HFD und mit bzw. ohne DMM-Operation. In gesunden Tieren unter ND (links) zeigte sich im Zeitverlauf eine Abwärtsentwicklung, welche jedoch nicht signifikant war. Unter HFD (Mitte links) waren die Werte breiter gestreut und es war in der gesunden Kontrollgruppe keine Veränderung zwischen den Zeitpunkten messbar. Unter ND zeigte sich in der Gruppe mit Arthrose (Mitte rechts) eine Abwärtsentwicklung, wobei die Differenz zwischen 4 Wochen und 8 Wochen signifikant war ($p = 0,0162$). Unter HFD (rechts) zeigte sich, dass die Werte zum 6-Wochen-Zeitpunkt verhältnismäßig stark gestreut waren, sodass der Mittelwert zwar höher war als der, der beiden anderen Zeitpunkte, dies war jedoch nicht signifikant.

Tabelle 16: Serologische Visfatinspiegel der verschiedenen Behandlungsgruppen vier, sechs und acht Wochen nach DMM-Operation

| 4 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
|--------------------------------------|-----------|--------|------------|---------|
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 8 | 3 | 7 |
| Minimum [ng/ml] | 34,2 | 22,61 | 26,31 | 21,46 |
| 25 % Perzentile | 34,2 | 52,27 | 26,31 | 24,56 |
| Median [ng/ml] | 37,79 | 57,64 | 32,53 | 47,42 |
| 75 % Perzentile | 94,57 | 126,6 | 53,85 | 50,61 |
| Maximum [ng/ml] | 94,57 | 154,8 | 53,85 | 81,66 |
| Mittelwert [ng/ml] | 55,52 | 75,86 | 37,56 | 44,47 |
| Standardabweichung | 33,87 | 48,32 | 14,44 | 20,32 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 19,55 | 17,08 | 8,339 | 7,681 |
| 6 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 3 | 6 | 3 | 7 |
| Minimum [ng/ml] | 20,46 | 16,1 | 14,81 | 17,03 |
| 25 % Perzentile | 20,46 | 26,32 | 14,81 | 23,67 |
| Median [ng/ml] | 33,97 | 54,46 | 25,52 | 56,33 |
| 75 % Perzentile | 63,09 | 59,39 | 129,3 | 110,5 |
| Maximum [ng/ml] | 63,09 | 59,85 | 129,3 | 128,9 |
| Mittelwert [ng/ml] | 39,17 | 45,64 | 56,53 | 67,26 |
| Standardabweichung | 21,79 | 18,51 | 63,21 | 46,8 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 12,58 | 7,555 | 36,49 | 17,69 |
| 8 Wochen | ND gesund | ND DMM | HFD gesund | HFD DMM |
| Anzahl der Werte pro Gruppe (n-Zahl) | 4 | 7 | 4 | 3 |
| Minimum [ng/ml] | 1,84 | 5,07 | 11,28 | 25,79 |
| 25 % Perzentile | 4,153 | 10,63 | 16,09 | 25,79 |
| Median [ng/ml] | 13,01 | 21,31 | 37,16 | 26,29 |
| 75 % Perzentile | 16,85 | 30,05 | 103,7 | 26,48 |
| Maximum [ng/ml] | 17,49 | 47,8 | 123,7 | 26,48 |
| Mittelwert [ng/ml] | 11,34 | 23,41 | 52,32 | 26,19 |
| Standardabweichung | 6,854 | 13,95 | 49,41 | 0,3564 |
| Standardfehler des Mittelwerts | 3,427 | 5,272 | 24,71 | 0,2058 |

Korrelationsanalysen

Grundsätzlich zeigt die Korrelation zweier Parameter an, ob ein Zusammenhang zwischen diesen besteht, es ist jedoch in Bezug auf die hier vorgestellten Daten wichtig zu bedenken, dass dieser Zusammenhang nicht unbedingt einen Ursache-Wirkungs-Zusammenhang darstellt. Deshalb werden im Folgenden zunächst die rechnerischen Korrelationen dargestellt und später wird in der Diskussion darauf eingegangen, inwiefern diesen eine Bedeutung zukommen könnte, *cum hoc non est propter hoc* (lat.: „mit diesem ist nicht deswegen“). Im Folgenden wird ab einem r^2 von 0,3 oder mehr von einer Korrelation ausgegangen (in den Tabellen hervorgehoben), dabei zeigt die Höhe des Wertes den Grad der Korrelation an.

Tibia-Score

Im Hinblick auf die Korrelationen zum Tibia-Score (Tabelle 17) fiel auf, dass lediglich innerhalb der Gruppe der DMM-operierten Tiere ein Zusammenhang zum Körpergewicht bestand und dieser mit einem r^2 von 0,33 nicht sehr ausgeprägt war. Die Punkteverteilung in der grafischen Darstellung bestärkte diesen Zusammenhang und lässt vermuten, dass ein erhöhtes Gewicht die Progression der OA verstärkte (Abbildung 42). Interessanterweise korrelierte in diesem Datensatz der Tibia-Score zwar mit dem Körpergewicht ($r^2 = 0,33$), jedoch nicht mit dem Leber-Score ($r^2 = 0,23$) und dem Leptinspiegel ($r^2 = 0,25$), obwohl sowohl der Leber-Score als auch Leptinspiegel durch die HFD bzw. Änderung des Körpergewichts beeinflusst wurden.

Tabelle 17: Korrelationen aller gemessenen Parameter mit dem Tibia-Score ($r^2 > 0,3$ fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Tibia-Score | Leptin | Alle | 0,00782 |
| Tibia-Score | Adiponektin | Alle | 0,00006 |
| Tibia-Score | Visfatin | Alle | 0,00841 |
| Tibia-Score | Leber-Score | Alle | 0,01476 |
| Tibia-Score | Körpergewicht | Alle | 0,05071 |
| Tibia-Score | Leptin | DMM | 0,25480 |
| Tibia-Score | Adiponektin | DMM | 0,02202 |
| Tibia-Score | Visfatin | DMM | 0,00002 |
| Tibia-Score | Leber-Score | DMM | 0,23040 |
| Tibia-Score | Körpergewicht | DMM | 0,32760 |
| Tibia-Score | Leptin | Gesunde Kontrollen | 0,00773 |
| Tibia-Score | Adiponektin | Gesunde Kontrollen | 0,29330 |
| Tibia-Score | Visfatin | Gesunde Kontrollen | 0,11960 |
| Tibia-Score | Leber-Score | Gesunde Kontrollen | 0,03810 |
| Tibia-Score | Körpergewicht | Gesunde Kontrollen | 0,00270 |
| Tibia-Score | Leptin | ND | 0,00429 |
| Tibia-Score | Adiponektin | ND | 0,00159 |
| Tibia-Score | Visfatin | ND | 0,00673 |
| Tibia-Score | Leber-Score | ND | 0,01924 |
| Tibia-Score | Körpergewicht | ND | 0,01736 |
| Tibia-Score | Leptin | HFD | 0,19580 |
| Tibia-Score | Adiponektin | HFD | 0,00561 |
| Tibia-Score | Visfatin | HFD | 0,00726 |
| Tibia-Score | Leber-Score | HFD | 0,04065 |
| Tibia-Score | Körpergewicht | HFD | 0,12920 |

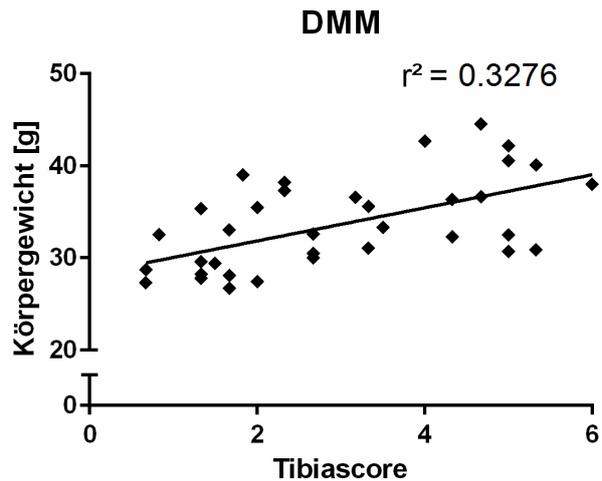


Abbildung 42: Korrelation zwischen Tibia-Score und Körpergewicht, einbezogen sind hier diejenigen Tiere mit OA-Induktion (DMM)

Körpergewicht

Das zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme gewogene Körpergewicht der Mäuse korrelierte mit den Leptinspiegeln, wenn alle Tiere betrachtet werden ($r^2 = 0,33$), bzw. die DMM-Tiere ($r^2 = 0,76$)(Tabelle 18).

Die Korrelation mit dem Tibia-Score wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt besprochen (Seite 80 und Abbildung 42). In der Gruppe der DMM-Tiere korrelierte das Körpergewicht außerdem mit dem Leber-Score mit einem r^2 von 0,55.

Tabelle 18: Korrelationen aller Werte mit dem Körpergewicht ($r^2 > 0,3$ Fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------|
| Körpergewicht | Leptin | Alle | 0,33460 |
| Körpergewicht | Adiponektin | Alle | 0,00689 |
| Körpergewicht | Visfatin | Alle | 0,01021 |
| Körpergewicht | Leber-Score | Alle | 0,28650 |
| Körpergewicht | Tibia-Score | Alle | 0,03658 |
| Körpergewicht | Leptin | DMM | 0,76250 |
| Körpergewicht | Adiponektin | DMM | 0,02528 |
| Körpergewicht | Visfatin | DMM | 0,00223 |
| Körpergewicht | Leber-Score | DMM | 0,55020 |
| Körpergewicht | Tibia-Score | DMM | 0,32760 |
| Körpergewicht | Leptin | Gesunde Kontrollen | 0,05491 |
| Körpergewicht | Adiponektin | Gesunde Kontrollen | 0,00155 |
| Körpergewicht | Visfatin | Gesunde Kontrollen | 0,06414 |
| Körpergewicht | Leber-Score | Gesunde Kontrollen | 0,07181 |
| Körpergewicht | Tibia-Score | Gesunde Kontrollen | 0,00270 |
| Körpergewicht | Leptin | ND | 0,01503 |
| Körpergewicht | Adiponektin | ND | 0,12220 |
| Körpergewicht | Visfatin | ND | 0,01282 |
| Körpergewicht | Leber-Score | ND | 0,01503 |
| Körpergewicht | Tibia-Score | ND | 0,01736 |
| Körpergewicht | Leptin | HFD | 0,09380 |
| Körpergewicht | Adiponektin | HFD | 0,00036 |
| Körpergewicht | Visfatin | HFD | 0,05405 |
| Körpergewicht | Leber-Score | HFD | 0,02803 |
| Körpergewicht | Tibia-Score | HFD | 0,08345 |

Die Korrelation zwischen Körpergewicht und Leptin (Abbildung 43) passten zu den bereits publizierten Daten von Pereira *et al.*, welche bereits von serologischen Studien mit humanen Proben bekannt sind⁶ und bestätigte damit die Vergleichbarkeit der metabolischen Veränderungen zwischen Maus und Mensch in Bezug auf dieses Adipokin.

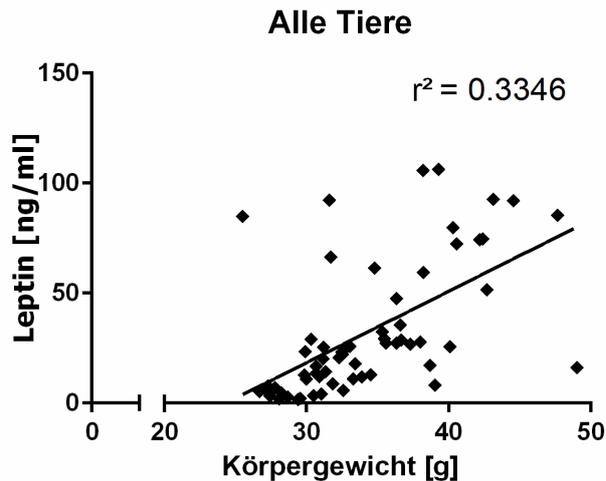


Abbildung 43: Betrachtet man alle Tiere der DMM-Studie, mit beiden Diäten und auch mit und ohne Arthrose, so zeigte sich eine Korrelation zwischen Körpergewicht und Leptin mit einem r^2 von 0,3346.

Leber-Score

Der Leber-Score diente in erster Linie dazu, die metabolischen Veränderungen durch die verschiedenen Diäten zu quantifizieren. So erklärt sich auch, dass der Leber-Score vor allem mit den Werten korrelierte, welche ebenfalls hauptsächlich durch den Metabolismus beeinflusst wurden, wie dem Leptinspiegel oder dem Körpergewicht (Tabelle 19). Interessanterweise korrelierte der Leber-Score in gesunden Tieren vor allem mit dem Leptinspiegel ($r^2 = 0,84$), weniger ausgeprägt mit dem Körpergewicht ($r^2 = 0,07$), während bei den DMM-Tieren die Korrelation mit Leptin etwas schwächer war ($r^2 = 0,45$), dafür aber eine gute Korrelation mit dem Körpergewicht ($r^2 = 0,55$) aufwies. Betrachtet man alle Tiere, so zeigte sich vor allem eine Korrelation mit dem Leptinspiegel ($r^2 = 0,62$) (Abbildung 44). Auch wenn man nur diejenigen Tiere betrachtet, welche eine HFD bekamen, wurde die Korrelation zwischen Leber-Score und Leptin mit $r^2 = 0,4$ bestätigt.

Tabelle 19: Korrelationen aller Werte mit dem Leber-Score ($r^2 > 0,3$ fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|--------------------|----------------------|---------------------------|----------------|
| Leber-Score | Leptin | Alle | 0,61530 |
| Leber-Score | Adiponektin | Alle | 0,04377 |
| Leber-Score | Visfatin | Alle | 0,00007 |
| Leber-Score | Tibia-Score | Alle | 0,01476 |
| Leber-Score | Körpergewicht | Alle | 0,28650 |
| Leber-Score | Leptin | DMM | 0,45120 |
| Leber-Score | Adiponektin | DMM | 0,03364 |
| Leber-Score | Visfatin | DMM | 0,00219 |
| Leber-Score | Tibia-Score | DMM | 0,23040 |
| Leber-Score | Körpergewicht | DMM | 0,55020 |
| Leber-Score | Leptin | Gesunde Kontrollen | 0,83660 |
| Leber-Score | Adiponektin | Gesunde Kontrollen | 0,09759 |
| Leber-Score | Visfatin | Gesunde Kontrollen | 0,00909 |
| Leber-Score | Tibia-Score | Gesunde Kontrollen | 0,03810 |
| Leber-Score | Körpergewicht | Gesunde Kontrollen | 0,07181 |
| Leber-Score | Leptin | ND | 0,03526 |
| Leber-Score | Adiponektin | ND | 0,11740 |
| Leber-Score | Visfatin | ND | 0,02175 |
| Leber-Score | Tibia-Score | ND | 0,01924 |
| Leber-Score | Körpergewicht | ND | 0,01503 |
| Leber-Score | Leptin | HFD | 0,39890 |
| Leber-Score | Adiponektin | HFD | 0,11610 |
| Leber-Score | Visfatin | HFD | 0,02653 |
| Leber-Score | Tibia-Score | HFD | 0,04065 |
| Leber-Score | Körpergewicht | HFD | 0,02803 |

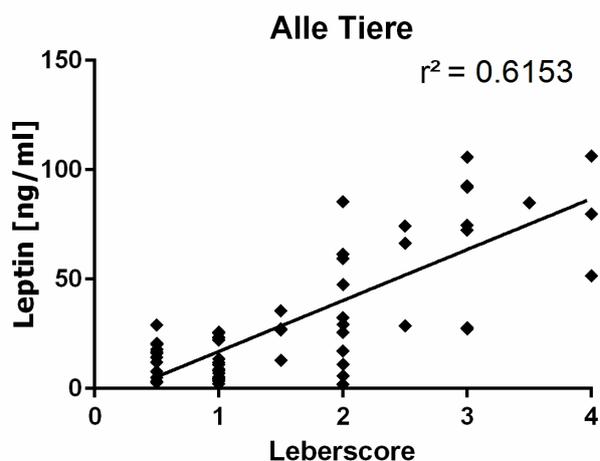


Abbildung 44: Betrachtet man alle Tiere der DMM-Studie mit beiden Diäten und mit und ohne Arthrose, so zeigte sich eine Korrelation zwischen Leber-Score und Leptin mit einem r^2 von 0,6153.

