Korrelation von metabolischen Parametern einer Hochfett-Diät mit Parametern arthritischer Gelenkveränderungen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hani Manfred Sauermilch
aus Bad Homburg

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
und der Professur für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: PD Dr. med. Christian Fölsch

Tag der Disputation: 21.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Rheumatoide Arthritis 2
1.1.1 Gelenkaufbau 3
1.1.2 Entzündliche Veränderungen im Rahmen der RA 4
1.1.2 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) 5
1.2 Übergewicht und Adipositas 6
1.3 Fettgewebe 8
1.4 Adipokine und Adipozytokine 9
1.4.1 Leptin 10
1.4.2 Visfatin 11
1.4.3 Adiponektin 12
1.5 Fragestellungen 14
2. Material und Methoden 15
2.1 Material 15
2.2 Methoden 20
2.2.1 CIA-Modell (Firma ATRC Aurigon) 20
2.2.2 Mäuse 20
2.2.3 Versuchsgruppen des CIA-Modells 20
2.2.4 Induktion der Adipositas im CIA-Modell 21
2.2.5 CIA-Induktion 22
2.2.6 ELISA 23
2.2.7 Histologische Färbungen 23
2.2.8 Immunhistologische Färbungen 24
2.3 Methoden zur Datenanalyse und statistischen Auswertung 29
2.3.1 Scores 29
2.3.2 Statistische Auswertungen 35
3. Ergebnisse 37
3.1 Körpergewicht 37
3.2 Histologische Färbungen: 40
3.2.1 Leber-Score 40
3.2.2. CLS-Score 43
3.3.3 Auswertung und Entwicklung eines histologischen CIA-Scores 48
3.3 Immunhistologische Färbungen 55

3.3.1 Leptin 55
3.3.2 Visfatin 59
3.3.3 Adiponektin 63
3.3.4 Vimentin 67
3.3.5 CD45 68
3.3.6 F4/80 69
3.4 Serologie 70
3.4.1 Visfatin 70
3.5 Korrelationsanalysen 72
3.5.1 Körpergewicht 72
3.5.2 Leber-Score 74
3.5.3 CLS-Score 76
3.5.4 Gelenk-Score 78
3.5.5 Leptin-Score 79
3.5.6 Visfatin-Score 81
3.5.7 Adiponektin-Score 83
4. Diskussion 86
4.1 Metabolische Veränderungen 86
4.1.1 Körpergewicht 86
4.1.2 Leber-Score 87
4.1.3 CLS-Score 88
4.2 Entzündliche Veränderungen 90
4.2.1 Arthritis-Induktion 90
4.3 Adipokine 93
4.3.1 Leptin 93
4.3.2 Visfatin 96
4.3.3 Adiponektin 99
5. Zusammenfassung 104
6. Summary 106
7. Abbkürzungsverzeichnis 107
8. Literaturverzeichnis 108
9. Publikationsverzeichnis 121
10. Ehrenwörtliche Erklärung 122
11. Danksagung 123

1. Einleitung

Die weltweit häufigsten Ursachen für chronische Schmerzzustände, eingeschränkte Mobilität und Funktionalität sowie einer verminderten Lebensqualität sind Erkrankungen des muskuloskelettalen Formenkreises (Woolf et al. 2012), (Robert Koch Institut 2015). Neben eines hohen Leidendrucks der Betroffenen verursachen diese Erkrankungen als Folge von Arbeitskraftausfall und Therapiekosten eine enorme wirtschaftliche Belastung des Gesundheitssystems. Aufgrund des demographischen Wandels und der hohen Prävalenz adipöser Menschen gewinnen neben metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen vor allem auch rheumatologische Erkrankungen zunehmend an Bedeutung (Robert Koch Institut 2015). Mit einer Prävalenz von ca. 0,5% bis 0,8% der erwachsenen Bevölkerung ist die rheumatoide Arthritis (RA) die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung in Deutschland. Als Risikofaktoren wurden beispielsweise zunehmendes Alter, Übergewicht, Rauchen und genetische Faktoren identifiziert. Die Pathogenese der RA ist sehr komplex und bis heute nur in Teilen verstanden. Um einerseits den Risikofaktoren und der Krankheitsentstehung frühzeitig vorbeugen zu können und andererseits die bereits etablierte RA adäquat therapieren zu können, bedarf es umfassender Forschungen hinsichtlich pathogenetischer Prozesse (Robert Koch Institut 2015). Hierzu müssen, um der komplexen Krankheitsentstehung und Entwicklung der RA gerecht zu werden, gelenknahe Prozesse und darüber hinaus auch systemische Einflussfaktoren wie metabolische Störungen und systemische Entzündungsprozesse untersucht werden.

In den Fokus der Forschung sind zudem spezielle Signalmoleküle im Fettgewebe, die sogenannten Adipokine, als Botenstoffe gerückt. Diese bioaktiven Substanzen scheinen neben einer Vielzahl von systemischen und metabolischen Effekten auch auf lokale, gelenknahe Prozesse Einfluss zu haben und folglich in der Pathogenese der RA eine bedeutende Rolle zu spielen.

Ziel dieser Arbeit war es, die pathogenetischen Prozesse der RA in Bezug auf metabolische Veränderungen wie Übergewicht aber auch den Einfluss von Adipokinen zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Hierzu wurde in einem Tiermodell an Mäusen mit und ohne entzündliche Arthritis eine Adipositas induziert und die Pathogenese der Arthritis zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die durch eine persistierende Entzündung von Gelenken, insbesondere des Synoviums, charakterisiert ist und mit einer progredienten Gelenkzerstörung einhergeht. Die RA spielt als die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung in Deutschland, aber auch in anderen Teilen der westlichen Welt eine zunehmend bedeutsamere Rolle (Robert Koch Institut 2015). Die RA manifestiert sich vor allem im 4.-6. Lebensjahrzehnt, bei Frauen 2- bis 4-mal so häufig wie bei Männern und zeigt mit zunehmendem Alter eine steigende Prävalenz. Neben hereditären Faktoren, wie einer HLA-DR4 Assoziation, wird auch das Rauchen als Risikofaktor diskutiert (Arasteh et al. 2018), (Robert Koch Institut 2015).

Das klinische Erscheinungsbild der RA beginnt häufig mit unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit, subfebrilen Temperaturen und Schweißneigung. Ergänzend klagen Patienten typischerweise über „Morgensteifigkeit“, die durch eine mindestanhaltende Steife v.a. in Fingern und Füßen von 30 Minuten charakterisiert ist und häufig im Laufe des Tages nachlässt (Arasteh et al. 2018). Des Weiteren werden Bewegungsschmerzen, Schwellungen und ein erschwerter Faustschluss beschrieben. Die Gelenkbeteiligung betrifft charakteristisch zunächst die kleinen Gelenke der Hände und Füße, vor allem im Bereich der Grundgelenke, weniger im Bereich der Mittelgelenke und in seltenen Fällen auch die Endgelenke. Häufig lässt sich ein symmetrisches Befallsmuster, vor allem an Finger- und Handgelenken, feststellen. Mit zunehmendem Krankheitsverlauf befällt die RA ebenfalls größere Gelenke wie Knie-, Sprung-, Hüft- oder auch Schultergelenk. Während des akuten Krankheitsschubes kommt es bei den betroffenen Gelenken zu den klassischen Entzündungszeichen Schwellung, Überwärmung, Rötung, Druckschmerzhaftigkeit und letztlich zur Einschränkung der Beweglichkeit. Durch die entzündlichen Prozesse kommt es unbehandelt häufig zu typischen Gelenkfehlstellungen wie der Schwanenhalsdeformität, Knopflochdeformität oder auch zu einer Ulnardeviation der Phalangen und zur Ausbildung von Krallen- und Hammerzehen. Weiterhin führt der eingeschränkte Gelenkgebrauch zu einer Schwächung und Atrophie der umgebenden Muskulatur (Arasteh et al. 2018).

Pathophysiologisch stellt sich die RA als eine komplexe, multifaktoriell bedingte Erkrankung dar, deren spezifische pathologische Vorgänge bis heute nur in Teilen

verstanden sind. Durch die Invasion von autoreaktiven Immunzellen kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Diese Botenstoffe, wie zum Beispiel Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) sowie Tumor Nekrose Faktor α (TNF-α), fördern die entzündlichen Prozesse und damit auch die Einwanderung weiterer Immunzellen wie Granulozyten und Makrophagen (Arasteh et al. 2018). Außerdem kann es durch eine Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten zur Synthese von Antikörpern kommen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Diese Autoantikörper lassen sich diagnostisch messen und erlauben eine genauere Charakterisierung der RA (McInnes und Schett 2011). Eine kurative Therapie der RA existiert bisher noch nicht, jedoch werden neben nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und Kortison vor allem „Disease-Modifying Antirheumatic Drugs“ (DMARD) mit dem Ziel den Krankheitsverlauf zu verlangsamen und progrediente Gelenkschäden zu verhindern, eingesetzt (Arasteh et al. 2018).

1.1.1 Gelenkaufbau

Grundsätzlich teilt man Gelenke in sogenannte „echte“ (Diarthrosen) und „unechte“ Gelenke (Synarthrosen) ein. Letztere weisen im Gegensatz zu Diarthrosen keinen Gelenkspalt auf und lassen sich eher als knorpelige oder bindegewebige Knochenverbindungen charakterisieren. Im Gegensatz dazu sind Diarthrosen durch das Vorhandensein eines mit Flüssigkeit gefüllten Gelenkspaltes definiert. Die an den Gelenkspalt angrenzenden knöchernen Skelettanteile sind mit Knorpel überzogen (Abbildung 1). Der Gelenkspalt ist zudem durch die Synovialmembran (Membrana Synovialis) begrenzt, welche einerseits aus einer Deckzellschicht (*lining layer*) besteht, die im gesunden Gelenk aus ca. ein bis drei Zellschichten gebildet wird und andererseits durch angrenzendes lockeres Bindegewebe (*sublining*), welches aus mehreren Zellschichten besteht, charakterisiert ist (Smith et al. 2003). Ergänzend wird der Gelenkkomplex durch die Capsula fibrosa umschlossen, die vor allem aus straffem faserigen Bindegebe besteht (Gelenkkapsel) (Arasteh et al. 2018).

Die Synovialflüssigkeit fungiert einerseits als Nährstoffmedium für das bradytrophe Knorpelgewebe und andererseits als eine Art „Schmiermittel“, welche eine möglichst reibungsfreie Gelenkbewegung ermöglicht (Arasteh et al. 2018). Die Synovialflüssigkeit wird von der Synovialmembran synthetisiert und sezerniert, aber auch resorbiert, wodurch die Flüssigkeit auch dem Transport von Abbauprodukten des

Knorpelgewebes dient. Die Synovialflüssigkeit beinhaltet zudem verschiede Proteine der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Hyaluronsäure und Lubricin, die vor allem von den Fibroblasten-ähnlichen Typ II-Synoviozyten im *lining layer* synthetisiert und freigesetzt werden (Turner und Filer 2015). Zudem lassen sich im *lining layer* Makrophagen-ähnliche Typ I-Synoviozyten finden, die vor allem der Phagozytose eingedrungener Fremdköper bzw. Fremdorganismen dienen (Arasteh et al. 2018).

1.1.2 Entzündliche Veränderungen im Rahmen der RA

Bei entzündlichen Erkrankungen des Gelenkes, wie beispielsweise der RA, kommt es einhergehend mit den klassischen klinischen Entzündungszeichen auch zu inflammatorischen Veränderungen innerhalb des Gelenkes und der beteiligten Strukturen (Arasteh et al. 2018). Durch die Entzündung kommt es bei der RA zu einer intraartikulären Infiltration von Makrophagen, Leukozyten sowie B- und T-Zellen, was sich in einer Hyperplasie des Synoviums widerspiegelt und mit dem histopathologischen Bild einer Synovitis vereinbar ist. Des Weiteren kommt es einerseits durch die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-α und andererseits durch die Freisetzung von „hypoxia-inducible factor“ (HIF)-1 und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) zu einer Hypervaskularisation und folglich zu einer verstärkten Infiltration weiterer Immunzellen. Neben der Zellinfiltration wird zudem die Proliferation von synovialen Fibroblasten (SF) stimuliert, die wiederum entzündliche Mediatoren, wie IL-6 oder Matrix-Metalloproteasen (MMP), aber auch katabole Enzyme wie Kollagenasen und Elastasen freisetzen können und somit an der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Zustands beteiligt sind (McInnes und Schett 2007). Im Rahmen der RA weisen die SF einen tumorähnlichen Phänotyp auf, der durch eine erhöhte Proliferationsrate, eine Apoptose-Resistenz sowie durch ein invasiv-wachsendes Proliferationsprofil gekennzeichnet ist (Turner und Filer 2015). Weiterhin verfügen SF über die Fähigkeit, hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie beispielsweise „monocyte chemoattractant protein“ (MCP-1), „macrophage colony stimulationg factor“ (M-CSF) oder auch „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“ (GM-CSF) freizusetzen, was wiederum zu einer verstärkten Mobilisation und Migration von Monozyten in die Synovialmembran führen kann (Darrieutort-Laffite et al. 2014). Schließlich kommt es zu einem pathologischen Umbau der Synovialmembran, unter Entstehung des infiltrativ

wachsenden Pannusgewebes bei gleichzeitigem Abbau von Knorpel- und Knochensubstanz (Arasteh et al. 2018), (Abbildung 1).