Adiponektin

Der Adiponektinspiegel im Mausserum zeigte keine Korrelationen zu allen anderen gemessenen Parametern (Tabelle 20). Dabei spielte es keine Rolle, welche Tiere in diese Auswertung eingeschlossen wurden.

Tabelle 20: Korrelationen aller Werte mit serologischen Adiponektinspiegel ($r^2 > 0,3$ fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|-------------|---------------|-----------------------|---------|
| Adiponektin | Leptin | Alle | 0,04036 |
| Adiponektin | Tibia-Score | Alle | 0,00006 |
| Adiponektin | Visfatin | Alle | 0,05432 |
| Adiponektin | Leber-Score | Alle | 0,04377 |
| Adiponektin | Körpergewicht | Alle | 0,00689 |
| Adiponektin | Leptin | DMM | 0,02231 |
| Adiponektin | Tibia-Score | DMM | 0,02202 |
| Adiponektin | Visfatin | DMM | 0,01908 |
| Adiponektin | Leber-Score | DMM | 0,03364 |
| Adiponektin | Körpergewicht | DMM | 0,02528 |
| Adiponektin | Leptin | Gesunde Kontrollen | 0,20460 |
| Adiponektin | Tibia-Score | Gesunde Kontrollen | 0,29330 |
| Adiponektin | Visfatin | Gesunde Kontrollen | 0,14140 |
| Adiponektin | Leber-Score | Gesunde Kontrollen | 0,09759 |
| Adiponektin | Körpergewicht | Gesunde Kontrollen | 0,00155 |
| Adiponektin | Leptin | ND | 0,18670 |
| Adiponektin | Tibia-Score | ND | 0,00159 |
| Adiponektin | Visfatin | ND | 0,06996 |
| Adiponektin | Leber-Score | ND | 0,11740 |
| Adiponektin | Körpergewicht | ND | 0,12220 |
| Adiponektin | Leptin | HFD | 0,00364 |
| Adiponektin | Tibia-Score | HFD | 0,00561 |
| Adiponektin | Visfatin | HFD | 0,02598 |
| Adiponektin | Leber-Score | HFD | 0,11610 |
| Adiponektin | Körpergewicht | HFD | 0,00036 |

Leptin

Der serologische Leptinspiegel (Tabelle 21) korrelierte vor allem mit metabolischen Parametern wie dem Leber-Score und dem Körpergewicht. Dies wurde besonders deutlich, wenn alle Tiere einbezogen wurden (Leber-Score: $r^2 = 0,62$; Körpergewicht: $r^2 = 0,33$) sowie bei den DMM-Tieren (Leber-Score: $r^2 = 0,45$; Körpergewicht: $r^2 = 0,76$). Wenn nur die gesunden Tiere ohne Operation einbezogen wurden, korrelierte der Leptinspiegel besonders gut mit dem Leber-Score ($r^2 = 0,84$) jedoch nicht mehr mit anderen Parametern.

Tabelle 21: Korrelationen aller Werte mit serologischen Leptinspiegeln ($r^2 > 0,3$ Fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|---------------|----------------------|---------------------------|----------------|
| Leptin | Tibia-Score | Alle | 0,00782 |
| Leptin | Adiponektin | Alle | 0,04036 |
| Leptin | Visfatin | Alle | 0,01027 |
| Leptin | Leber-Score | Alle | 0,61530 |
| Leptin | Körpergewicht | Alle | 0,33460 |
| Leptin | Tibia-Score | DMM | 0,25480 |
| Leptin | Adiponektin | DMM | 0,02231 |
| Leptin | Visfatin | DMM | 0,02294 |
| Leptin | Leber-Score | DMM | 0,45120 |
| Leptin | Körpergewicht | DMM | 0,76250 |
| Leptin | Tibia-Score | Gesunde Kontrollen | 0,00773 |
| Leptin | Adiponektin | Gesunde Kontrollen | 0,20460 |
| Leptin | Visfatin | Gesunde Kontrollen | 0,03760 |
| Leptin | Leber-Score | Gesunde Kontrollen | 0,83660 |
| Leptin | Körpergewicht | Gesunde Kontrollen | 0,05491 |
| Leptin | Tibia-Score | ND | 0,00429 |
| Leptin | Adiponektin | ND | 0,18670 |
| Leptin | Visfatin | ND | 0,14880 |
| Leptin | Leber-Score | ND | 0,03526 |
| Leptin | Körpergewicht | ND | 0,11280 |
| Leptin | Tibia-Score | HFD | 0,19580 |
| Leptin | Adiponektin | HFD | 0,00364 |
| Leptin | Visfatin | HFD | 0,03575 |
| Leptin | Leber-Score | HFD | 0,39890 |
| Leptin | Körpergewicht | HFD | 0,09380 |

Anhand der Leptinwerte wurde auch deutlich, warum die Korrelationen der metabolischen Parameter relativ schlecht waren, wenn man jeweils die Tiere mit ND oder HFD (Gesunde Kontrollen) separat auswertete. In Abbildung 45 sieht man, wie sich die Verteilung der Punkte auf der x-Achse in zwei „Cluster“ aufteilt. Somit wertet man innerhalb einer Diät-Gruppe immer nur einen sehr kurzen Bereich auf der x-Achse aus. Betrachtete man aber alle Tiere, also auch diejenigen mit DMM, so wurde diese Aufteilung durch die erhöhte n-Zahl und die zusätzlichen Einflüsse reduziert und die Korrelationen wurden besser sichtbar.

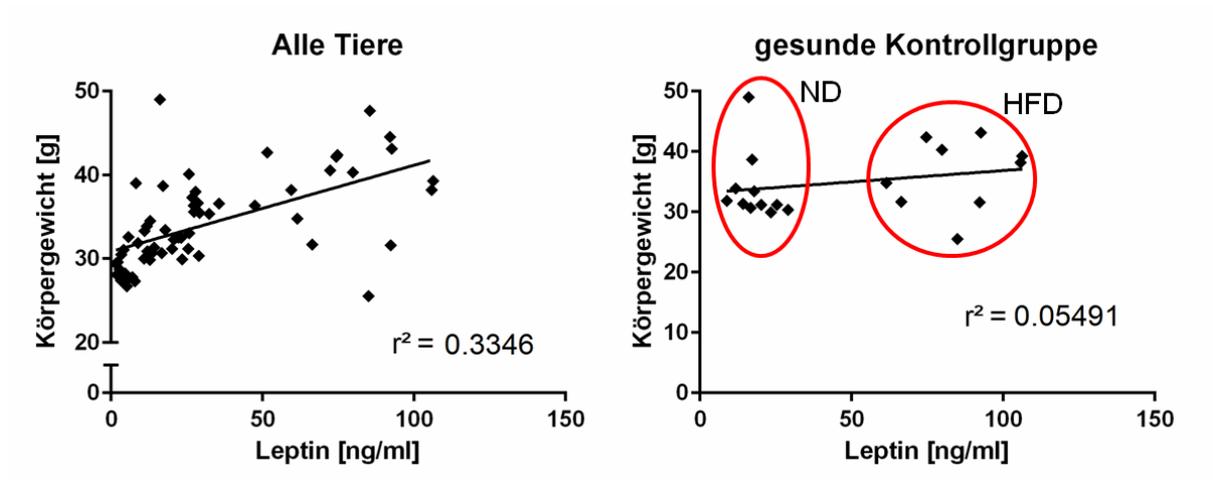


Abbildung 45: Korrelation zwischen Leptin und Körpergewicht unter Einbezug aller Tiere im Vergleich zur Auswertung lediglich unter Einbezug der gesunden Tiere ohne Arthritisinduktion. Dabei zeigt sich, dass beim Betrachten aller Tiere Körpergewicht und Leptin miteinander korrelieren ($r^2 = 0,3346$), dies jedoch mathematisch nicht mehr darstellbar ist, wenn nur die gesunden Tiere einbezogen werden, da sich hier die Werte nicht über die x-Achse verteilen, sondern in Gruppen nach den verschiedenen Diäten zusammenfassen. Dies zeigt, dass in Bezug auf Leptin die Arthrose den Effekt der Diät teilweise auflöst, sodass die klare Trennung in zwei Punktwolken nicht mehr darstellbar ist.

Visfatin

Visfatin zeigte genau wie Adiponektin (Tabelle 20) keine Korrelationen zu allen anderen gemessenen Parametern.

Tabelle 22: Korrelationen aller Werte mit serologischem Visfatinspiegel ($r^2 > 0,3$ Fett) mit verschiedenen Zusammensetzungen der eingeschlossenen Tiergruppen

| x-Achse | y-Achse | Eingeschlossene Tiere | r^2 |
|----------|---------------|-----------------------|---------|
| Visfatin | Leptin | Alle | 0,01027 |
| Visfatin | Adiponektin | Alle | 0,05432 |
| Visfatin | Tibia-Score | Alle | 0,00841 |
| Visfatin | Leber-Score | Alle | 0,00007 |
| Visfatin | Körpergewicht | Alle | 0,01021 |
| Visfatin | Leptin | DMM | 0,02294 |
| Visfatin | Adiponektin | DMM | 0,01908 |
| Visfatin | Tibia-Score | DMM | 0,00002 |
| Visfatin | Leber-Score | DMM | 0,00219 |
| Visfatin | Körpergewicht | DMM | 0,00223 |
| Visfatin | Leptin | Gesunde Kontrollen | 0,03760 |
| Visfatin | Adiponektin | Gesunde Kontrollen | 0,14140 |
| Visfatin | Tibia-Score | Gesunde Kontrollen | 0,11960 |
| Visfatin | Leber-Score | Gesunde Kontrollen | 0,00909 |
| Visfatin | Körpergewicht | Gesunde Kontrollen | 0,06414 |
| Visfatin | Leptin | ND | 0,14880 |
| Visfatin | Adiponektin | ND | 0,06996 |
| Visfatin | Tibia-Score | ND | 0,00673 |
| Visfatin | Leber-Score | ND | 0,02175 |
| Visfatin | Körpergewicht | ND | 0,01282 |
| Visfatin | Leptin | HFD | 0,03575 |
| Visfatin | Adiponektin | HFD | 0,02598 |
| Visfatin | Tibia-Score | HFD | 0,00726 |
| Visfatin | Leber-Score | HFD | 0,02653 |
| Visfatin | Körpergewicht | HFD | 0,05405 |

Lokale Adipokinverteilung

Bei der lokalen Adipokinverteilung mittels immunhistologischer Färbung konnten keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten oder den verschiedenen Diäten nachgewiesen werden. Deshalb wird im Folgenden auf die Verteilung im Gewebe eingegangen und kein Unterschied zwischen Zeitpunkten oder Diäten gemacht. Lediglich zwischen DMM- und sham-operierten Beinen wird unterschieden, wobei immer die beiden Beine derselben Maus dargestellt sind, um keine interindividuellen Unterschiede darzustellen.

Adiponektin

Adiponektin war im Gelenk in verschiedenen Arealen sowohl von gesunden Tieren also auch der DMM-Gruppe nachweisbar, daneben ausgeprägt im Knochenmark beider Gruppen. Auch die Zellen der Gelenkkapsel exprimierten Adiponektin sowie diejenigen Zellen, welche in die Menisken eingebettet bzw. eingewandert waren. Hier zeigten sich Unterschiede zwischen DMM- und sham-operierten Beinen, da infolge der DMM-Operation vermehrt Zellen in den geschädigten Meniskus einwanderten und somit in der Summe deutlich mehr Adiponektin-positive Zellen nachweisbar waren. Chondrozyten im Knorpel der Gelenkoberfläche waren nicht immer Adiponektin-positiv, hier konnte aber kein Muster in den Geweben nachgewiesen werden, in welchen Fällen diese Zellen Adiponektin exprimierten. Zusammenhänge zu Diät oder den operativ induzierten Gelenksveränderungen waren nicht vorhanden (Abbildung 46).

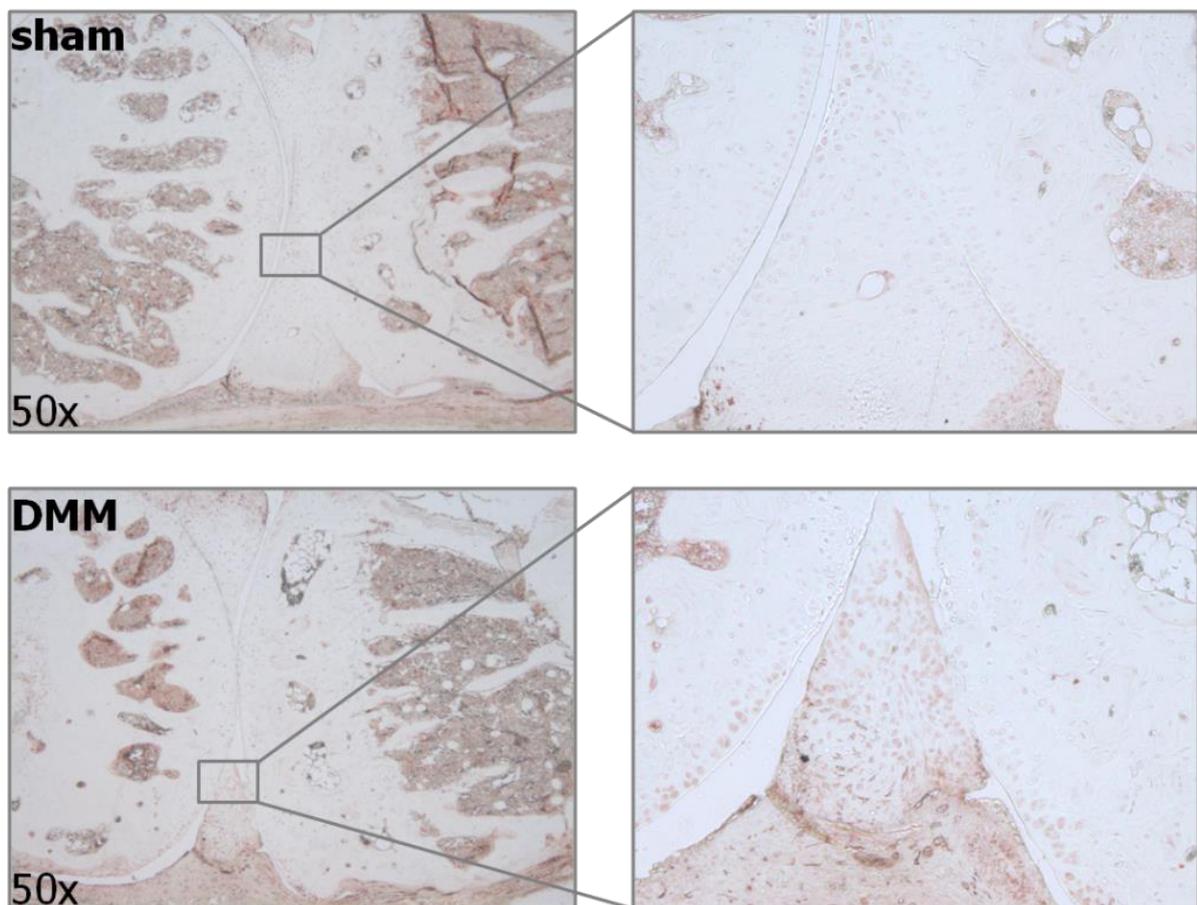


Abbildung 46: Lokale Adiponektinverteilung im Gelenk mit DMM- oder sham-Operation. Links oben ist die Übersicht über ein sham-operiertes Kniegelenk, darunter das DMM-operierte Kniegelenk derselben Maus dargestellt. Rechts jeweils die Menisken (100x Vergrößerung), in welchen in beiden Knien Zellen sichtbar sind, die alle mit anti-Adiponektin Antikörpern angefärbt werden konnten, jedoch sind im geschädigten (unten) Meniskus deutlich mehr Zellen vorhanden, welche in den Meniskus eingewandert sind und dort Adiponektin synthetisieren.