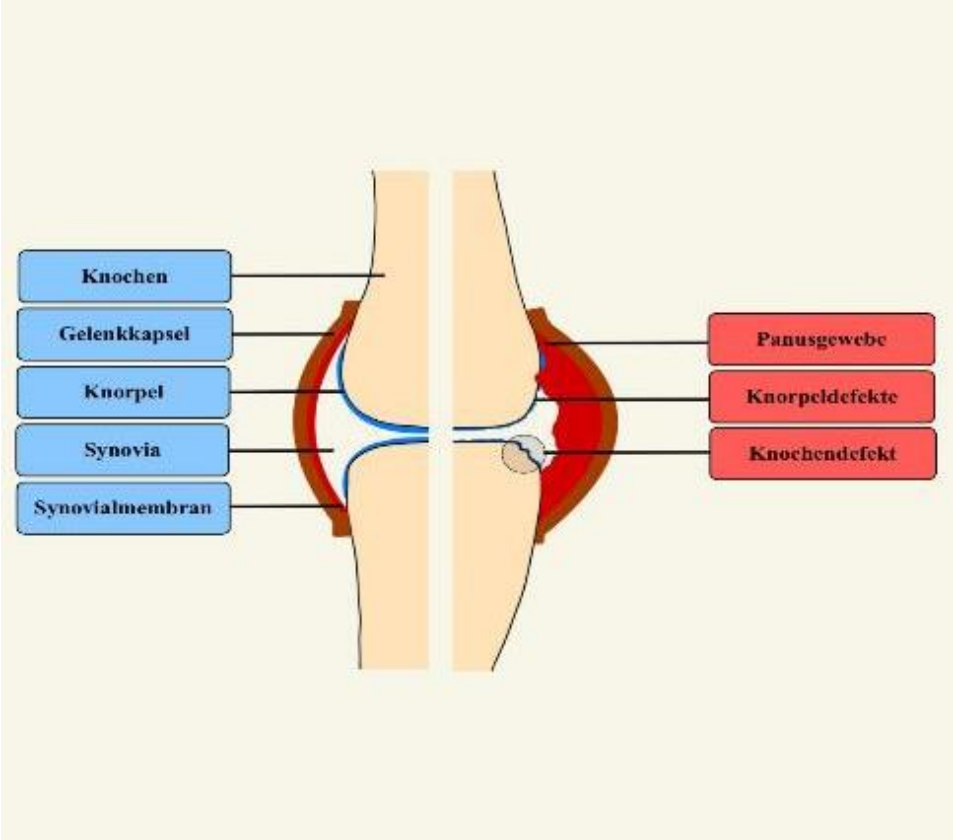

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines physiologischen Gelenkes (links) und eines entzündlich veränderten Gelenkes (rechts). Durch die inflammatorischen Prozesse kommt es zu einer Infiltration von Entzündungszellen in die Synovialmembran, die sich folglich hyperplastisch verändert. Einhergehend kommt es zu Destruktionen der Knorpel- und Knochensubstanz durch das infiltrativ wachsende Pannusgewebe. Quelle: Eigene Darstellung.

1.1.2 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Die Kollagen-induzierte Arthritis (*collagen induced arthritis*, CIA) ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle, um das Krankheitsbild der RA im Tiermodell darzustellen und somit sowohl pathogenetische als auch möglich therapeutische Ansätze zu untersuchen. Die Verwendung eines Tiermodells bietet im Vergleich zu humanen klinischen Studien vor allem hinsichtlich möglicher Störvariablen deutliche Vorteile. So konnten in diesem Experiment Nahrung, Haltung sowie die Krankheitsentstehung in einem kontrollierten Umfeld und zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Außerdem wurden zu den verschiedenen Todeszeitpunkten histologische

Gewebeproben aus den Gelenken entnommen, um neben serologischen Parametern, die vor allem in humanen Studien betrachtet werden, auch histopathologische Vorgänge näher untersuchen zu können. Ein Nachteil des Tiermodells ist allerdings die begrenzte Laufzeit im Vergleich zur humanen RA.

Für dieses Modell ist die Inzidenz der Arthritis innerhalb verschiedener Mäusestämme variabel, jedoch werden Mäuse der Gattung DBA/1 am häufigsten verwendet (Brand et al. 2007). Im Gegensatz zur humanen RA ist die Entzündungsreaktion der CIA auf ca. 60 Tage begrenzt, was sich unter anderem auf die induzierte Immunreaktion gegen Typ II Kollagen zurückführen lässt (Williams 1998), (Bessis et al. 2017).

Die Induktion der Arthritis erfolgt bei der CIA durch die Immunisierung der Tiere mit einer Emulsion aus Freud-Adjuvans, hitzeinaktiviertem *Mycobakterium tuberculosis* sowie Typ II Kollagen, bei der typischerweise nach ca. 21-28 Tagen erste Entzündungszeichen in den Gelenken der Extremitäten nachweisbar sind (Brand et al. 2007). Im pathophysiologischen Mittelpunkt der CIA steht die Antikörper vermittelte Immunreaktion gegen Kollagen Typ II, deren Ursprung vor allem Antikörper produzierende B-Zellen darstellen. Neben den B-Lymphozyten sind jedoch auch T-Zellen sowie verschiedene proinflammatorische Zytokine am Entzündungsprozess beteiligt (Myers et al. 1997). Durch die Entzündung kommt es zu einer Infiltration von Makrophagen, Leukozyten sowie B- und T-Zellen in das murine Gelenk, was sich in einer Hyperplasie des Synoviums widerspiegelt und mit dem histopathologischen Bild einer humanen Synovitis bei der RA vereinbar ist (Myers et al. 1997).

1.2 Übergewicht und Adipositas

Übergewicht lässt sich als eine Überschreitung des Körpergewichtes über das Normalmaß hinaus charakterisieren. Kommt es dabei zu einer starken Überschreitung des Normwertes, spricht man von Adipositas (Schienkiewitz et al. 2017). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft Adipositas als eigenständige Erkrankung ein und charakterisiert den Schweregrad anhand des Body Mass Index (BMI). Die Adipositas geht mit einem erhöhten Risiko für viele verschiedene Erkrankungen, wie beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 sowie Krebserkrankungen einher und ist in Entwicklungsländern und vor allem in Industriestaaten von zunehmender Bedeutung (World Health Organization 2000).

Ätiologisch ist Adipositas eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, der ein Ungleichgewicht von Energieaufnahme und Energieverbrauch zu Grunde liegt. So kommen neben den bekannten Störungen der Nahrungsaufnahme hinsichtlich Menge und Nährgehalt auch weitere Ursachen wie genetische Faktoren, körperliche Inaktivität, endokrine Erkrankungen, psychische Erkrankungen wie beispielsweise Essstörungen oder die Einnahme bestimmter Medikamente in Betracht (Berg et al. 2014). Pathophysiologisch kommt es durch das energetische Ungleichgewicht zu einer vermehrten Einlagerung von Lipiden und damit einhergehenden Zellhypertrophie sowie Zellhyperplasie der Adipozyten im Fettgewebe (Choe et al. 2016).

Die spezifische Rolle von Übergewicht im Kontext der RA wird aufgrund der heterogenen Studienlage weiterhin diskutiert (George und Baker 2016). So konnten einige Studien erhöhte BMI Werte als moderaten Risikofaktor der RA identifizieren (Ljung und Rantapää-Dahlqvist 2016), (Crowson et al. 2013). In einer Metaanalyse, in der Studien im Zeitraum von 1994 bis 2014 auf dem europäischen und nordamerikanischen Kontinent zusammengefasst und analysiert wurden, führte Übergewicht, trotz teilweise heterogener Daten, zu einer positiven Assoziation mit der RA (Qin et al. 2015). Zu beachten ist jedoch, dass in einigen epidemiologischen Studien mögliche Risikofaktoren der RA wie beispielweise Rauchen (Hair et al. 2012) oder aber auch sozioökonomische Unterschiede nicht berücksichtigt wurden (Turesson et al. 2016). Außerdem konnte man bei Patienten mit neu diagnostizierter RA und einem BMI von über 25kg/m^2, eine verminderte Wahrscheinlichkeit einer niedrigeren Krankheitsaktivität sowie eine reduzierte Remissionsrate beobachten (Sandberg et al. 2014).

Im Gegensatz dazu gibt es Daten, die ein reduziertes Erkrankungsrisiko bei Männern mit erhöhten BMI Werten aufzeigen (Turesson et al. 2016). Des Weiteren scheint Adipositas, vor allem in frühen Erkrankungsstadien, mit einer verminderten Gelenkdestruktivität bei RA Patienten einherzugehen (Kaufmann et al. 2003), (van der Helm-van Mil et al. 2008). Ergänzend beeinflusst die Adipositas auch medikamentöse Therapien der RA. So kann bei adipösen Frauen, die Effektivität von TNF-Inhibitoren oder auch des IL-6-Rezeptor-Antagonisten Tocilizumab eingeschränkt sein (Schäfer et al. 2020).

Adipositas induziert zudem nach neueren Erkenntnissen die Synthese von inflammatorischen Zytokinen, welche die Infiltration von Immunzellen in das Fettgewebe stimulieren und letztlich einen milden chronischen Entzündungszustand

(*chronic low-grade inflammation*) verursachen (Russolillo et al. 2013), (Cao 2014). Die invadierten Immunzellen produzieren wiederum inflammatorische Zytokine, die den Entzündungszustand weiter aufrechterhalten und fördern (Cao 2014). Es kommt dadurch zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren, zugunsten proinflammatorischer Prozesse (Jung und Choi 2014). Hierbei scheinen vor allem invadierende Makrophagen eine entscheidende Rolle zu spielen, die das Zytokin-Ungleichgewicht begünstigen (Jung und Choi 2014). Histologisch betrachtet, bilden die invadierenden Makrophagen sogenannte „crown-like-structures“ (CLS), da sie sich kronenförmig um abgestorbene Adipozyten legen, um diese zu phagozytieren (Martinez-Santibañez et al. 2014). Die Anwesenheit und Anzahl der CLS lässt folglich auf das Vorhandensein und das Ausmaß entzündlicher Prozesse im Fettgewebe schließen (Wang et al. 2019). Die chronische Inflammation kann nicht nur die Entstehung von metabolischen Stoffwechselstörungen wie beispielweise der Insulinresistenz fördern (Versini et al. 2014) sondern auch die Krankheitsintensität- und Aktivität der RA beeinflussen (Schäfer et al. 2020).

1.3 Fettgewebe

Das weiße Fettgewebe setzt sich vor allem aus den Adipozyten zusammen, deren Funktion die Speicherung und Spaltung von Triglyceriden darstellt. Neben den Adipozyten lassen sich weitere Zelltypen wie Prä-Adipozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, T-Zellen und andere Immunzellen identifizieren (Lafontan und Girard 2008). Das Fettgewebe wird in aktueller Literatur nicht mehr als einheitliches und gleichförmiges Gewebe angesehen, da es sich hinsichtlich metabolischer Funktionen, Morphologie und Zelltypen lokalisationsabhängig unterscheiden kann. Beispielsweise lässt es sich unter anderem in subkutanes und viszerales Fettgewebe einteilen. Letzteres scheint im Vergleich zu subkutanem Fettgewebe eine höhere metabolische Aktivität zu besitzen (Coelho et al. 2013).

Das braune Fettgewebe findet sich vor allem bei Neugeboren und ist bei Erwachsenen Menschen nur noch in geringem Ausmaß vorhanden. Bei Neugeboren dient es vor allem der Thermogenese (Coelho et al. 2013).

Weißes Fettgewebe ist vor allem durch dessen Funktion bei der Lipogenese und Lipolyse sowie als Speicherorgan und wichtiger Regulator des Energiestoffwechsels des menschlichen Organismus bekannt (Proença et al. 2014). Neuere Forschungen konnten

jedoch zeigen, dass die Funktionen des Gewebes über die bekannten Speicherfunktionen hinausgehen. So wird das weiße Fettgewebe heute viel mehr als endokrines Organ angesehen, da es durch die Produktion und Sekretion von verschiedenen bioaktiven Substanzen wie Hormonen und Zytokinen auf unterschiedliche Prozesse, wie beispielsweise Immunabwehr, Gerinnung, Angiogenese oder auch in der Appetit-Regulation, Einfluss nehmen kann. Zu diesen sezernierten Substanzen zählen einerseits bestimmte hormonähnliche Stoffe, die Adipokine wie Leptin, Adiponektin, Visfatin und andererseits verschiedene Zytokine wie IL-6 und TNF-α (Proença et al. 2014). Die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α sind außerdem in der Pathogenese der RA involviert (Stavropoulos-Kalinoglou et al. 2011). Auch Substanzen, wie Angiotensin, welches für die Blutdruckregulation des Organismus eine bedeutende Rolle spielt, können im weißen Fettgewebe synthetisiert und freigesetzt werden (Coelho et al. 2013).

1.4 Adipokine und Adipozytokine

Als Adipozytokine werden sämtliche bioaktiven Substanzen zusammengefasst, welche vom Fettgewebe synthetisiert und freigesetzt werden. Hierzu zählen neben den klassischen Adipokinen wie Leptin, Adiponektin und Visfatin auch Zytokine wie TNF-α oder IL-6. Adipokine werden in Bezug auf ihre Wirkung als hormonähnliche Substanzen bezeichnet, die vor allem vom Fettgewebe synthetisiert und sezerniert werden und dabei auf verschiedene metabolische Prozesse wie beispielsweise den Lipidstoffwechsel, Appetit und Hungergefühl, Insulinsensitivität regulatorisch sowie immunmodulatorisch wirken können (Proença et al. 2014). In den vergangenen Dekaden wurden seit der Entdeckung von Leptin im Jahre 1994 eine Vielzahl weiterer Adipokine wie z.B. Adiponektin und Visfatin untersucht, die als Botenstoffe bzw. Mediatoren zwischen dem Fettgewebe und anderen Organen wie Leber, Pankreas, Muskelgewebe sowie dem Nervensystem fungieren (Zhang et al. 1994), (Proença et al. 2014). Folglich liegt es nahe, dass Störungen dieser Botenstoffe einen Beitrag in der Pathogenese verschiedener metabolischer und entzündlicher Erkrankungen leisten können (Cao 2014). So werden auch im Rahmen der RA Adipokine als mögliche Stellschrauben inflammatorischer Prozesse und gleichzeitig als mögliche Ansatzpunkte neuer Therapien diskutiert. Problematisch ist jedoch, dass die Adipokine teilweise unterschiedliche und teilweise in unterschiedlichen Organen sogar gegensätzliche

Wirkungen innehaben (Orlando et al. 2019), (Tang et al. 2007). Um diese Funktionen näher beleuchten zu können, wurden in diesem Projekt das Vorkommen und mögliche Zusammenhänge der Adipokine Leptin, Visfatin und Adiponektin mit dem Entzündungsgeschehen, im systemischen und gelenknahen Umfeld näher untersucht.

1.4.1 Leptin

Leptin wurde 1994 entdeckt und zählt heute zu den bekanntesten Vertretern der Adipokine (Zhang et al. 1994), (Carrión et al. 2019). Das 16 kDa schwere Protein wird durch das *LEP* (*ob)* Gen kodiert und von Adipozyten des weißen Fettgewebes synthetisiert und sezerniert (Carrión et al. 2019). Neben Adipozyten wird Leptin im Gelenk durch Chrondrozyten, Synoviozyten und Immunzellen exprimiert (Abella et al. 2017). Die Synthese und Sekretion von Leptin wird vor allem durch die Nahrungsaufnahme und den damit verbundenen Hormonen, aber auch durch den Energiezustand des Körpers, Sexualhormone und Entzündungsfaktoren reguliert (Abella et al. 2017). Beispielsweise kann es durch Testosteron zu einer Reduktion und durch Östrogen zu einer Induktion der Leptin Synthese kommen (Di Carlo et al. 2002). Außerdem korreliert Leptin positiv mit der Körperfettmasse und dem BMI (Fried et al. 2000). Auch im Rahmen von akuten Infektionen kann es durch proinflammatorische Zytokine zu einer vermehrten Synthese von Leptin kommen (Behnes et al. 2012).
Bisher wurden verschiedene Formen des Leptin Rezeptors nachgewiesen. Die Leptin Wirkung scheint vor allem durch die lange Isoform des Rezeptors *LERP* zu erfolgen, der zu den Klasse 1 Zytokin-Rezeptoren gezählt wird. Die lange Isoform des Rezeptors wird primär im Gehirn, vor allem in Hypothalamus, aber auch beispielsweise in Fettgewebe, Plazenta, Leber, Lunge, Chondrozyten, Skelettmuskelzellen und in beta-Zellen des Pankreas exprimiert (Tartaglia 1997), (Proença et al. 2014), (Abella et al. 2017).
Das Hormon verfügt über regulatorische Funktionen bei der Nahrungsaufnahme, indem es im Hypothalamus durch die Induktion von appetithemmenden Substanzen und die Reduktion von appetitfördernden Substanzen, die Ingestion verringern kann. Des Weiteren nimmt das Hormon auf die Insulin Sekretion, Thermogenese, Reproduktion, Angiogenese und immunologische Prozesse Einfluss (Francisco et al. 2018). Insbesondere bei hohen Plasma Konzentrationen wird ein Zusammenhang von Leptin