Leptin

Die lokale Verteilung von Leptin zeigte im Überblick ein vergleichbares Muster wie Adiponektin, allerdings exprimierten die Chondrozyten im Gelenkknorpel Adiponektin, wohingegen die Zellen im Säulenknorpel nur unregelmäßig Leptin-positiv waren. Sowohl im Knochenmark als auch im Synovium war Leptin nachweisbar.

In den Menisken konnten, wie bereits für das Adiponektin beschrieben, alle Zellen positiv für Leptin gefärbt werden. Man sah auch hier in Bereichen mit einer Schädigung und der infolgedessen eingewanderten Zellen, in der Summe deutlich mehr Leptin-positive Zellen (Abbildung 47). Bei gesunden Tieren waren sowohl die Zellen des Synoviums als auch die im Knorpel der Menisken positiv, sodass der Unterschied zwischen gesundem und geschädigtem Knorpel lediglich in der Summe der Leptin-positiven Zellen bestand.

Sowohl zwischen den verschiedenen Zeitpunkten als auch zwischen den Diäten konnte lokal im Gelenk keine unterschiedliche Leptinverteilung festgestellt werden.

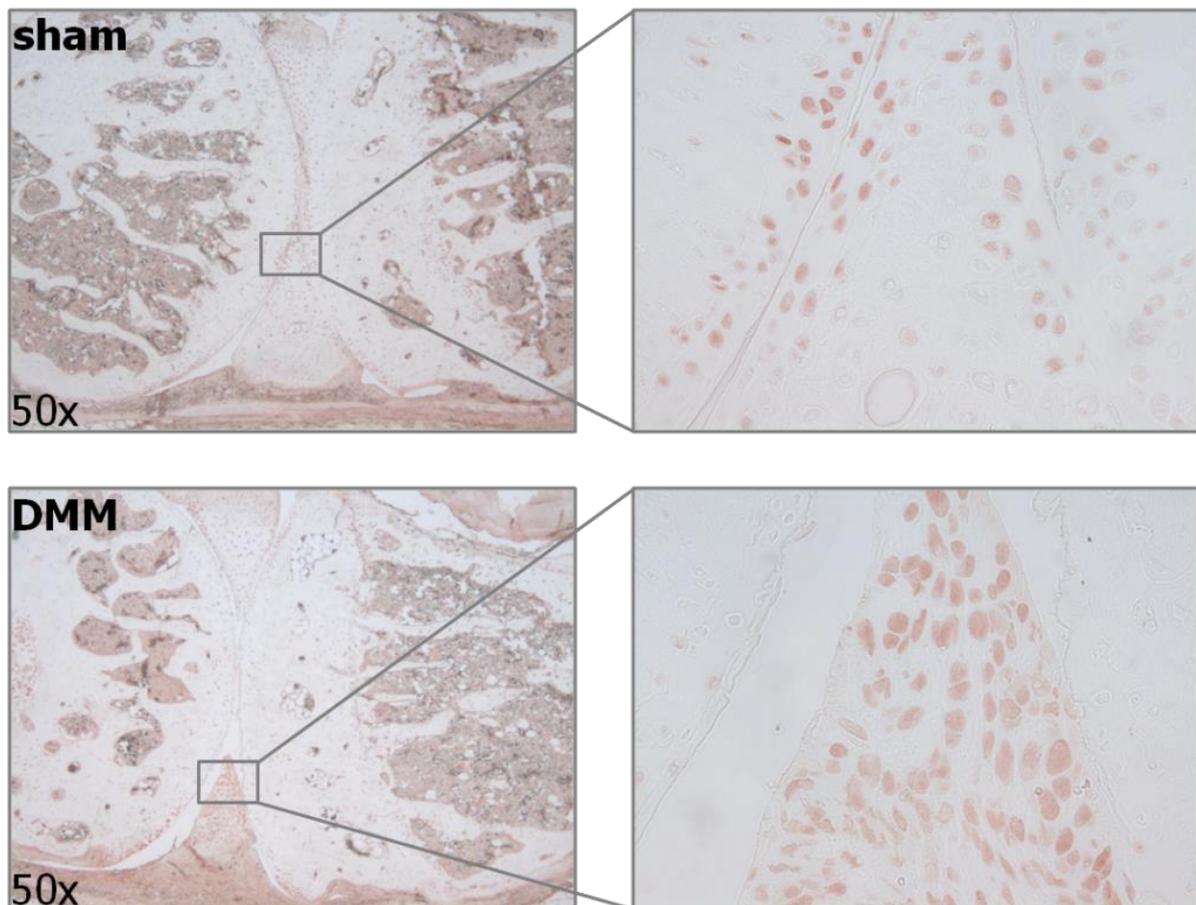


Abbildung 47: Lokale Verteilung von Leptin im Gelenk mit DMM- oder sham-Operation. Links oben ist die Übersicht über ein sham-operiertes Kniegelenk, darunter das DMM-operierte Kniegelenk derselben Maus. Rechts jeweils die Menisken (200x Vergrößerung), in welchen in beiden Gelenken Zellen vorhanden waren, die alle in der IHC für Leptin gefärbt werden konnten, jedoch waren im geschädigten (unten) Meniskus deutlich mehr Zellen im Meniskus vorhanden, welche dort Leptin synthetisierten.

Visfatin

Visfatin war im Gelenk ebenfalls sehr großflächig verteilt, wobei hier keine Unterschiede zwischen Diäten oder Zeitpunkten zu erkennen waren.

Chondrozyten im Gelenkknorpel und auch alle Zellen im Knorpelgewebe der Menisken waren exprimierten Visfatin, genauso wie Zellen des Knochenmarks (Abbildung 48).

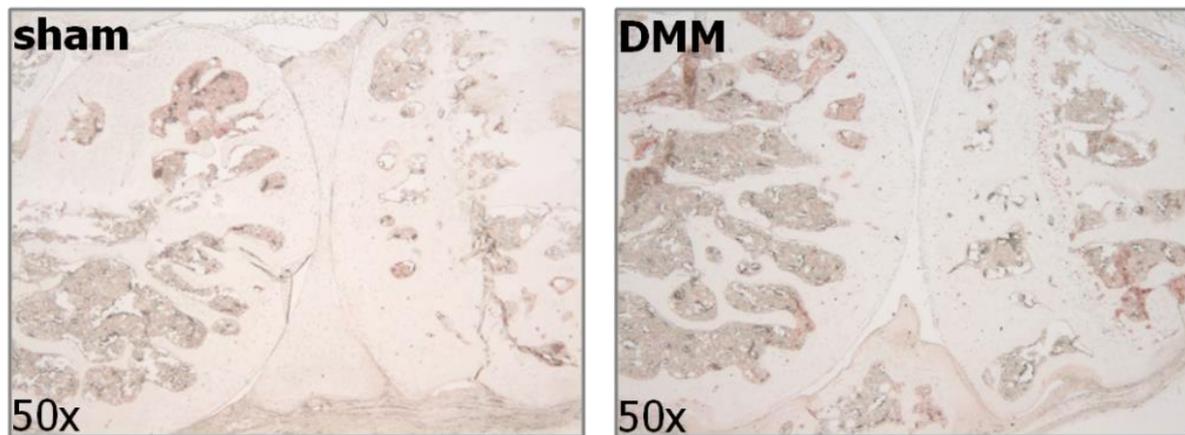


Abbildung 48: Lokale Verteilung von Visfatin im Gelenk mit sham- (links) oder DMM-Operation. Hierbei zeigten sich im Knochenmark wenige Visfatin exprimierende Zellen.

Eine Besonderheit in der lokalen Visfatin-Verteilung war im Säulenknorpel zu erkennen. Hier zeigte sich, dass proliferierende Chondrozyten kein Visfatin aufweisen, wohingegen hypertrophe Zellen Visfatin-positiv waren (Abbildung 49). Als Vergleich wurde eine immunhistologische Färbung gegen Kollagen X im Säulenknorpel durchgeführt, wobei Kollagen X als ein Marker für hypertrophe Chondrozyten diente.

Diese Beobachtung, dass Visfatin in diesem Knochenbereich nur in hypertrophen Chondrozyten nachweisbar war, war unabhängig von Diät oder Zeitpunkt.

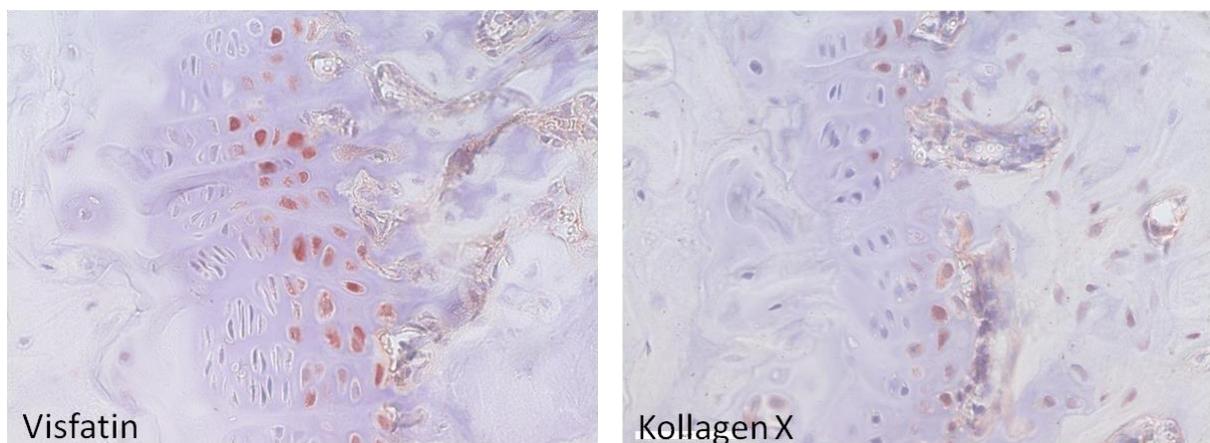


Abbildung 49: Färbung von Visfatin (links, 400x Vergrößerung) und Kollagen Typ X (rechts, 400x Vergrößerung) im Säulenknorpel mit Hämalan Gegenfärbung. Visfatin war nur in den eher runden, dem Gelenkspalt abgewandten Zellen nachweisbar, nicht jedoch in den abgeflachten, dem Gelenkspalt näheren Zellen. Die Färbung gegen Kollagen Typ X, einem Markerprotein für hypertrophe Chondrozyten, zeigte das gleiche Verteilungsmuster, wodurch illustriert wird, dass Visfatin im Bereich des Säulenknorpels nur in hypertrophen Chondrozyten synthetisiert wird.

Insgesamt zeigten diese Adipokinfärbungen, dass im Gelenk viele verschiedene Zelltypen mit Adipokinen in Berührung kommen und deren Einflüssen ausgesetzt sind. Im Gelenkknorpel, bzw. Chondrozyten, konnten alle drei Adipokine regelmäßig detektiert werden, wobei der Säulenknorpel ein besonderes Muster aufwies in Bezug auf Visfatin. Im Knochenmark und in den Menisken wurden ebenfalls alle drei Adipokine nachgewiesen. In der Gelenkkapsel bzw. dem Synovium wurden Adiponektin und Leptin nachgewiesen, Visfatin war hier nicht in darstellbaren Mengen vorhanden.

Tabelle 23: Übersicht lokaler Adipokinfärbungen in verschiedenen Geweben des Gelenks

| | Knorpel | Säulenknorpel | Knochenmark | Menisken | Synovium |
|-------------|---------------------------|---|--------------------|----------------------------|-----------------|
| Adiponektin | Unregelmäßig* | - | + | Zellen in Menisken positiv | + |
| Leptin | Chondrozyten sind positiv | Unregelmäßig | + | Zellen in Menisken positiv | + |
| Visfatin | Chondrozyten sind positiv | Hypertrophe Chondrozyten sind positiv, proliferative Chondrozyten negativ | + | Zellen in Menisken positiv | - |

*Eine Aussage war hier schwierig, da zum Teil in einzelnen Bereichen des Knorpels Zellen positiv waren, in anderen nicht. Außerdem zeigten die Chondrozyten im Knorpel häufig eine schwache, unspezifische Färbung, welche im Fall der Adiponektinfärbung nicht immer von der spezifischen Färbung zu unterscheiden war.

Als zentrales Ergebnis der immunhistologischen Untersuchungen lokaler Adipokinverteilungen ist hier hervorzuheben, dass diejenigen Zellen, welche in geschädigte Knorpelregionen einwandern, stets sowohl Adiponektin als auch Leptin synthetisierten. Dies hebt diese Zellen zwar nicht grundsätzlich von denjenigen im gesunden Knorpel ab, jedoch ist die Anzahl der Zellen im geschädigten Knorpel sehr viel höher und somit die Summe der Adiponektin- und Leptin-produzierenden Zellen deutlich größer.

Ortsständige Zelltypen

Um darzustellen, welche Zelltypen im Gelenk den Einflüssen der Adipokine ausgesetzt sind, wurden immunhistologische Färbungen zum Nachweis spezifischer Zellmarker durchgeführt.

Mesenchymale Zellen

Vimentin ist ein Marker für Zellen mesenchymalen Ursprungs¹⁰³ und wird in Fibroblasten stark exprimiert. Die in den geschädigten Meniskus invadierten Zellen waren alle Vimentin-positiv (Abbildung 50). Demnach waren die invadierten Zellen also mesenchymalen Ursprungs.

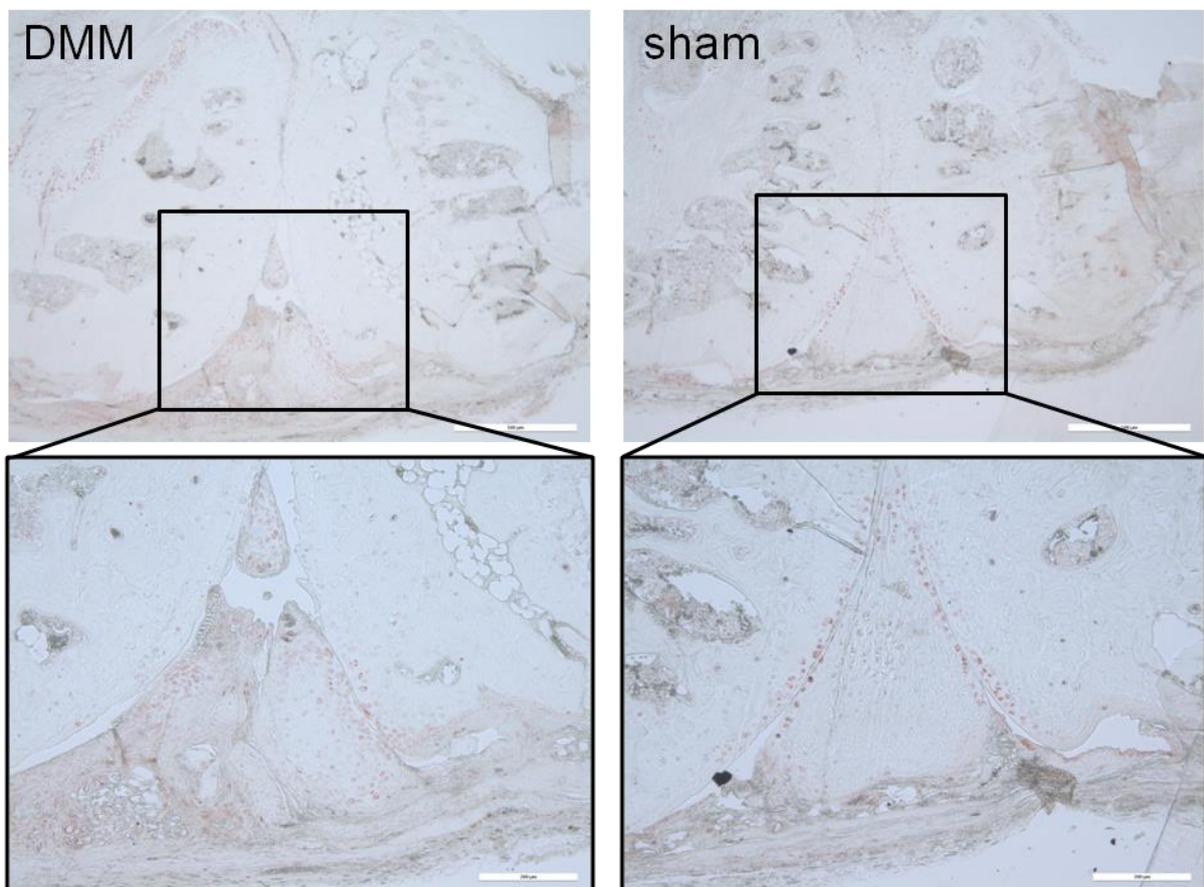


Abbildung 50: IHC-Färbung für Vimentin im Gelenk mit DMM- oder sham-Operation. Vimentin dient hier als Marker für Zellen mesenchymalen Ursprungs. Alle im Meniskus vorhandenen Zellen werden über den anti-Vimentin-Antikörper angefärbt, sind also mesenchymalen Ursprungs.

Leukozyten

CD45 ist ein Glykoprotein, welches auf Leukozyten und deren Vorläuferzellen exprimiert wird¹⁰⁴, insbesondere B- und T-Zellen, Plasmazellen, Histiozyten, Monozyten und Makrophagen¹⁰⁵.

Die IHC-Färbungen in den Mausgelenken ergaben sowohl in den DMM-Gelenken als auch den entsprechenden Kontrollen (sham) keine Signale in den Menisken. Vereinzelt waren CD45 positive Zellen in den vom Gelenkspalt abgewandten Seite der Synovialmembran (Pfeile der Abb. 50) und

teilweise in den Umbauregionen der stark veränderten Menisken wie sie im Kapitel „Besonderheiten und Einzelfälle bei der Gelenksdegradation“ beschrieben sind. Diejenigen Zellen, welche in die Menisken einwanderten und dort die zusätzlichen Adipokin-positiven Zellen darstellen, waren jedoch nicht CD45 positiv, sind also keine Leukozyten (Abbildung 51).

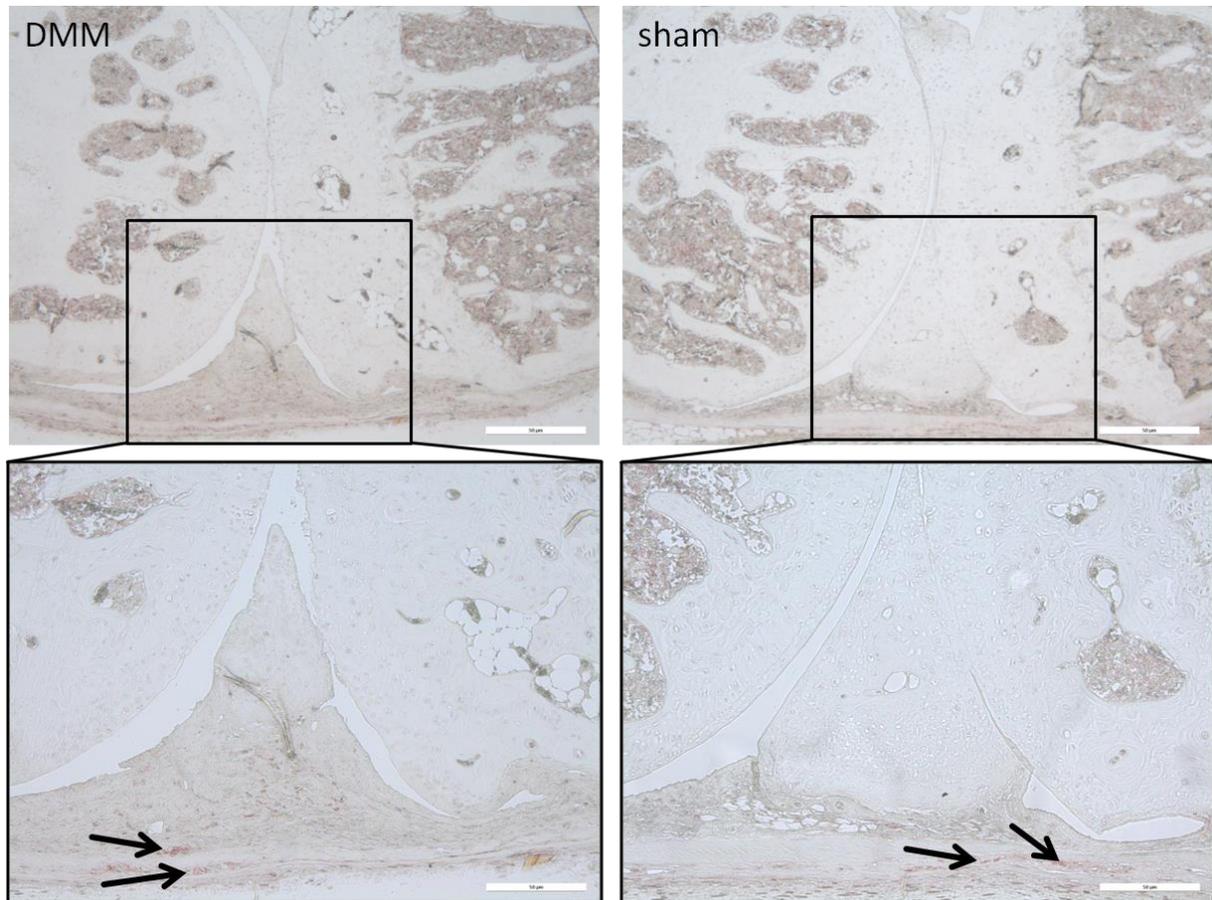


Abbildung 51: IHC-Färbung für CD45 im Gelenk mit DMM- (links) oder sham-OP (rechts). CD45 dient hier als Marker für Leukozyten und deren Vorläuferzellen. Sowohl nach DMM- als auch nach sham-OP sind nur vereinzelte Leukozyten im Gewebe detektierbar (Pfeile). Die Zellen, welche in die geschädigten Menisken einwandern sind jedoch negativ für CD45 und somit keine Leukozyten.

Makrophagen

Zur Bestätigung, dass Makrophagen nicht im Bereich des veränderten Meniskus der DMM-Tiere vorliegen und als Bestätigung der negativen Ergebnisse der CD45-Färbung wurden Färbungen gegen spezifische Makrophagenmarker durchgeführt. Mittels der Färbung gegen F4/80 (Abbildung 52) wurden in den Geweben nur vereinzelte positive Zellen in den geschädigten Menisken nachgewiesen, die invadierten Zellen waren aber weitgehend nicht F4/80⁺, also keine Makrophagen.

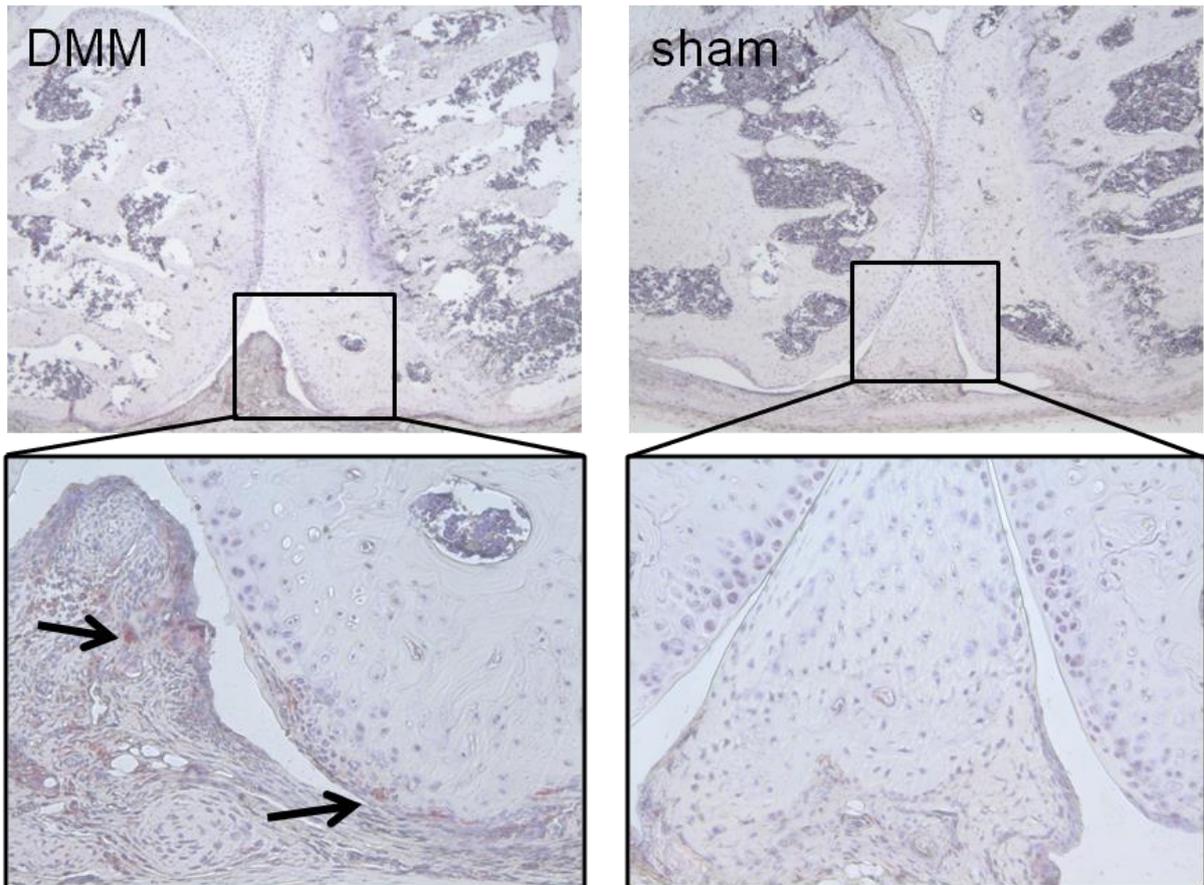


Abbildung 52: IHC-Färbung für F4/80 im Gelenk mit DMM- oder sham-Operation. F4/80 dient hier als Marker für Makrophagen. Diejenigen Zellen, welche in den geschädigten Meniskus eingewandert sind, sind zum Großteil negativ für F4/80 und somit keine Makrophagen. Vereinzelt sind jedoch in den DMM-operierten Knien Makrophagen vorhanden (Pfeile).

Chondrozyten

Bisher wurden über Vimentin die invadierten Zellen als Zellen mesenchymalen Ursprungs identifiziert und Leukozyten, bzw. insbesondere Makrophagen, wurden in den Menisken ausgeschlossen. Die verbleibenden wahrscheinlichsten Zelltypen sind somit Chondrozyten und Fibroblasten, da diese mesenchymale Zellen sind und im gesunden Gelenk im Synovium (Fibroblasten) und dem Meniskus (Chondrozyten) vorkommen. Chondrozyten sind über Marker nur schwer detektierbar, da die meisten Marker nur in bestimmten Phasen der Differenzierung exprimiert werden. Aufgrund des beobachteten Umbaus der Menisken und der hohen Zellzahl im Gewebe wurden IHC-Färbungen gegen Kollagen X angefertigt, einem Marker für hypertrophe Chondrozyten.

Die Kollagen X-Färbung zeigte, dass diejenigen Zellen, welche morphologisch eine „aufgeblasene“ und rundliche Form aufwiesen, angefärbt wurden, wohingegen die eher kleinen und oft spindelförmig flachen Zellen Kollagen-X-negativ sind (Abbildung 53). Ersteres weist also auf Chondrozyten hin, letzteres auf Fibroblasten.

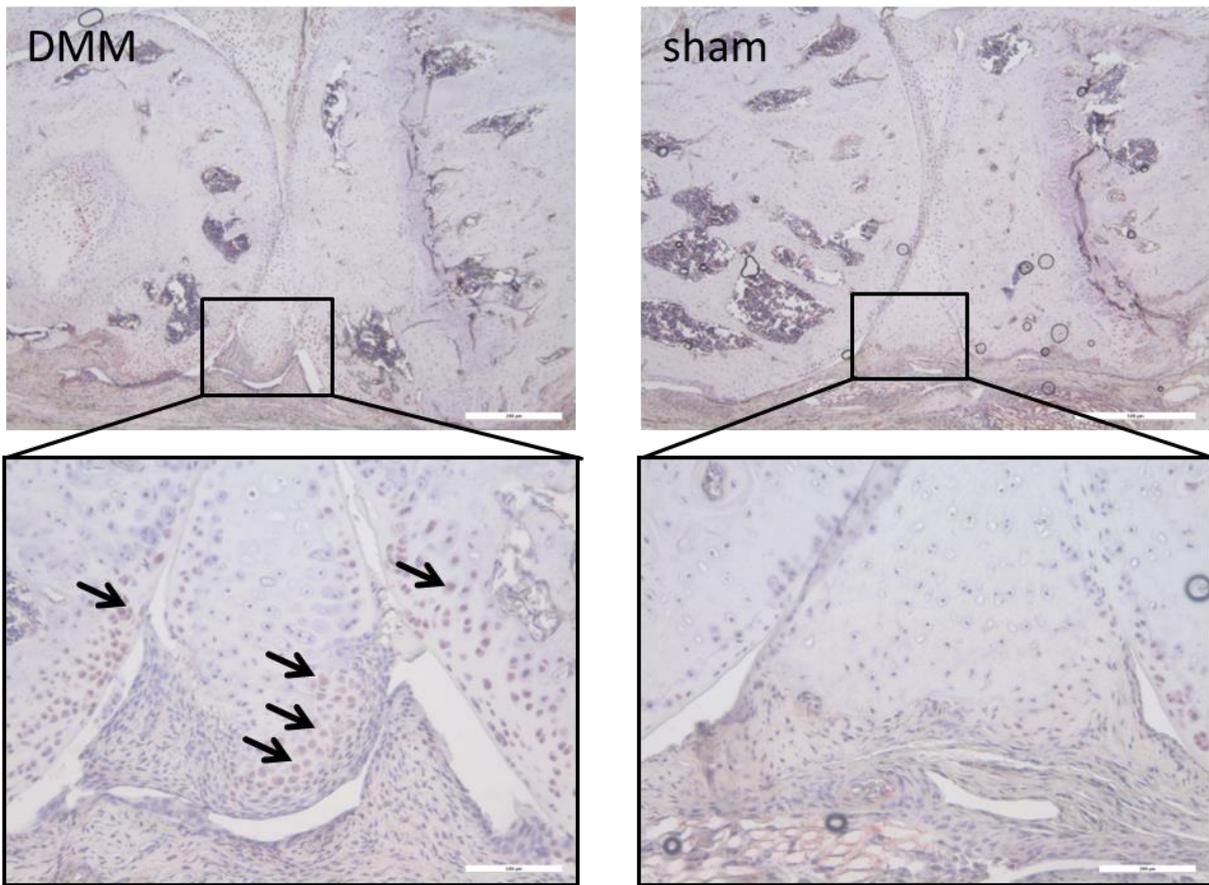
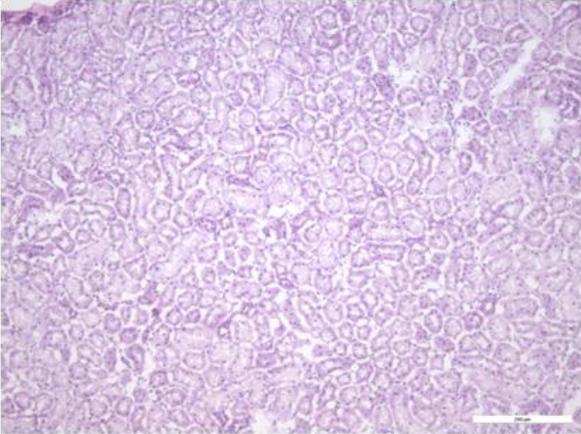


Abbildung 53: IHC-Färbung für Kollagen Typ X im Gelenk mit DMM- (links) oder sham-OP (rechts). Kollagen Typ X dient hier als Marker für hypertrophe Chondrozyten. Die Färbung zeigt, dass diejenigen Zellen im Knorpel (sowohl im hyalinen Knorpel als auch im Meniskus), welche groß und rund sind, positiv für Kollagen Typ X und somit Chondrozyten sind.