mit der Insulinresistenz diskutiert, sodass es unter anderem zu einer verminderten Sekretion von Insulin aus den beta-Zellen des Pankreas kommt (Proença et al. 2014).
Weiterhin besitzt Leptin sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem modulierende Fähigkeiten, indem es einerseits die Proliferation und Aktivität von Makrophagen induzieren und andererseits die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen regulieren kann. Durch die Aktivierung der naiven T-Zell und B-Zell Proliferation sowie der Modulation von T-regulatorischen Zellen, besitzt Leptin ebenfalls im erworbenen Immunsystem regulatorische Eigenschaften (Abella et al. 2017). Leptin kann zudem die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF-α in Monozyten fördern (Del Prete et al. 2014).
In Tiermodellen konnte bei Leptin defizienten Mäusen gezeigt werden, dass der Schweregrad der Arthritis, sowie die IL-1β und TNF-α Konzentrationen im Synovium des Kniegelenks im Vergleich zu den Kontrollgruppen vermindert waren (Busso et al. 2002). *Deng et al.* konnten durch die Injektion von Leptin in Kniegelenke von Kollagen immunisierten Mäusen eine Verschlechterung der Arthritis unter Zunahme der Gelenkdestruktion und synovialer Zellhyperplasie beobachten (Deng et al. 2012).
Die spezifische Rolle von Leptin im Kontext der RA wird in der Literatur weiterhin diskutiert (Tian et al. 2014). Einige Studien konnten zeigen, dass Patienten mit RA erhöhte Leptin-Spiegel aufwiesen und die erhöhten Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung zusammenhingen (Yoshino et al. 2011b), (Lee et al. 2007). In anderen Studien wurden jedoch auch antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben (Palmer und Gabay 2003). Trotz dieser nicht eindeutigen Studienlage wird Leptin zu den pro-inflammatorisch wirkenden Adipokinen gezählt, welches auch bei adipösen Menschen an der Aufrechterhaltung eines chronischen Entzündungsprozesses beteiligt ist (Carrión et al. 2019).

1.4.2 Visfatin

Das Adipokin Visfatin, auch unter dem Namen „pre-B-cell colony-enhancing factor 1“ (PBEF1) oder „nicotinamide phosphoribosyltransferase“ (Nampt) bekannt, spielt vor allem bei der Synthese des zellulären Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) eine wichtige Rolle und ist weiterhin an der Regulation von zellulärem Wachstum, Angiogenese und Apoptose in Mamma-Zellen beteiligt (M^{ac}Donald et al. 2019). Visfatin wird vor allem von weißem Fettgewebe, aber auch in der Leber, Knochenmark,

Muskelgewebe und Synovialzellen wie beispielsweise Fibroblasten oder von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert (Neumann et al. 2016). Die Freisetzung von Visfatin wird durch verschiedene proinflammatorischen Faktoren, wie TNF-α, IL-1β, IL-6, LPS sowie Chemokine und Hypoxie, aber auch durch sich selbst, gefördert (Neumann et al. 2011), (Segawa et al. 2006).

Einige Studien konnten Visfatin als proinflammatorischen Faktor im Kontext von entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise der RA identifizieren, indem es unter anderem die Produktion von IL-1β, TNF-α und IL-6 in humanen Makrophagen induzieren kann (Brentano et al. 2007), (Moschen et al. 2007). Des Weiteren kann Visfatin die Funktion des „Insulin-like growth factor 1“ (IGF-1), welcher durch die IGF-1 stimulierte Produktion von Proteoglykanen und Kollagen Typ II an der Synthese und Reparatur der extrazellulären Matrix beteiligt ist, unabhängig vom IGF-1 Rezeptor inhibieren (Yammani und Loeser 2012). Weiterhin konnten bei Patienten mit RA höhere Visfatin-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne RA nachgewiesen werden (Lee und Bae 2018). Gleichermaßen zeigten sich bei Patienten mit Übergewicht und Diabetes Mellitus Typ 2 erhöhte Plasma Konzentrationen von Visfatin (Chang et al. 2011).

Auch in Tiermodellen konnte man Visfatin als proentzündlichen Faktor identifizieren. So konnten erhöhte Visfatin-Spiegel bei erkrankten Tieren in einem murinen CIA Modell festgestellt werden (Busso et al. 2008). Außerdem wurde in einem CIA Tiermodell bei Visfatin defizienten Mäusen eine verminderte Entzündungsaktivität mit verminderter Knochendestruktion und reduzierter Krankheitsprogredienz beobachtet (Li et al. 2019). Durch die Inhibition der Nampt Aktivität von Visfatin in einem murinen CIA Modell konnte ein reduzierter Schweregrad der Arthritis zusammen mit einer verminderten Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden (Busso et al. 2008).

1.4.3 Adiponektin

Adiponektin, auch bekannt als „Acrp 30“ (Scherer et al. 1995), „AdipoQ“ (Hu et al. 1996), „GBP28“ (Nakano et al. 1996) und „apM1“ (Maeda et al. 2012), liegt in verschiedenen Isoformen vor und zählt aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen und möglichen therapeutischen Verwendung zu den bekanntesten Adipokinen (Neumann et al. 2011), (M^{ac}Donald et al. 2019). Über die Rezeptoren „AdipoR1“ und „AdipoR2“

sowie über weitere Proteine wie dem T-Cadherin beeinflusst das Molekül Insulinsensitivität, entzündliche Prozesse, Angiogenese sowie den Glucose- und Lipidstoffwechsel (Ye und Scherer 2013), (M^{ac}Donald et al. 2019). In der Literatur werden vor allem antiinflammatorische Effekte des Zytokins in Bezug auf atherosklerotische Prozesse, im Rahmen des metabolischen Syndroms sowie bei Typ 2 Diabetes beschrieben (Scherer et al. 1995), (Neumann et al. 2011), (Carrión et al. 2019), (Orlando et al. 2019). So kann Adiponektin einerseits die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und IL-6 reduzieren und gleichzeitig die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 in humanen Makrophagen fördern (Folco et al. 2009). Niedrige Adiponektin-Spiegel sind mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Insulinresistenz (Hotta et al. 2000), (Balsan et al. 2015) und dem metabolischen Syndrom (Trujillo und Scherer 2005) assoziiert und scheinen das Erkrankungsrisiko für diese zu erhöhen (Orlando et al. 2019). Zudem zeigen verschiedene Studien, dass sich die Serumkonzentration des Adiponektins sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen antiproportional zu dem entsprechenden BMI bzw. Körpergewicht verhält (Trujillo und Scherer 2005), (Hu et al. 1996).