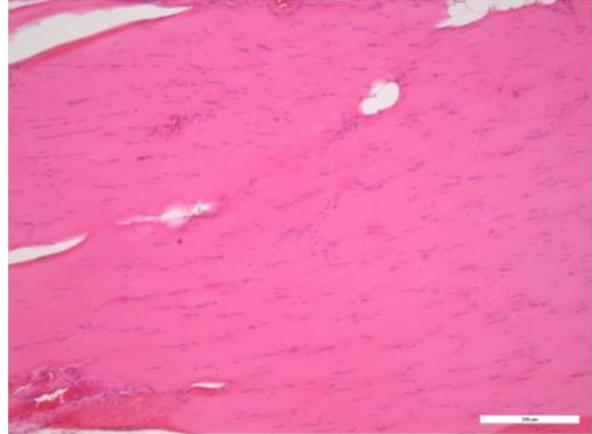
Histologische Übersichtsfärbungen weiterer Organe

Da die verwendeten Modelle, insbesondere die HFD, den gesamten Organismus beeinflussen können, wurden von Stichproben aus verschiedenen Behandlungsgruppen histologische Übersichtsfärbungen von weiteren Organen angefertigt (Abbildung 54). In Muskeln, Nieren, Milz und Lunge wurden dabei keine sichtbaren Unterschiede, wie z. B. vermehrt vorliegende Fettzellen oder Veränderungen des Bindegewebes zwischen den Behandlungsgruppen gefunden.

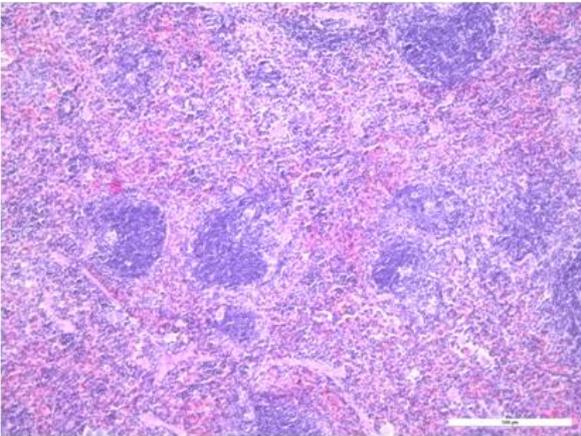
Niere



Muskel



Milz



Lunge

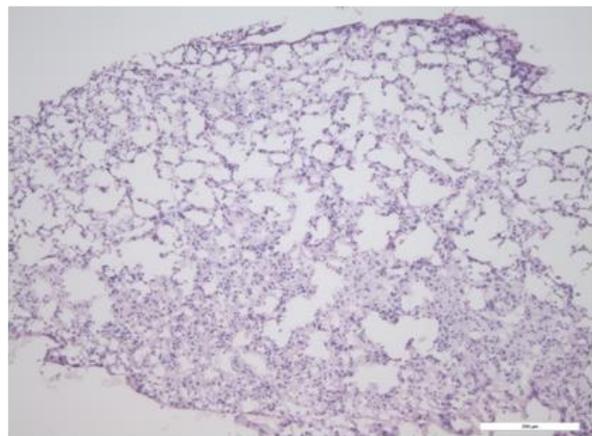


Abbildung 54: Exemplarische histologische Übersichtsfärbungen (H/E) von Niere, Muskel, Milz und Lunge. Die Färbungen wurden stichprobenartig von allen Behandlungsgruppen angefertigt und verglichen, wobei sich keine histologischen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zeigten.

Diskussion

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in C57Bl/6

Der Arthritis-Score erreichte nur in einzelnen Tieren Werte über 1 (von maximal 4). Dies bedeutet, dass sich die Pfoten etwas gerötet haben oder leicht angeschwollen sind. Allerdings ließen sich die Anzeichen einer beginnenden Entzündung nicht in den Messwerten, also dem Durchmesser von Pfote oder Sprunggelenk, bestätigen. Daher kann in diesem Modell nicht von einer erfolgreichen Arthritisinduktion ausgegangen werden. Zusätzlich konnten die histologischen Untersuchungen keine Erosionen oder Anzeichen auf Entzündung in den untersuchten Gelenken nachweisen. Demnach wurde, auch wenn der Arthritis-Score im Verlauf der Zeit etwas anstieg, das erste CIA-Experiment als nicht erfolgreich eingestuft.

Im CIA-Modell ohne Kombination mit einer HFD werden in der Regel jüngere Mäuse verwendet (8 bis 10 Wochen bei der ersten Immunisierung). Dies war in diesem Fall durch die Kombination mit der HFD nicht möglich, da eine Fütterung der Tiere drei Monate vor Arthritisinduktion verabreicht wurde. Weiterhin wird der C57Bl/6 Mausstamm nicht als ideal für die Durchführung dieses Modells angesehen³³. Da eine möglichst hohe Vergleichbarkeit mit dem DMM-Modell erreicht werden sollte, wurden allerdings C57Bl/6 Mäuse für das Kombinationsmodell ausgewählt, weil in diesem Mausstamm ein gutes Ansprechen auf die verwendete HFD bekannt ist⁴⁹.

Um den Vergleich zwischen Arthrose- und Arthritismodell zu erhalten, wurde das CIA Modell mit verkürzter Fütterungszeit jedoch unter Verwendung derselben HFD und im DBA/1Rj Mausstamm wiederholt. Aus Zeitgründen wurde für die Durchführung des Tiermodells die Firma Aurigon (Ungarn) beauftragt. Dabei ist die Vergleichbarkeit zwar durch den geänderten Mausstamm und die Vorfütterungszeit eingeschränkt, trotzdem lassen sich metabolische Veränderungen systemisch und lokal zu verschiedenen Zeitpunkten im Kontext einer Arthritis untersuchen und mit den Auswirkungen im DMM-Modell vergleichen.

Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) in DBA/1Rj

Die ersten Ergebnisse, insbesondere der klinische Score, zeigten, dass die CIA Induktion im DBA/1Rj Mausstamm erfolgreich war. Auch die histologischen Bilder exemplarischer Tiere der verschiedenen Gruppen weisen auf entsprechende Schäden im Gelenk sowie entzündliche Veränderungen hin, selbst wenn diese zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht durch einen histologischen Score quantifiziert sind. Insgesamt war die Induktion der CIA in diesem Experiment erfolgreich.

Durch die HFD wurde das Körpergewicht der Mäuse im Vergleich zur ND signifikant erhöht. Somit war auch dieses Modell im zweiten Versuch diesbezüglich erfolgreich.

Betrachtet man die systemischen Adipokinwerte, so fällt auf, dass das Adiponektin nur zum frühesten Zeitpunkt, also nach vier Wochen und auch nur unter HFD, signifikant durch die CIA reduziert wird. Zu anderen Zeitpunkten war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Dies und die Zeitkinetik, welche

verdeutlicht, dass sich in den CIA Tieren sowohl mit ND als auch mit HFD der Adiponektinspiegel zwischen Woche vier und acht erhöht, lässt darauf schließen, dass der Schweregrad der RA die systemischen Adiponektinwerte direkt oder indirekt beeinflusst. Als interessante Fragestellung ergibt sich hieraus, ob sich das Körpergewicht ebenfalls verändert und ob die Adiponektinwerte als Reaktion auf das Körpergewicht reduziert werden oder eher durch die Entzündung. Dies könnte sich dadurch zeigen lassen, dass der Adiponektinspiegel evtl. eher mit dem Körpergewicht ober aber dem CRP Spiegel im Plasma bzw. dem Progress der RA, also dem histologischen Score mit dem Adiponektin korreliert. In humanen Studien ist bekannt, dass einerseits der Adiponektinspiegel bei Patienten mit RA erhöht ist¹⁰⁶, was zu den hier im Tierversuch diskutierten (zum 7-Wochen-Zeitpunkt auftretenden) Werten passt. Andererseits wird aber auch beschrieben, dass RA-Patienten ein höheres Körpergewicht haben¹⁰⁷, was basierend auf der Beobachtung, dass Adiponektin umgekehrt proportional zum Körpergewicht reguliert wird^{55, 59}, einen niedrigeren Adiponektinspiegel vermuten lässt. Diese Vergleiche mit humanen Studien sind natürlich eher spekulativ, da ein Tierversuch nie direkt widerspiegelt, was eine humane Studie zeigt. Generell sieht man aber sowohl im Tierversuch beim Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte, als auch in den humanen Studien, nicht immer die gleichen Veränderungen.

Besonders auffällig sind die systemischen Veränderungen der Leptinspiegel, welche zu allen Zeitpunkten und unter beiden Diäten durch die CIA reduziert werden. Unter ND ist die Leptinreduktion nicht immer signifikant, was sich vermutlich durch einen bereits niedrigen Ausgangswert begründen lässt. Die HFD ohne CIA erhöht Leptin hochsignifikant, dieser Effekt wird durch die CIA jedoch ausgehebelt und die Werte sinken sogar unter den der gesunden ND-Tiere. Da in humanen Studien gezeigt wurde, dass CRP im Serum Leptin bindet⁷², könnte die starke Reduktion des Leptins durch das hochentzündliche CIA Modell zum Teil dadurch erklärt werden. Natürlich kann auch eine Gewichtsreduktion, induziert durch die Entzündung des CIA Modells, zur Reduktion des Leptins führen, es ist jedoch nicht zu erwarten, dass die Leptinspiegel der HFD-Tiere mit CIA dadurch deutlich unter den Leptinspiegel der gesunden ND-Tiere abfallen.

Die signifikant erhöhten CRP-Werte bei den Tieren mit CIA zeigen, dass sich dieser Entzündungsparameter nicht nur in der Klinik, sondern auch im CIA Modell hervorragend eignet, um systemische Entzündung zu messen und deutlicher zu erfassen als es z. B. durch das ebenfalls gemessene, in diesem Versuch aber sehr schwankende IL-6, möglich ist. Hier zeigt sich sowohl der sehr starke Effekt der CIA als auch der schwache Effekt einer systemischen Entzündung durch die HFD, bzw. die daraus resultierende Adipositas.

Arthroseinduktion

Die erfolgreiche Arthroseinduktion im DMM-Modell konnte durch die histologischen Scores zu jedem Zeitpunkt und mit beiden Diäten signifikant im Vergleich zu den entsprechenden gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Dies zeigt den Erfolg des Arthrosemodells. Einige Tiere mussten jedoch aus der Auswertung ausgeschlossen werden, da diese keine Gelenkdegradation zeigten und somit nicht für die Analyse zur Verfügung standen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der operative Eingriff sehr filigran in der Durchführung ist und sich hier bedingt durch den Übungseffekt in den später operierten Tieren stabile Induktions-Ergebnisse zeigten. Dies führte zwar zu reduzierten n-Zahlen in den Gruppen mit

längeren Zeitverläufen, aber so wurden nur Tiere ausgewertet, welche auch tatsächlich eine Arthrose entwickelten und somit vergleichbar waren.

Der Arthrose-Score lag zu jedem Zeitpunkt höher in der HFD-Gruppe verglichen mit der ND-Gruppe. Im Zeitverlauf wurde deutlich, dass sich unter ND früher eine Plateauphase einstellt, die Arthrose sich also nicht weiter verschlechtert, während sich dieser Zustand unter HFD entweder später als die im Modell abgebildeten acht Wochen oder evtl. gar nicht einstellt.

Der Tibia-Score korrelierte in dieser Studie nur mit dem Körpergewicht und das auch nur innerhalb der DMM-Gruppe. Dies spiegelt wider, was auch beim Menschen beobachtet wurde, nämlich dass die verstärkte Kniearthrose bei Adipositas in erster Linie mit dem Körpergewicht korreliert und dementsprechend hauptsächlich mit der biomechanischen Belastung zu begründen ist⁴. Bis auf die biomechanische Mehrbelastung sind die Einflüsse von Adipositas auf Arthrose auch in humanen Studien nicht einheitlich beschrieben. So zeigt sich in manchen Studien, dass auch Gelenke, welche nicht gewichttragend sind, bei Adipositas stärker von OA betroffen sind¹⁰⁸, wohingegen andere Studien diesen Zusammenhang nicht sehen¹⁰⁹. Diese unterschiedlichen Studienergebnisse könnten darauf hindeuten, dass hier systemische Veränderungen nicht unbedingt den lokalen Prozessen im Gelenk entsprechen, oder dass weitere Faktoren, wie z. B. Komorbiditäten, Medikation oder Entzündungsstatus die Ergebnisse modifizieren. Des Weiteren sind auch nicht alle Gelenke gleich betroffen und es liegen somit evtl. nicht in jedem Gelenk die exakt gleichen Pathomechanismen zugrunde. Und nicht nur die Gelenke unterscheiden sich¹¹⁰; auch Übergewicht ist nicht immer gleich – im Mausmodell mit einer standardisierten Diät und genetisch quasi identischen Tieren unter einheitlichen Bedingungen lässt sich zwar der Einfluss ebendieser Diät darstellen, beim Menschen ist die Diversität jedoch ungleich höher, daneben existiert kein „lebenslanges“ Arthrose-Mausmodell. Menschen sind bei weitem individueller, sowohl in Bezug auf den Metabolismus und die Disposition, Arthrose zu entwickeln, als auch bei ihrer Ernährung und der körperlichen Aktivität. Dadurch können auch viele Unterschiede zwischen humanen Studien bedingt sein. Dies soll aber nicht den Wert der Ergebnisse unter standardisierten Bedingungen schmälern, diese Bedingungen sind notwendig, um einzelne Mechanismen zunächst zu entdecken und darzustellen, damit dann im nächsten Schritt wieder der Rückschluss gefunden werden kann, wo diese Mechanismen in der diversen Lebensrealität des Menschen greifen.

Metabolische Veränderungen im Kontext der Arthroseinduktion

Körpergewicht

Generell konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die HFD zu einer höheren Streuung der Körpergewichte innerhalb einer Gruppe führt, was sich mathematisch in den höheren Standardabweichungen darstellt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Tiere untereinander aggressiver waren, wenn sie mit HFD gefüttert wurden, was z. B. zu Bisswunden und stärkerem Futterneid bzw. Verjagen einzelner Tiere vom Futter führte. Dieses Verhalten der Tiere untereinander konnte jedoch im Rahmen dieses Projekts nicht genauer erfasst werden.

Insgesamt führte die DMM-Operation zunächst zu einer Reduktion des Körpergewichts, was zum frühesten Zeitpunkt, also nach 4 Wochen, am deutlichsten zu sehen war. Da vier Wochen ausreichend Zeit zur Erholung von Auswirkungen des Eingriffs selbst sein sollten, ist die längerfristige Reduktion des

Gewichts eher auf die Schäden im Gelenk zurückzuführen. Bei den Tieren unter ND glich sich das Gewicht im Laufe der Zeit wieder an das der gesunden Vergleichsgruppe an, inwieweit dies unter HFD geschieht, ist durch die erhöhte Streuung der Einzelwerte schwer zu beurteilen. Die Tiere mit höherem Tibia-Score nahmen scheinbar weniger Gewicht zu, was z. B. durch Schmerzen und weniger Bewegung erklärbar wäre, dies ließ sich nicht eindeutig darstellen.

Die bei den operierten Tieren beobachtete Korrelation des Körpergewichts mit dem Tibia-Score steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einer anderen Studie, welche in einem vergleichbaren OA-Modell mit und ohne HFD durchgeführt wurde. Bei dem verwendeten Modell wurde nicht der Meniskus sondern das Kreuzband durchtrennt, was zu einem schnelleren Verlauf der Arthrose führte als das Durchtrennen der Menisken^{27, 111}. Die verwendeten Diäten waren eine HFD mit 60 % der kcal aus Fett und einer ND mit nur 10 % der kcal aus Fett. Dies ist vergleichbar mit den in dieser Arbeit verwendeten Diäten. In diesem Versuchsaufbau von Mooney *et al.* wurde gezeigt, dass der Tibia-Score nicht mit der Zunahme des Körpergewichts korreliert, obwohl auch in dieser Studie die Tiere unter HFD einen höheren OA-Score hatten als diejenigen unter ND¹¹¹.

Wenn alle Tiere des Versuchs einbezogen werden, korrelierte das Körpergewicht mit den systemischen Leptinwerten, jedoch nicht mit denen der anderen Adipokine. Dass diese Korrelation nicht mehr sichtbar war, wenn man die Gruppen der einbezogenen Tiere anders wählte (z. B. nur ein bestimmter Zeitpunkt oder nur HFD), lässt sich dadurch erklären, dass die gesunden Kontrollen weniger Tiere umfassten. Wenn die Tiere nach Diät getrennt ausgewertet wurden, wurden stets nur die schweren oder nur die leichten Tiere ausgewertet, sodass man nur einen sehr kurzen Bereich auf der x-Achse betrachten konnte (Abbildung 45).

Dass das Körpergewicht, wenn man relativ viele Tiere mit verschiedenen Diäten vergleicht (alle Tiere, oder DMM), relativ gut mit dem Leber-Score korreliert, war zu erwarten und bestätigte, dass nicht nur das Körpergewicht sondern auch der Leber-Score einen guten Messwert zur Quantifizierung der metabolischen Reaktionen auf die Diäten darstellt.

Leber-Score

Der Leber-Score zeigte, dass die Mäuse durch die HFD vermehrt große Fettvakuolen in den Zellen der Leber bildeten und somit eine Fettleber entwickelten. Der Nachteil der in Clustern angeordneten verfetteten Leberzellen lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass im Gewebe nicht immer dieselbe Schnittebene verwendet wurden und je nachdem in welcher Ebene die einzelnen Leberläppchen geschnitten wurden (längs oder quer durch den Leberlappen), sich die Struktur anders darstellte.

Da die Leberverfettung in diesem Projekt nur ein Maß für die systemische Veränderung des Metabolismus darstellen sollte, wurde nicht genauer untersucht, inwiefern die Physiologie der Leber durch die HFD verändert wird. Es ist aber z. B. beschrieben, dass das Leptin, welches mit dem Leber-Score in diesem Kontext korrelierte, auf hepatische Sternzellen profibrotisch wirkt¹¹². Im Rahmen der hier ausgewerteten Experimente wurde eine Leberfibrose allerdings ausgeschlossen (Abbildung 34). Im Kontext von chronisch-entzündlichen Wirkmechanismen, wie dem CIA-Mausmodell, könnte mittels immunhistologischer Färbung unter Verwendung von Antikörpern gegen bestimmte Zellmarker im Lebergewebe dargestellt werden, ob die Leberverfettung z. B. mit einer erhöhten Zahl an Kupfferzellen

oder innerhalb dieses Zelltyps im Verhältnis mehr pro-entzündliche M1- als anti-entzündliche M2-Marker vorliegen. Dies stand jedoch nicht im Vordergrund dieser Arbeit, in welcher der Leber-Score in erster Linie als Maß für die metabolische Veränderung durch die jeweilige Diät diente. Somit lag nahe, den Leber-Score vor allem mit anderen metabolischen Parametern wie Körpergewicht und Leptin zu korrelieren.

Toluidinblau-Färbung – chronic low-grade inflammation

Der Anstieg an CLS im Fettgewebe von denjenigen Tieren, welche eine HFD bekamen, zeigte, dass das in der Literatur bereits hinlänglich beschriebene Phänomen einer „chronic low-grade inflammation“^{6,43} auch in diesem Modell vorhanden und sichtbar ist. Dies bestätigte, dass auch in Bezug darauf das Modell der HFD im verwendeten C57Bl/6 Mausstamm sehr gut illustriert, was beim Menschen im Kontext von Adipositas beobachtet wird. Hierzu gehört, dass eine stark fettreiche Ernährung zu Übergewicht³⁸, zur Verfettung der Leber⁹⁸, zu erhöhtem Leptin⁷¹ als Indiz für Insulinresistenz⁷¹ und insbesondere zu vermehrt vorkommenden Makrophagen im Fettgewebe⁴³ führte, welche sich um einzelne Adipozyten anlagern. Des Weiteren sind die Adipozyten durch die HFD stark vergrößert⁴³.

Gleichzeitig zeigen aber die IL-6 Spiegel, welche so niedrig waren, dass sie nicht mit den verwendeten Methoden detektiert werden konnten, dass es sich tatsächlich nur um eine „low grade“ Entzündung handelt und keine übermäßige systemische Entzündung induziert wurde, welche einer Arthrose mit oder ohne Adipositas nicht entsprechen würde¹¹³.

Systemische Adipokinspiegel

Adiponektin

Generell zeigt sich, dass die Adiponektinspiegel in den HFD-Gruppen niedriger lagen als in den ND-Gruppen, signifikant in den Gruppen der gesunden Tiere mit ND bzw. HFD acht Wochen nach DMM-OP. Interessanterweise war nur acht Wochen nach OA-Induktion ein induktiver Effekt der OA auf die Adiponektinspiegel sichtbar. Dies war sowohl in ND als auch in HFD sichtbar, allerdings nur unter HFD signifikant. Der Zeitverlauf der systemischen Adiponektinspiegel zeigte ebenfalls, dass eine zeitabhängige Kinetik vorlag. Unter ND war der Unterschied zwischen 4 und 8 Wochen signifikant und unter HFD der Unterschied zwischen 6 und 8 Wochen. Insgesamt zeigte sich eine Erhöhung der Adiponektin-Serumspiegel über den gesamten Versuchszeitraum.

Da Adiponektin in verschiedenen Isoformen vorkommt⁵ und das hier verwendete ELISA-Kit die Gesamtheit aller Isoformen misst, wäre für künftige Projekte interessant, aufzuschlüsseln, wie sich welche Isoformen im Laufe der Zeit verändern, bzw. ob sich die Mengenverhältnisse der Isoformen verändern. Dabei würde es wahrscheinlich Sinn machen, eher humane als murine Seren auszuwerten und mit einem Arthrose-Score zu vergleichen, da therapeutische Ansätze, wenn sie über Adiponektin funktionieren sollen, sehr spezifisch entweder für einzelne Isoformen oder lokal sehr begrenzt wirken müssten. Diese sehr spezifischen Veränderungen wären dann evtl. nicht mehr direkt vom Tiermodell auf den Menschen übertragbar. Dieser therapeutische Ansatz einer Isoform-spezifischen oder lokal begrenzten Manipulation liegt darin begründet, dass die Rolle von Adiponektin in der Energiehomöostase sehr zentral ist, unter anderem führt ein Adiponektin Knockout bei Mäusen zu Diabetes¹¹⁴. Eine systemische Manipulation aller Isoformen des Adiponektins ist somit wegen der zu erwartenden Nebenwirkungen keine realistische Option zur Behandlung einer OA.

Leptin

Die signifikante Erhöhung des durch die HFD induzierten serologischen Leptinwertes entspricht dem in der Literatur beschriebenen Phänomen, dass Leptin mit dem BMI bzw. der Menge an weißem Fettgewebe korreliert⁴¹. Dies bestätigt, dass das hier verwendete murine Modell auch in Bezug auf das Adipokin Leptin widerspiegelt, was in humanen Studien gezeigt werden konnte ist. In humanen serologischen Studien konnte außerdem nachgewiesen werden, dass Leptin mit der Insulinresistenz korreliert¹⁰². Für C57Bl/6 Mäuse ist beschrieben, dass HFD zu einer Insulinresistenz führt⁴⁹, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Mäuse in diesem Versuchsaufbau insulinresistent waren. Auf Grund der Tatsache, dass es für die weiteren Ergebnisse nicht essenziell war, dass die Tiere insulinresistent waren, und ein Nachweis entweder eine zusätzliche Belastung für die Tiere (zum Beispiel durch den Einsatz einer hyperinsulinämischen-euglykämischen Klammer) oder ein zu hohen Verbrauch des ohnehin schon sehr knappen Serums bedeutet hätte, wurde auf die entsprechenden Messungen verzichtet.

Betrachtet man die Leptinspiegel genauer, so fällt auf, dass diejenigen Tiere, welche eine DMM Operation durchliefen, stets einen niedrigeren Leptinspiegel aufwiesen als die entsprechende gesunde Kontrolle. Die HFD führte zu einer größeren Streuung der Werte innerhalb der Gruppen, wodurch die Einflüsse der OA verschleiert wurden. Dies zeigt aber auch, dass in Bezug auf die systemischen Werte, der Einfluss der Diät stärker ist, als der der induzierten Arthrose. Anhand der hier ausgewerteten Tiere ließ sich daher nicht klären, ob die Reduktion der Leptinspiegel direkt durch die Arthrose ausgelöst wurde oder ein sekundärer Effekt des ebenfalls in den operierten Tieren reduzierten Körpergewichts war.

Interessanterweise sieht man, dass bei den Tieren mit OA und ND der Leptinspiegel über die Zeit etwas stieg, sich also immer mehr dem der gesunden Tiere angleicht. Eventuell könnte hier ein Zusammenhang mit der beobachteten lokalen Invasion von Fibroblasten in den Meniskus bestehen, da dieser Prozess vermutlich nach Induktion der OA zunächst ausgeprägter ist und dann wieder abklingt, wenn der Knorpel zerstört ist oder der Prozess z. B. durch Schonhaltung verlangsamt wird. Diese Veränderung im Zeitverlauf lässt sich unter HFD nicht mehr darstellen, sie ist jedoch wahrscheinlich der erhöhten Streuung der Einzelwerte zuzuschreiben.

Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf neue Hypothesen für therapeutische Ansätze beim Menschen besitzt durch die ausgeprägte Streuung eine Bedeutung, da die Leptinwerte insbesondere bei Adipositas stärker gestreut sind¹¹⁵. Im Kontext degenerativer Gelenkveränderungen sind aber meistens genau diese Patienten besonders betroffen und gerade hier wäre ein therapeutischer Ansatz, welcher metabolische Parameter wie Leptin einbezieht, besonders interessant.

Auch in Bezug auf Komorbiditäten von rheumatischen Erkrankungen könnte dem Leptin eine Rolle zukommen. So wird z. B. diskutiert, ob Leptin als Biomarker für Schlafstörungen¹¹⁶ oder nichtalkoholische Fettleberhepatitis¹¹⁷ verwendet werden kann, wobei in beiden Studien das auch aus dem rheumatologischen Kontext bekannte Problem bekannt ist, dass Studien z. B. wegen fehlender Normalisierung auf das Körpergewicht oder den BMI etc. nicht immer direkt vergleichbar sind. Auch im Zusammenhang mit Periodontitis wird Leptin als Biomarker diskutiert¹¹⁸. Dies ist ein besonders interessanter Zusammenhang, da Periodontitis auch in Korrelation mit RA-Erkrankungen steht¹¹⁹.

Visfatin

In dieser Studie waren die Visfatinwerte innerhalb der einzelnen Zeitpunkte relativ einheitlich und lediglich zum Vier-Wochen-Zeitpunkt war zwischen den DMM-Gruppen mit ND und HFD ein signifikanter Unterschied messbar. In der Literatur wird häufig eine ältere und inzwischen zurückgezogene Publikation zitiert, welche besagt, dass der Visfatinspiegel mit der Menge des viszeralen Fettes korrelieren würde⁸⁹. Andere Publikationen über Studien an Mäusen zeigten jedoch, dass eine HFD keinen Einfluss auf den Visfatinspiegel hat¹²⁰.

Betrachtet man für Visfatin die Entwicklung über die Zeit, so zeigt sich in beiden ND-Gruppen eine Abwärtsentwicklung der Spiegel, wobei bei den gesunden Tieren der Unterschied zwischen vier und acht Wochen signifikant war – in den DMM-Gruppen hingegen waren die Unterschiede zwischen allen Gruppen signifikant. Unter HFD scheint sich der Visfatinspiegel über die Zeit zu reduzieren, dies war im Vergleich zwischen der Vier- und Acht-Wochen-Gruppe ebenfalls signifikant. Innerhalb der Sechs-Wochen-Gruppe gibt es einzelne Ausreißer, wodurch diese Gruppe nicht in die Gesamtentwicklung der Spiegelverläufe passte. Der Großteil der Einzelwerte passte allerdings auch hier sehr gut in die generelle Abwärtsentwicklung des Zeitverlaufs.

Eine aktuelle Studie zeigte, dass bei Menschen der Visfatinspiegel im Serum mit dem Progress einer Nichtalkoholischen Fettleberhepatitis (NASH) korreliert, wohingegen die Daten unserer Experimente keinen Zusammenhang zwischen dem Leber-Score und dem Serumspiegel des Visfatins zeigen konnten¹²¹.

Korrelationsanalysen

Generell gilt es bei Korrelationsanalysen zu bedenken, wie viel Sinn eine Korrelation bzw. die Zusammenstellung der Gruppe von Tieren macht. So ist es z. B. in Bezug auf den Tibia-Score nicht sinnvoll, die gesunden Kontrollen einzubeziehen, da hier die Operation fehlt und somit die Vergleichbarkeit gering ist, wenn Faktoren korreliert werden, welche von der systemischen Belastung einer Operation und nicht nur von dem Progress der Arthrose beeinflusst werden könnten.

Adipokinverteilung im Gewebe

Adiponektin

Die lokale Adiponektinverteilung zeigt, dass diejenigen Areale, welche mit dem Blutkreislauf in direktem Austausch stehen, also insbesondere das Knochenmark, eine ausgeprägte Adiponektinexpression aufwies. Hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen. Die IHC als Methode eignet sich zwar nicht zur Quantifizierung von Proteinen im Gewebe, ist aber zur Lokalisation der Proteinexpression sehr gut geeignet. Dies ermöglicht die Aussage, dass im DMM-Modell in den geschädigten Menisken deutlich mehr Adiponektin-produzierende Zellen vorhanden sind, als im gesunden Knorpel der sham-operierten Tiere. Im Rückschluss bedeutet das, dass durch die Schädigung lokal mehr Adiponektin produziert wird. Inwiefern sich systemische Veränderungen lokal widerspiegeln, ist schwer zu beurteilen, da sich die systemischen Werte nur wenig verändern und dies bezüglich der Synthese im Gewebe methodisch nicht aufgelöst werden kann. Möglicherweise sind solche lokalen Veränderungen eine Erklärung für die Ergebnisse klinischer Studien

am Menschen, welche zeigten, dass die Adipokinwerte im Serum mit dem klinischen und dem radiologischen Verlauf einer OA korrelieren¹²².

Leptin

Die lokalen Leptinfärbungen zeigten ein ähnliches Bild wie bei Adiponektin. Im Unterschied zu Adiponektin gab es aber bei den serologischen Werten im Leptin sehr deutliche Unterschiede zwischen den Tieren mit HFD und ND. Würden sich diese lokal widerspiegeln, sollte dies mit einer semiquantitativen Methode wie der IHC darstellbar sein. Trotz der systemischen starken Einflüsse der Diät auf den Leptinspiegel zeigten sich immunhistochemisch im Gewebe keine derartigen Veränderungen.

Entsprechend den Färbung mit Antikörpern gegen Adiponektin, zeigte sich, dass diejenigen Zellen, welche in den geschädigten Meniskus der DMM-Tiere einwandern, Leptin synthetisieren. Dies passt zu der Beobachtung, dass beim Menschen die Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten mit dem radiographischen Stadium der OA korreliert¹²³.

Interessant ist, dass Leptin und Adiponektin systemisch entgegengesetzt reguliert werden (Adiponektin umgekehrt proportional zu BMI^{55, 59} und Leptin proportional zum BMI⁶), wohingegen im Gewebe eine vergleichbare Expression nachweisbar war.

Visfatin

Die Beobachtung, dass Chondrozyten im Säulenknorpel Visfatin synthetisieren, sobald sie hypertroph sind, wurde in ähnlicher Weise bereits in Osteophyten gemacht⁹⁵. Dies scheint also ein Mechanismus zu sein, welcher sich nicht nur im gesunden, sondern auch im pathologischen Kontext wiederfindet.