Andererseits sind hinsichtlich arthritischer Gelenkveränderungen auch pro-inflammatorische Wirkungen bekannt. Beispielsweise kann Adiponektin die IL-6 Produktion in humanen synovialen Fibroblasten induzieren (Tang et al. 2007). Neben humanen synovialen Fibroblasten beeinflusst Adiponektin zudem die Genexpression und Proteinbiosynthese von Lymphozyten, Endothelzellen und Chrondrozyten, was unter anderem eine verstärkte Synthese von proinflammatorischen Substanzen wie Prostaglandin E2, IL-6, IL-8, MMP-1 zur Folge hat (Frommer et al. 2010). Zudem weisen Patienten mit RA höhere Adiponektin-Serumspiegel im Vergleich zu Patienten ohne RA auf. Diese korrelieren mit dem Ausmaß des radiologischen Gelenkschadens (Otero et al. 2006), (Del Prete et al. 2014).

Die bisher bekannten heterogenen Wirkungen des Adiponektins lassen sich möglicherweise auf das Vorhandensein verschiedener Isoformen zurückführen, die in ihrer Gesamtheit jedoch noch nicht in allen Details untersucht wurden (Garaulet et al. 2007).

1.5 Fragestellungen

Die Pathogenese der RA ist bis heute sehr komplex und weitgehend ungeklärt, jedoch scheinen verschiedenste hormonelle, aber auch metabolische Faktoren einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung zu nehmen. Um metabolisch induzierte Veränderungen und deren Relevanz für die RA besser verstehen zu können, sollte in diesem wissenschaftlichen Ansatz durch die Induktion einer Adipositas im murinen Tiermodell zu verschiedenen Zeitpunkten der Pathogenese die Krankheitsintensität untersucht und verglichen werden. Ziel dieser Arbeit war es, anhand von zur Verfügung gestellten serologischen Daten sowie histologischen Bildern, spezifische Scores zur Charakterisierung und Einteilung der in einem CIA-Modell induzierten Arthritis zu erarbeiten, um einerseits mögliche Adipositas-induzierte Veränderungen auf die Intensität und Progredienz der Arthritis zu untersuchen. Andererseits sollte zudem durch die Analyse von immunhistochemischen Gelenkschnittbildern der Einfluss von Adipokinen wie Leptin, Visfatin und Adiponektin auf lokale entzündliche und metabolische Prozesse der murinen Arthritis untersucht werden und dabei mögliche Unterschiede zwischen systemischen und lokalen sowie gelenknahen, Wirkungen erarbeitet werden. Hierbei sollten die verschiedenen Adipokine auch untereinander verglichen werden, um zu sehen, inwieweit sich diese im lokalen oder im systemischen Kontext zueinander verhalten. Außerdem sollten durch die Erstellung von Korrelationsanalysen mögliche Zusammenhänge zwischen Diät- sowie Adipokin-induzierten Effekten auf die Arthritis und die hiermit zusammenhängenden metabolischen Veränderungen herausgearbeitet werden.

2. Material und Methoden

Die primären molekularbiologischen und histologischen Analysen zur Verwertung der entnommenen Gewebe- und Plasmaproben erfolgten durch Mitarbeiter des Forschungslabors der Abteilung Rheumatologie und klinischen Immunologie und nicht durch den Autor selbst. Das für die primäre Analyse benötigte Material sowie die entsprechenden Methoden sind in Kapitel 2.1 sowie 2.2 aufgeführt.

Durch den Autor dieser Dissertation erfolgte die Auswertung der serologischen Parameter, die Entwicklung von histologischen Scores anhand der zur Verfügung gestellten Bilder sowie deren Auswertung und sind in Kapitel 2.3 ausgeführt.

2.1 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 6x10ml
- Isofluran CP®, CP-Pharma, Handelsgesellschaft GmbH, Deutschland
- Formaldehyd 37%, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Hühnerserum, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Kat. Nr.: C5405
- Kaisers Glyceringelatine, Merck (Darmstadt, Duetschland)
- 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)

- Wasserstoffperoxid 30 % (H_2O_2), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Xylol (Isomere) >98%, rein, für die Histologie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Antikörper

- N-Histofine® Simple Stain MAX PO (G) anti-goat, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414162F, Lot: 1705
- N-Histofine® Simple Stain MAX PO (G) anti-rabbit, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414341F; Lot: H1702
- N-Histofine® Simple Stain MAX PO (G) anti-rat, Medac (Wedel, Deutschland), Kat. Nr.: 414311F, Lot: H1709
- Mouse Adiponectin/Acrp30 Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Goat IgG; Katalog Nummer: AF1119, Lot: GQD0316081, R&D Systems (Minneapolis, USA)
- normal goat IgG; Kat. Nr.: AB-108-C, Lot: ES3411101 R&D Systems, (Minneapolis, USA)
- PBEF antibody (H-300), Santa Cruz Biotechnology, INC. (Dallas, Texas, USA) Kat. Nr.: sc-67020, Lot: H1412
- Negative Control, Rabbit Immunoglobulin Fraction, Dako (Santa Clara, USA), Kat. Nr.: X0936, Lot: 0089630
- Anti-Leptin antibody, Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich), Kat. Nr.: ab3583, Lot: GR17101-5/-8
- RAT ANTI MOUSE F4/80 (Cl:A3-1), purified Monoclonal Antibody Abdserotec (Oxford, Vereinigtes Königreich), Kat. Nr.: MCA497R, Lot.: 397017
- Rat IgG2b, kappa monoclonal [RTK4530] - Isotype control, Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich), Kat. Nr.: ab18541; Lot: GR261813-1
- Vimentin antibody, R&D Systems (Minneapolis, USA), Kat. Nr.: MAB2105, Lot: UUQ0212051
- Purified Rat IgG2a κ Isotype Control, BD Pharmingen (San Diego, USA); Kat. Nr.: 559073, Lot: 34872
- CD45 Antibody (30-F11), Novusbio (Centennial, USA), Kat. Nr.: NB100-77417SS, Lot: B-4

- Rat IgG2b negative control antibody, Abdserotec (Oxford, Vereinigtes Königreich), Kat. Nr.: MCA1125, Lot: 101202

Kits

- AEC Peroxidase Substrate Kit; Kat. Nr. VL-SK-4-200-Ki01; Lot: ZD0802
- Visfatin (NAMPT) Mouse/Rat ELISA; BioVendor; Kat. Nr. RAG009R; Lot 1. ELISA Kits: X15-113; Lot 2. ELISA Kits: X16-150
- Quantikine ELISA Mouse Adiponectin/Acrp30; R&D; Kat. Nr.: MRP300; MHD: 04.01.2016
- Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin; R&D; Kat. Nr.: MOB00

Puffer und Lösungen

- Citrat puffer (10mM Citrat, 0,05% Tween20, pH6)
- PBS 10x (8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na2HPO4*2H2O; 0,24g KH2PO4; mit NaOH und HCl pH7,4; mit dH2O auf 100ml auffüllen)
- PBST (1l 1x PBS; 1ml Tween-20)
- Proteinase K: 2,5µl Proteinase K Stock 20mg/ml + 250µl 1M Tris (pH8) + 50µl 0,5M NaEDTA (pH8)
- Hämalaun:
    - 1g Hämatoxylin (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
    - 1L H_2O
    - 0,2g Natriumjodat $NaJO_3$ (Sodium iodate, Minimum 99%, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
    - 50g Kalilaun (Kaliumaluminiumsulfat)
      (Aluminium potassium sulfate dodecahydrate, Minimum 98,0%, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA))
    - 50g Chloralhydrat, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
    - 1g Citric acid monohydrate, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Eosin:
    - 10g Eosin G (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
    - 1l H_2O
    - vor Gebrauch einige Tropfen 96%ige Essigsäure in die Küvette geben
- NaEDTA-Lösung (20%):

- 100g EDTA-Dinatriumsalz
- 400ml Millipore
- mit NaOH-Plätzchen pH7,4 (rühren + erhitzen)
- mit Millipore Wasser auf 500ml auffüllen

- Weigert'sche Lösung
  - Lösung A:
  - 1g Hämatoxylin (für die Mikroskopie, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland))
  - 100ml 95% Ethanol
  - Lösung B:
  - 4ml 29% Eisen-III-chlorid-Hexahydrate (Roth) in H2O
  - 95ml dH2O
  - 1ml 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 20x20mm, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Deckgläser 25x50mm, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Einbettkassetten, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Eppendorf Safe lock tubes 1,5ml, Neolab (Heidelberg, Deutschland)
- Eppendorf Safe lock tubes 2ml, Neolab (Heidelberg, Deutschland)
- Färbegestell, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Färbekasten mit Deckel, Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Objektträger Superfrost plus 25x75mm, Langenbrinck
- Pap Pen Immunostaining Pen, G. Kisker (Steinfurt, Deutschland)
- PP-Röhrchen steril 50ml, Greiner (Kremsmünster, Deutschland)
- PP-Röhrchen steril 15ml, Greiner (Kremsmünster, Deutschland)
- Roti®-Plast (Paraffin Pastillen), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Stripette 5ml, Corning (Corning, USA)
- Stripette 10ml, Corning (Corning, USA)
- Stripette 25ml, 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 Version 9.0
- Microsoft Office Professional Plus 2019
- ImageJ Wayne Rasband, Version 1.32

2.2 Methoden

Die primären molekularbiologischen und histologischen Analysen zur Verwertung der entnommenen Gewebe- und Plasmaproben erfolgten durch Mitarbeiter des Forschungslabors der Abteilung Rheumatologie und klinischen Immunologie. Die Auswertungen der serologischen Parameter, die Entwicklung der histologischen Scores anhand der zur Verfügung gestellten Bilder sowie deren Auswertung erfolgten durch den Autor dieser Dissertation und sind in Kapitel 2.3 ausgeführt.

2.2.1 CIA-Modell (Firma ATRC Aurigon)

Der Versuch wurde durch die Firma ATRC Aurigon Toxicological Research Center Ltd (Ungarn) durchgeführt. Die entnommenen Gewebe wurden nach Abschluss des Versuchs versendet. Die Abläufe zum Versuch und Versuchsaufbau sind im Folgenden beschrieben, wurden jedoch nicht durch den Autor dieser Dissertation durchgeführt.

2.2.2 Mäuse

Es wurden ausschließlich männliche DBA/1JRj Mäuse im Alter von 3-4 Wochen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns verwendet. Die Tiere wurden durch die Firma ATRC Aurigon Toxicological Research Center Ltd in Ungarn bezogen und im Tierstall für den weiteren Versuch gehalten.

Futter:

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

2.2.3 Versuchsgruppen des CIA-Modells

Zu Beginn des Versuches wurden die Versuchstiere in 12 unterschiedliche Gruppen hinsichtlich Ernährungsart (HFD oder ND), Arthritis-Induktion (CIA oder gesunde Kontrolle) und Nekropsie Zeitpunkt (4, 5,5 oder 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung) eingeteilt (Abbildung 3). Die Gruppeneinteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht Versuchsgruppen der DBA/1JRj Tiere, Gesamtanzahl der Tiere n = 87. Von insgesamt 87 Tieren erhielten 63 eine Arthritis-Induktion (CIA Induktion). Der Zeitraum beschreibt die Zeit zwischen erster Immunisierung und Nekropsie.

Gruppe	Zeitraum in Wochen	Futter	Arthritis-Induktion	Tieranzahl 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

2.2.4 Induktion der Adipositas im CIA-Modell

Zunächst wurden sämtliche Tiere 6 Wochen lang mit zwei unterschiedlichen Diäten gefüttert, um die metabolischen Veränderungen von Übergewicht bzw. Adipositas vor der eigentlichen CIA-Induktion zu etablieren. Die Adipositas-Induktion erfolgte durch die Gabe einer hochkalorischen Diät („high-fat diet“, HFD), mit einem Fettgehalt von 58%. Die auf den Ernährungszustand bezogene Kontrollgruppe erhielt über den gleichen Zeitraum eine normalkalorische Diät („normal diet“, ND vom gleichen Hersteller), die einen Fettgehalt von 10,5% beinhaltete. Beide Diäten wurden nach der Arthritis-Induktion (definiert als Tag 0) fortgeführt.

2.2.5 CIA-Induktion

Die Arthritis-Induktion erfolgte nach 6 Wochen Vorfütterung mit entsprechender HFD oder ND durch die Firma Aurigon. Die Tiere wurden zunächst durch die Inhalation von Isofluran anästhesiert. Im Anschluss erfolgte die Immunisierung mit 100 µL einer Emulsion aus bovinem Kollagen Typ II, hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* sowie kompletten Freud-Adjuvans (CFA) in die Schwanzwurzel der Tiere.

Zur Herstellung der Emulsion wurde Kollagen in 0,1 molarer Essigsäure mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml verdünnt. Im Verhältnis 1:1 wurde zu der Lösung CFA hinzugegeben. Die Lösung wurde für 3 min gemischt, so dass eine homogene Flüssigkeit entstand. Die Endkonzentrationen betrugen 1mg/ml Kollagen und 2 mg/ml inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis*. Der Tag der ersten Immunisierung wurde als Tag 0 definiert. Die zweite Immunisierung erfolgte an Tag 21 (Abbildung 3).

Zum Todeszeitpunkt der Tiere wurden durch die Firma Aurigon die Knie der Hinterbeine, sowie inguinale Lymphknoten, Leber und viszerales Fettgewebe entnommen und gegebenenfalls entkalkt, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Außerdem wurden Plasmaproben entnommen und bei Temperaturen unterhalb von -70 °C auf Trockeneis gelagert. Die Gewebe- und Plasmaproben wurden schließlich an das Forschungslabor in Bad Nauheim versandt. Im Folgenden wird der Begriff der „Arthritis-Induktion“ immer in Bezug auf die CIA verwendet. Die Tiere der CIA-Gruppe werden zudem als „erkrankte Tiere“ bezeichnet.