Die Rolle lokaler Visfatinspiegel könnte evtl. davon abhängen, welches Gelenk man untersucht. So wurde bei Menschen mit Coxarthrose gezeigt, dass die Visfatin- und IL-6-Konzentration in der Synovialflüssigkeit mit dem Schmerzempfinden korrelierte, wohingegen bei Gonarthrose nur die Leptinkonzentration mit dem Schmerzempfinden korrelierte¹²⁴.

Zelltypen im Gewebe

Die starke Vimentin-Expression in und um synoviale Zellen und die im Verhältnis dazu kaum vorhandenen anderen Zelltypen, welche im geschädigten Meniskus zu erwarten gewesen wären, lässt darauf schließen, dass es sich in erster Linie um Fibroblasten handelte, die in die Menisken invadierten. Diese Fibroblasten exprimierten alle drei untersuchten Adipokine (Adiponektin, Leptin und Visfatin). Es wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt, dass Fibroblasten auf diese Adipokine reagieren, und dass dies meist einen pro-entzündlicher Stimulus widerspiegelt.

Adiponektin:

In OASF führt Adiponektin zur erhöhten Expression von ICAM-1, wodurch Monozyten intensiver adhären und in das Synovialgewebe invadieren können¹²⁵. Das im DMM lokal im Gelenk vermehrt

vorkommende Adiponektin könnte, insbesondere in den geschädigten und von Zellen invadierten Menisken, genau diesen Effekt haben und somit die Schädigung der Menisken verstärken.

Adiponektin bewirkt z. B. *in vitro* bei humanen synovialen Fibroblasten die gesteigerte Sekretion von IL-6 und proMMP-1⁶⁴. Wenn dies im Mausmodell ebenso funktioniert, würde dies im geschädigten Meniskus lokal eine entzündliche Reaktion hervorrufen und so den degenerativen Prozess einerseits und eine sekundäre Entzündung andererseits verstärken.

In RASF wurden beide beschriebenen Adiponektinrezeptoren (AdipoR1 und AdipoR2) nachgewiesen und Adiponektin bewirkte bei diesen Zellen eine erhöhte Produktion von PGE₂ und COX-2, zweier pro-entzündlicher Faktoren¹²⁶. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sowohl RASF als auch OASF PGE₂ nach Adiponektinstimulation sezernieren, dies allerdings stärker in RASF. Außerdem zeigte sich, dass dieser Unterschied zwischen RA und OA vermutlich durch den AdipoR1 Rezeptor bewirkt wird¹²⁷. Hierüber lässt sich auch zum Teil das unterschiedlich aggressive Verhalten von Fibroblasten in RA und OA erklären. Bei RASF bewirkt Adiponektin eine erhöhte Expression von Osteopontin, welches wiederum Osteoklasten rekrutiert und somit zur Knochenerosion beiträgt¹²⁸. Dies ist ein weiterer Mechanismus, über welchen lokales Adiponektin wirken kann. Auch wenn natürlich RASF nicht zwingend gleich reagieren wie OASF, so stammen doch beide von Gelenksfibroblasten ab, man kann also vermuten, dass die Reaktion tendenziell in OASF gleich ist, also ebenfalls eine Steigerung der Osteopontinsynthese, wenn auch in anderem Ausmaß. Es konnte auch gezeigt werden, dass Adiponektin bei RASF bewirkt, dass diese stärker auf IL-1 β , also auf einen pro-entzündlichen Stimulus reagieren¹²⁹. Wenn dies in OASF ebenso funktioniert, würde dies lokal im DMM-Kniegelenk bedeuten, dass die in den Meniskus invadierenden Fibroblasten nicht nur mehr pro-entzündliche Faktoren sezernieren und besser invadieren, sondern auch sensibler für ebendiese Faktoren werden, es bildet sich also ein proentzündlich-destruktiver Feedback-Loop.

Leptin

In OASF führt Leptinstimulation zu gesteigerter Sekretion von IL-6 und es konnte gezeigt werden, dass diese Effekte über die lange Form des Leptinrezeptors vermittelt werden, welcher die IRS-1, PI3K, Akt, und AP-1 Signalwege aktiviert¹³⁰. Dies bedeutet, dass das lokal im DMM-operierten Knie vermehrt vorkommende Leptin über IL-6 ein entzündliches Milieu schafft. Leptin induziert die Sekretion von IL-8 in RASF und OASF über den Leptinrezeptor und anschließend IRS-1, PI3K, Akt und NF κ B¹³¹.

Visfatin

Visfatin bewirkt eine gesteigerte Sekretion von IL-6 und TNF- α in synovialen Fibroblasten von OA-Patienten. Dies geschieht über Inhibition von miR-199a-5p-Expression durch ERK-, p38- und JNK-Signaltransduktion⁹⁴. Die in den Meniskus einwandernden Fibroblasten in dieser Studie waren also ebenfalls diesem Effekt ausgesetzt, auch wenn dies nicht unbedingt durch die HFD modifiziert wurde, da diese den Visfatinspiegel nicht verändert hat.

Für RASF wurden eine Vielzahl von Genen gefunden, die durch Visfatin reguliert werden, darunter befanden sich Chemokine (z. B. Gro- α , ENA-78, GCP-2 und MCP-1), Zytokine wie IL-6 und Proteinasen (MMP-1 und MMP-3). Interessanterweise konnte bei unseren Experimenten auch gezeigt werden, dass es eine zeitliche Kinetik gibt, wobei Zellen zunächst stärker auf Visfatin reagierten und dann

vermutlich eine Gegenregulation stattfand, da die Zytokinsynthese abflachte.¹³² Dies ist im Kontext der Fragestellung nach Unterschieden zwischen systemischen und lokalen Effekten unter Umständen von Bedeutung, da systemische Visfatin Spiegel wahrscheinlich nicht durch das Körpergewicht beeinflusst wurden, somit also über lange Zeit wirkten, wohingegen lokale und entzündungsinduzierte Visfatinsekretion nicht zwingend über lange Zeit vorhanden waren. Hier könnte es durchaus Unterschiede zwischen RA und OA Fibroblasten geben, da die Präsenz einer RA längerfristiger und stärker ein lokales Entzündungsmilieu bedeutet.

Auch die Chemokine CXCL8 (IL-8) und CCL2 (MCP-1) wurden in Fibroblasten (in diesem Fall wurde eine Zelllinie untersucht) durch Visfatin hochreguliert¹³³.

Verknöcherungen der Menisken

Die Verknöcherung der Menisken, wie sie in diesem Modell teilweise auftrat, wurde auch in verschiedenen Fallstudien beim Menschen gefunden, sodass dieser Effekt im verwendeten Mausmodell offensichtlich ein Pendant in humanen-pathologischen Gelenksveränderungen hat¹³⁴⁻¹³⁷. Inwiefern es sich dabei um denselben Entstehungsmechanismus handelt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden, da das Phänomen beim Menschen selten ist, bei Nagetieren jedoch auch in anderen Zusammenhängen bekannt ist, wie zum Beispiel beim Arthrosemodell im Meerschweinchen¹³⁸. Auch in anderen Publikationen, welche mit dem DMM-Modell arbeiten, kann man in den Abbildungen histologischer Färbungen solche Verknöcherungen sehen, auch wenn diese im Text nicht weiter erwähnt und beschrieben werden^{27,139}, sodass dies in murinen Modellen nicht untypisches Phänomen ist. Da das Auftreten der Verknöcherungen keinem erkennbaren Muster folgt, muss man sich daher bei Mausmodellen die Frage stellen, inwieweit ein Einfluss der Verknöcherung auf die Arthroseprogression vorhanden sein könnte. Da in unseren Experimenten kein Zusammenhang erkennbar war, wird hier davon ausgegangen, dass der Einfluss vernachlässigbar ist, trotzdem müssen diese Verknöcherungen induziert werden und haben wahrscheinlich auch in irgendeiner Form Auswirkungen auf das Gelenk. Interessant wäre es, dies zukünftig in anderen Mausmodellen zur OA mit zu untersuchen, um besser klären zu können, wann und wo dieses Phänomen auftritt. Eventuell kann man hiermit auch den Entstehungsmechanismus der Verknöcherungen in humanen Menisken herausfinden.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich Adipokine im Verlauf einer RA und vor allem OA im Tiermodell systemisch und lokal im Gewebe darstellen. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass bei der OA die lokale Adipokinverteilung nicht in erster Linie mit dem Metabolismus, sondern mit dem durch DMM traumatisch induzierten Krankheitsverlauf zusammenhängen. Diese Entkopplung lokaler Prozesse könnte die Erklärung dafür sein, warum für ortsständige Zelltypen experimentell pro-entzündliche Einflüsse der Adipokine gezeigt wurden, während für Adiponektin eher systemisch anti-entzündliche Einflüsse bekannt sind⁶³.

Die Adipokine tragen im Organismus in erster Linie zur Energiehomöostase bei, wie sich unter anderem daran zeigt, dass Mutationen in Leptin- oder Leptinrezeptoren zu starkem Übergewicht^{140, 141} und das Fehlen von Adiponektin zu deutlich stärker Diät-induzierter Insulinresistenz¹⁴² führen. Diese den ganzen Organismus betreffenden metabolischen Effekte machen eine systemische Modulation der Adipokine im rheumatologischen Kontext sehr schwierig. Trotzdem ist in verschiedenen Studien gezeigt worden, dass sich Adipositas, und im Speziellen auch die Adipokine, auf den Krankheitsverlauf, das Erkrankungsrisiko und die Lebensqualität auswirken³. Hier ist die Kenntnis der einzelnen Mechanismen von Bedeutung, insbesondere dann, wenn zwischen verschiedenen Erkrankungen unterschieden werden soll. So könnten auf dieser Basis potenzielle neue Angriffspunkte für zukünftige Medikamente gefunden werden. Die Erkenntnis, dass systemische und lokale Prozesse nicht direkt gekoppelt sind, lässt auch darauf schließen, dass eine direkte Manipulation der Adipokine im Gelenk ein erfolversprechenderer Ansatz sein könnte, als die systemische Manipulation mit den zu erwartenden Nebenwirkungen in Bezug auf den Metabolismus des Gesamtorganismus.

Desweiteren könnte der behandelnde Arzt durch das Wissen über die Funktion der Adipokine im Entzündungskontext mit Adipositas möglicherweise abschätzen, wie im Umkehrschluss Medikamente auf die jeweiligen rheumatischen Krankheiten abgestimmt werden müssten und wie diese den Metabolismus verändern, insbesondere dann, wenn dieser z. B. durch eine Insulinresistenz vorbelastet ist.

Generell muss eine gesellschaftliche und langfristige Lösung gefunden werden, um die immer weiter verbreitete Problematik des Übergewichts und der Adipositas in den Griff zu bekommen. Nicht nur in Hinblick auf Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, sondern auch in Bezug z. B. auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen wäre dies, sofern es denn umsetzbar ist, effizienter als die Modulation einzelner Konsequenzen und Faktoren einer Adipositas.

Danksagung

Natürlich lässt sich ein so umfangreiches Projekt nicht alleine bewältigen und ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner, welcher dieses Projekt erdacht und die zugehörigen finanziellen Möglichkeiten zur Verfügung gestellt hat. Außerdem Frau PD Dr. rer. nat. Elena Neumann, die als Laborleiterin und Mentorin immer ein offenes Ohr hatte, stets den Überblick wahrte und mich wieder eingefangen hat, wenn ich mich verrannt hatte oder einfach nicht weiter kam. Ich bin Ihnen beiden sehr dankbar für die Möglichkeit, immer den Rat von erfahrenen Medizinerinnen und Biologen bekommen zu haben, ich habe das immer als eine besonders erfolgsversprechende Kombination empfunden. Außerdem möchte ich auch besonders dafür danken, dass ich die Chance hatte mein Projekt auf so vielen Kongressen zu präsentieren, diese Erfahrung ist für mich persönlich besonders wertvoll und es hat mir immer sehr viel Freude gemacht.

Auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael U. Martin möchte ich dafür danken, dass er als Gutachter meine Doktorarbeit betreut hat und in den Gesprächen zwischendurch jedes Mal neue Ideen und Anregungen für mich hatte. Seine klare und kritische Art das Projekt zu sehen, hat nicht nur dem Projekt gut getan, sondern auch mir geholfen einen Schritt weiter zu denken.

Vielen Dank auch an die Kooperationspartner, insbesondere Jubin Luo und Prof. Aline Bozec für die Zusammenarbeit bei den Tierversuchen.

Ein ganz besonders großer Dank gilt Carina Schreyäck die als biologisch technische Assistentin an dem Projekt mitgearbeitet hat.

Liebe Carina, du hast mir anfangs alle Methoden beigebracht, warst einfach immer unglaublich fleißig und hilfsbereit und dafür bin ich dir von ganzem Herzen dankbar. Du warst dir nicht zu schade auch lange Arbeitstage auf dich zu nehmen, mit mir nach Erlangen zu fahren und dafür die Weihnachtsfeier zu verpassen, weil wir im Stau standen. All deine Hilfe hier aufzuzählen sprengt den Rahmen, ich habe aber nichts davon vergessen und bin dir sehr dankbar!

Auch meine Kollegin und inzwischen gute Freundin Maria Schwarz soll hier natürlich erwähnt werden: Du hast mich aufgefangen wenn, es nicht gut gelaufen ist, hast immer dafür gesorgt, dass überall Ordnung geherrscht hat und vor allem hatten wir immer Themen zum Quatschen und Lachen.

Dem ganzen Team im Labor bin ich für die vielen Tipps, Unterstützung mit Statistik (vor allem Klaus Frommer) und all die Mittagspausen, in denen wir zusammen gelacht haben sehr dankbar. Es war eine tolle Zeit mit euch und ich danke euch von Herzen, dass ihr einfach alle so seid wie ihr seid.

Für das Weiterführen des Projekts möchte ich Hani Sauermilch danken und auch für die Chance, das Projekt nochmal aus einer anderen Perspektive zu sehen.

Natürlich möchte ich mich auch ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt hat: Ohne euch wäre das alles nicht möglich und ohne euch wäre ich überhaupt nie so weit gekommen, dass ich überhaupt über eine Promotion nachgedacht hätte.

Literaturverzeichnis

1. Berlin, R. Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin (Robert Koch-Institut, 2015).
2. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. World Health Organ Tech Rep Ser 919, i-x, 1-218, back cover (2003).
3. Hülser, M.-L., Frommer, K. W. & Müller-Ladner, U. Die Rolle des Metabolismus und metabolisch relevanter Faktoren in der Pathophysiologie rheumatischer Erkrankungen. *Akt Rheumatol* (2018).
4. Lohmander, L. S., Gerhardsson de Verdier, M., Rollof, J., Nilsson, P. M. & Engstrom, G. Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study. *Ann Rheum Dis* 68, 490-6 (2009).
5. Neumann, E., Frommer, K. W., Vasile, M. & Muller-Ladner, U. Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum* 63, 1159-69 (2011).
6. Pereira, S. S. & Alvarez-Leite, J. I. Low-Grade Inflammation, Obesity, and Diabetes. *Curr Obes Rep* 3, 422-31 (2014).
7. Shapses, S. A. & Riedt, C. S. Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns? *J Nutr* 136, 1453-6 (2006).
8. Graumann, W. & Sasse, D. *CompactLehrbuch der gesamten Anatomie / Allgemeine Anatomie* (Schattauer, 2004).
9. Glyn-Jones, S. et al. Osteoarthritis. *Lancet* 386, 376-87 (2015).
10. Taljanovic, M. S. et al. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiol* 37, 423-31 (2008).
11. Mahjoub, M., Berenbaum, F. & Houard, X. Why subchondral bone in osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis. *Osteoporos Int* 23 Suppl 8, S841-6 (2012).
12. Yahara, Y. et al. Pterostilbene prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nat Commun* 7, 10959 (2016).
13. Hino, K. et al. Master regulator for chondrogenesis, *Sox9*, regulates transcriptional activation of the endoplasmic reticulum stress transducer *BBF2H7/CREB3L2* in chondrocytes. *J Biol Chem* 289, 13810-20 (2014).
14. Zimmermann, P. et al. Correlation of *COL10A1* induction during chondrogenesis of mesenchymal stem cells with demethylation of two CpG sites in the *COL10A1* promoter. *Arthritis Rheum* 58, 2743-53 (2008).
15. Klein, K., Gay, R. E. & Gay, S. [Synovial fibroblasts : Main players in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 75, 560-4 (2016).
16. Muller-Ladner, U. & Gay, S. MMPs and rheumatoid synovial fibroblasts: Siamese twins in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 61, 957-9 (2002).
17. Choy, E. H. & Panayi, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344, 907-16 (2001).
18. Goldring, M. B. & Goldring, S. R. Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213, 626-34 (2007).
19. Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646-56 (2003).
20. Muthuri, S. G., McWilliams, D. F., Doherty, M. & Zhang, W. History of knee injuries and knee osteoarthritis: a meta-analysis of observational studies. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 1286-93 (2011).
21. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 64, 1697-707 (2012).

22. Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51, 249-57 (2012).
23. Hawker, G. A. et al. All-cause mortality and serious cardiovascular events in people with hip and knee osteoarthritis: a population based cohort study. *PLoS One* 9, e91286 (2014).
24. Calvet, J. et al. Differential involvement of synovial adipokines in pain and physical function in female patients with knee osteoarthritis. A cross-sectional study. *Osteoarthritis Cartilage* (2018).
25. Roos, H., Adalberth, T., Dahlberg, L. & Lohmander, L. S. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage* 3, 261-7 (1995).
26. Jacobsen, K. Osteoarthrosis following insufficiency of the cruciate ligaments in man. A clinical study. *Acta Orthop Scand* 48, 520-6 (1977).
27. Glasson, S. S., Blanchet, T. J. & Morris, E. A. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 1061-9 (2007).
28. Meng, Z. & Huang, R. Topical Treatment of Degenerative Knee Osteoarthritis. *Am J Med Sci* 355, 6-12 (2018).
29. Lee, D. M. & Weinblatt, M. E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 358, 903-11 (2001).
30. Araki, Y. & Mimura, T. The Mechanisms Underlying Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis from the Perspective of the Epigenetic Landscape. *J Immunol Res* 2016, 6290682 (2016).
31. Sakkas, L. I., Bogdanos, D. P., Katsiari, C. & Platsoucas, C. D. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. *Autoimmun Rev* 13, 1114-20 (2014).
32. Kim, G. W. et al. IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Arch Pharm Res* 38, 575-84 (2015).
33. Brand, D. D., Latham, K. A. & Rosloniec, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2, 1269-75 (2007).
34. Vincent, T. L., Williams, R. O., Maciewicz, R., Silman, A. & Garside, P. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models. *Rheumatology (Oxford)* 51, 1931-41 (2012).
35. Bessis, N., Decker, P., Assier, E., Semerano, L. & Boissier, M. C. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol* 39, 469-486 (2017).
36. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894, i-xii, 1-253 (2000).
37. Prentice, A. M., Hennig, B. J. & Fulford, A. J. Evolutionary origins of the obesity epidemic: natural selection of thrifty genes or genetic drift following predation release? *Int J Obes (Lond)* 32, 1607-10 (2008).
38. Harris, J. L., Pomeranz, J. L., Lobstein, T. & Brownell, K. D. A crisis in the marketplace: how food marketing contributes to childhood obesity and what can be done. *Annu Rev Public Health* 30, 211-25 (2009).
39. Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I. & Kim, J. B. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7, 30 (2016).
40. Girard, J. & Lafontan, M. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes Metab* 34, 439-45 (2008).
41. Abella, V. et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol* 13, 100-109 (2017).
42. Zeyda, M. & Stulnig, T. M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology* 55, 379-86 (2009).
43. Xu, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-30 (2003).

44. Martinez-Santibanez, G., Cho, K. W. & Lumeng, C. N. Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. *Methods Enzymol* 537, 17-30 (2014).
45. Welsch, U. *Sobotta Lehrbuch Histologie* (ELSEVIER, 2006).
46. Graumann, W. & Sasse, D. *Compact Lehrbuch der gesamten Anatomie / Innere Organe* (Schattauer, 2004).
47. Samuel, V. T., Petersen, K. F. & Shulman, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* 375, 2267-77 (2010).
48. West, K. M. & Kalbfleisch, J. M. Influence of nutritional factors on prevalence of diabetes. *Diabetes* 20, 99-108 (1971).
49. Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A. & Feinglos, M. N. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37, 1163-7 (1988).
50. West, D. B., Boozer, C. N., Moody, D. L. & Atkinson, R. L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* 262, R1025-32 (1992).
51. Neumann, E., Frommer, K. W. & Muller-Ladner, U. [Adiponectin as target in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 73, 556-8 (2014).
52. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-82 (2004).
53. Scotece, M. et al. Adipokines as drug targets in joint and bone disease. *Drug Discov Today* 19, 241-58 (2014).
54. Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. & Lodish, H. F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270, 26746-9 (1995).
55. Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-703 (1996).
56. Maeda, K. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221, 286-9 (1996).
57. Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N. H., Mazda, T. & Tomita, M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 120, 803-12 (1996).
58. Yamauchi, T. et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-95 (2002).
59. Trujillo, M. E. & Scherer, P. E. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 257, 167-75 (2005).
60. Yamauchi, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-6 (2001).
61. Hara, K. et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 51, 536-40 (2002).
62. Spranger, J. et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 361, 226-8 (2003).
63. Beltowski, J., Jamroz-Wisniewska, A. & Widomska, S. Adiponectin and its role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 8, 7-46 (2008).
64. Ehling, A. et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 176, 4468-78 (2006).
65. Frommer, K. W. et al. Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62, 2886-99 (2010).
66. Luo, X. H. et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. *J Bone Miner Res* 21, 1648-56 (2006).
67. Zhang, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-32 (1994).
68. Bajzova, M. et al. Retinol-binding protein 4 expression in visceral and subcutaneous fat in human obesity. *Physiol Res* 57, 927-34 (2008).

69. Jung, C. H. & Kim, M. S. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res* 36, 201-7 (2013).
70. Li, H. M. et al. Emerging role of adipokines in systemic lupus erythematosus. *Immunol Res* 64, 820-30 (2016).
71. de Heredia, F. P., Gomez-Martinez, S. & Marcos, A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc* 71, 332-8 (2012).
72. Chen, K. et al. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* 12, 425-32 (2006).
73. Abella, V. et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol* 13, 100-109.
74. Lago, F., Dieguez, C., Gomez-Reino, J. & Gualillo, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 313-25 (2007).
75. Tchio Mantho, C. I., Harbuzariu, A. & Gonzalez-Perez, R. R. Histone deacetylases, microRNA and leptin crosstalk in pancreatic cancer. *World J Clin Oncol* 8, 178-189 (2017).
76. Wauman, J., Zabeau, L. & Tavernier, J. The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 30 (2017).
77. Charles-Schoeman, C. et al. Effects of tofacitinib and other DMARDs on lipid profiles in rheumatoid arthritis: implications for the rheumatologist. *Semin Arthritis Rheum* 46, 71-80 (2016).
78. Reseland, J. E. et al. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16, 1426-33 (2001).
79. Figenschau, Y., Knutsen, G., Shahazeydi, S., Johansen, O. & Sveinbjornsson, B. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 190-7 (2001).
80. Dumond, H. et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48, 3118-29 (2003).
81. Otero, M., Gomez Reino, J. J. & Gualillo, O. Synergistic induction of nitric oxide synthase type II: in vitro effect of leptin and interferon-gamma in human chondrocytes and ATDC5 chondrogenic cells. *Arthritis Rheum* 48, 404-9 (2003).
82. Bao, J. P. et al. Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep* 37, 3265-72 (2010).
83. Laue, T. et al. Altered NK cell function in obese healthy humans. *BMC Obes* 2, 1 (2015).
84. Neumann, E., Junker, S., Schett, G., Frommer, K. & Muller-Ladner, U. Adipokines in bone disease. *Nat Rev Rheumatol* 12, 296-302 (2016).
85. Carlton, E. D., Demas, G. E. & French, S. S. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. *Horm Behav* 62, 272-9 (2012).
86. Revollo, J. R., Grimm, A. A. & Imai, S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 50754-63 (2004).
87. Samal, B. et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 14, 1431-7 (1994).
88. Garten, A. et al. Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 11, 535-46 (2015).
89. Fukuhara, A. et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307, 426-30 (2005).
90. Revollo, J. R. et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 6, 363-75 (2007).
91. Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J. & Imai, S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14, 528-36 (2011).
92. Schaffler, A. et al. Adipocytokines in synovial fluid. *Jama* 290, 1709-10 (2003).

93. Nowell, M. A. et al. Regulation of pre-B cell colony-enhancing factor by STAT-3-dependent interleukin-6 trans-signaling: implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 2084-95 (2006).
94. Wu, M. H., Tsai, C. H., Huang, Y. L., Fong, Y. C. & Tang, C. H. Visfatin Promotes IL-6 and TNF-alpha Production in Human Synovial Fibroblasts by Repressing miR-199a-5p through ERK, p38 and JNK Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* 19 (2018).
95. Junker, S. et al. Expression of adipokines in osteoarthritis osteophytes and their effect on osteoblasts. *Matrix Biol* 62, 75-91 (2017).
96. Jia, S. H. et al. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. *J Clin Invest* 113, 1318-27 (2004).
97. Meng, X. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical transcription factor for IL-10-producing B cells in autoimmune disease. *Nat Commun* 9, 251 (2018).
98. Gilat, T. et al. Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC). *Hepatology* 38, 436-42 (2003).
99. Glasson, S. S., Chambers, M. G., Van Den Berg, W. B. & Little, C. B. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 18 Suppl 3, S17-23 (2010).
100. Antonio, M., Nogueira, J., Vitorino, R. & Daniel-da-Silva, A. L. Functionalized Gold Nanoparticles for the Detection of C-Reactive Protein. *Nanomaterials (Basel)* 8 (2018).
101. Stoop, R. et al. Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. *Arthritis Rheum* 42, 2381-9 (1999).
102. Pehlivanov, B. & Mitkov, M. Serum leptin levels correlate with clinical and biochemical indices of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 14, 153-9 (2009).
103. Leader, M., Collins, M., Patel, J. & Henry, K. Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker. *Histopathology* 11, 63-72 (1987).
104. Thomas, M. L. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7, 339-69 (1989).
105. Kurtin, P. J. & Pinkus, G. S. Leukocyte common antigen--a diagnostic discriminant between hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms in paraffin sections using monoclonal antibodies: correlation with immunologic studies and ultrastructural localization. *Hum Pathol* 16, 353-65 (1985).
106. Lee, Y. H. & Bae, S. C. Circulating adiponectin and visfatin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: A meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 21, 664-672 (2018).
107. Albrecht, K. et al. Body mass index distribution in rheumatoid arthritis: a collaborative analysis from three large German rheumatoid arthritis databases. *Arthritis Res Ther* 18, 149 (2016).
108. Felson, D. T. & Chaisson, C. E. Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 671-81 (1997).
109. Cicuttini, F. M., Baker, J. R. & Spector, T. D. The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. *J Rheumatol* 23, 1221-6 (1996).
110. Frank-Bertoncelj, M. et al. Epigenetically-driven anatomical diversity of synovial fibroblasts guides joint-specific fibroblast functions. *Nat Commun* 8, 14852 (2017).
111. Mooney, R. A., Sampson, E. R., Lerea, J., Rosier, R. N. & Zuscik, M. J. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Res Ther* 13, R198 (2011).
112. Potter, J. J., Rennie-Tankesley, L. & Mezey, E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 38, 281-8 (2003).
113. Scanzello, C. R. Role of low-grade inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 29, 79-85 (2018).
114. Hashimoto, H. et al. Adiponectin deficiency-induced diabetes increases TNFalpha and FFA via downregulation of PPARalpha. *J Vet Med Sci* (2018).

115. Considine, R. V. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334, 292-5 (1996).
116. Pan, W. & Kastin, A. J. Leptin: a biomarker for sleep disorders? *Sleep Med Rev* 18, 283-90 (2014).
117. Neuman, M. G., Cohen, L. B. & Nanau, R. M. Biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol* 28, 607-18 (2014).
118. Jain, H. & Mulay, S. Relationship between periodontitis and systemic diseases: leptin, a new biomarker? *Indian J Dent Res* 25, 657-61 (2014).
119. Lundberg, K., Wegner, N., Yucel-Lindberg, T. & Venables, P. J. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol* 6, 727-30 (2010).
120. Dall, M. et al. Hepatic NAD(+) levels and NAMPT abundance are unaffected during prolonged high-fat diet consumption in C57BL/6JBomTac mice. *Mol Cell Endocrinol* (2018).
121. Mousavi, Z. et al. Correlation of visfatin level with non-alcoholic fatty liver in metabolic syndrome. *Med J Islam Repub Iran* 31, 28 (2017).
122. Cuzdan Coskun, N., Ay, S., Evcik, F. D. & Oztuna, D. Adiponectin: is it a biomarker for assessing the disease severity in knee osteoarthritis patients? *Int J Rheum Dis* 20, 1942-1949 (2017).
123. Ku, J. H. et al. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 28, 1431-5 (2009).
124. Bas, S. et al. Adipokines correlate with pain in lower limb osteoarthritis: different associations in hip and knee. *Int Orthop* 38, 2577-83 (2014).
125. Chen, H. T. et al. Adiponectin enhances intercellular adhesion molecule-1 expression and promotes monocyte adhesion in human synovial fibroblasts. *PLoS One* 9, e92741 (2014).
126. Kusunoki, N. et al. Adiponectin stimulates prostaglandin E(2) production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 62, 1641-9 (2010).
127. Zuo, W. et al. Adiponectin receptor 1 mediates the difference in adiponectin- induced prostaglandin E2 production in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. *Chin Med J (Engl)* 124, 3919-24 (2011).
128. Qian, J. et al. Adiponectin aggravates bone erosion by promoting osteopontin production in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 20, 26 (2018).
129. Kontny, E., Janicka, I., Skalska, U. & Maslinski, W. The effect of multimeric adiponectin isoforms and leptin on the function of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol* 44, 363-8 (2015).
130. Yang, W. H. et al. Leptin induces IL-6 expression through OBRI receptor signaling pathway in human synovial fibroblasts. *PLoS One* 8, e75551 (2013).
131. Tong, K. M. et al. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 20, 1478-88 (2008).
132. Meier, F. M. et al. Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* 287, 28378-85 (2012).
133. Evans, L., Williams, A. S., Hayes, A. J., Jones, S. A. & Nowell, M. Suppression of leukocyte infiltration and cartilage degradation by selective inhibition of pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase: Apo866-mediated therapy in human fibroblasts and murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 1866-77 (2011).
134. Duran, S., Cavusoglu, M. & Kocadal, O. Ossification of the discoid meniscus: A case report. *J Clin Orthop Trauma* 5, 270-3.
135. Van Breuseghem, I., Geusens, E., Pans, S. & Brys, P. The meniscal ossicle revisited. *Jbr-Btr* 86, 276-7 (2003).
136. Yoo, J. H., Yang, B. K. & Son, B. K. Meniscal ossicle: a case report. *Knee* 14, 493-6 (2007).
137. Rohilla, S., Yadav, R. K., Singh, R., Devgan, A. & Dhaukhandi, D. B. Meniscal ossicle. *J Orthop Traumatol* 10, 143-5 (2009).
138. Kapadia, R. D. et al. Meniscal ossification in spontaneous osteoarthritis in the guinea-pig. *Osteoarthritis Cartilage* 8, 374-7 (2000).

139. Qin, N. et al. Local intra-articular injection of resveratrol delays cartilage degeneration in C57BL/6 mice by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *J Pharmacol Sci* 134, 166-174 (2017).
140. Rosenbaum, M. & Leibel, R. L. The role of leptin in human physiology. *N Engl J Med* 341, 913-5 (1999).
141. Tilg, H. & Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772-83 (2006).
142. Maeda, N. et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731-7 (2002).