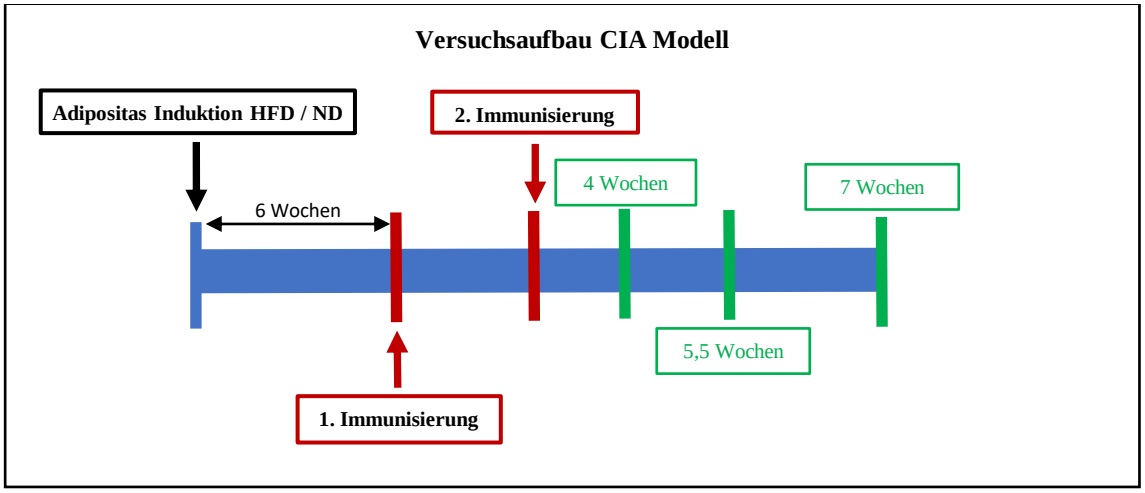

Abbildung 2: Zeitliche Darstellung des CIA Modells. Zunächst erfolgte die Induktion der Adipositas durch die Gabe eine HFD. Der Tag der 1. Immunisierung wurde als Tag 0 definiert, die zweite Immunisierung erfolgte am Tag 21. Abhängig von der zugehörigen Gruppe erfolgte, entweder 4, 5,5 oder 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung, die Nekropsie der Tiere. Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.6 ELISA

Um die Plasma Konzentrationen der Adipokine Leptin, Visfatin und Adiponektin aber auch von CRP (C-reaktives Protein) messen zu können, wurden ELISAs durchgeführt. Bei den verwendeten Kits wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben verfahren und gegebenenfalls die Proben im empfohlenen Puffer verdünnt.

2.2.7 Histologische Färbungen

HE – Färbung	**Safranin-O Färbung**	**Toluidinblau Färbung**

- 2x 10 min Xylol
- je 10 min 100%, 96% EtOH
- je 5 min 80%, 70%, 50% EtOH
- 5 min PBS
- 7-10 min Hämalaun
- in H_2O waschen
- 7-10 min Eosin
- in H_2O waschen
- je 5 min 50%, 70%, 96%, 100% EtOH
- 3x 5 min Xylol
- eindeckeln mit Entellan
	- Entparaffinieren:
	  ○ 2x 10 min Xylol
	  ○ je 10 min 100%, 96% EtOH
	  ○ je 5 min 80%, 70%, 50% EtOH
	  ○ 5 min H_2O
	- 5 min Weigert'sche Lösung
	- 3x 5 min H_2O
	- 5 min 0,001% Fast-Green
	- 15 s 1% Essigsäure
	- 9 min 0,5% Safranin-O
	- je 2x2 min 96%, 100% Ethanol
	- 5 min abdampfen/lufttrocknen
	- eindeckeln mit Entellan
		- Entparaffinieren:
		  ○ 2x 5 min Xylol
		  ○ je 5 min 100%, 96%, 80%, 70%, 50% EtOH
		  ○ 5 min H_2O
		- ca. 20 Sek. 0,5% Toluidinblau in dH_2O
		- 3x in H_2O je ca. 10 mal kurz eintauchen
		- kurz in 96% EtOh ca. 2 mal eintauchen
		- 2x 10 Sek. in Xylol
		- eindeckeln mit Entellan

2.2.8 Immunhistologische Färbungen

Leptin-Färbung von Paraffinschnitten

	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Referenz/Katalognr.
Antikörper	Leptin (Maus)	2mg/ml	1:285	ab3583
Isotypkontrolle	Kaninchen IgG	15g/l	1:30	X0936

Leptin-Färbung Protokoll:

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

Visfatin-Färbung von Paraffinschnitten

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

Visfatin-Färbung Protokoll:

- Entparaffinieren:
  - 2 x 5 min Xylol
  - je 5 min 100%, 96%, 70% Ethanol
  - 2x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
  - Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Wasserbad)
  - Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
  - Bei Raumtemperatur 30 min abkühlen lassen
  - 2 x 2 min dH_2O_2
  - 5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
  - 10 min Methanol + 3% H_2O_2
  - 2x 5 min PBS
- Blockieren unspezifischer Antikörperbindungen:
  - 60 min 5% BSA
- Antikörper bzw. Isotypenkontrolle über Nacht in 5% BSA bei 4 °C
- 2x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rabbit
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindecken mit Glyceringelatine

Adiponektin-Färbung von Paraffinschnitten

	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Referenz/Katalognr.
Antikörper	Adiponektin (Maus)	0,2mg/ml	1:100	AF1119
Isotypkontrolle	Kaninchen IgG	1mg/ml	1:500	AB-108-C

Adiponektin-Färbung Protokoll:

- Entparaffinieren:
  - 2 x 5 min Xylol
  - je 5 min 100%, 96%, 70% Ethanol
  - 2x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
  - Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Wasserbad)
  - Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
  - Bei Raumtemperatur 30 min abkühlen lassen
  - 2 x 2 min dH_2O_2
  - 5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
  - 8 min Methanol + 3% H_2O_2
  - 5 min dH_2O_2
  - 5 min PBS
- Blockiern unspezifischer Antikörperbindungen:
  - 45 min 5% BSA
- Antikörper bzw. Isotypenkontrolle über Nacht in 1% BSA bei 4 °C
- 1 x 5 min PBS
- 30 min Histofine anti-goat
- 2 x 3 min PBS + 0,3% Triton-X100
- 1 x 5 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindecken mit Glyceringelatine

Vimentin-Färbung von Paraffinschnitten

	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Referenz/Katalognr.
Antikörper	Vimentin (Maus)	0,5mg/ml	1:100	MAB2105
Isotypkontrolle	Ratte IgG2a	0,5mg/ml	1:100	559073

Vimentin-Färbung Protokoll:

- Entparaffinieren:
  - 2 x 5 min Xylol
  - je 5 min 100%, 96%, 70% Ethanol
  - 2x 3 min PBS
- Demaskieren der Epitope:
  - Citrat-Puffer kurz aufkochen lassen (Wasserbad)
  - Schnitte in den Citrat-Puffer überführen und 60 min bei 60 °C
  - Bei Raumtemperatur 30 min abkühlen lassen
  - 2 x 2 min dH_2O_2
  - 5 min PBS
- Blockieren endogener Peroxidasen:
  - 10 min Methanol + 3% H_2O_2
  - 2x 5 min PBS
- Blockiern unspezifischer Antikörperbindungen:
  - 60 min 5% BSA
- Antikörper bzw. Isotypenkontrolle über Nacht in 5% BSA bei 4 °C
- 2x 3 min PBS
- 30 min Histofine anti-rat
- 2 x 3 min PBS
- AEC (Kit)
- Eindecken mit Glyceringelatine

CD45-Färbung von Paraffinschnitten

	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Referenz/Katalognr.
Antikörper	CD45 (Maus)	1mg/ml	1:50	MNB100-77417SS
Isotypkontrolle	Ratte IgG2b	1mg/ml	1:50	MCA1125

Das verwendete Protokoll für die Visfatin-Färbung von Paraffinschnitten entspricht dem Protokoll der Vimentin-Färbung.

F4/80-Färbung von Paraffinschnitten

	Spezifität	Konzentration	Verdünnung	Referenz/Katalognr.
Antikörper	F4/80 (Maus)	1mg/ml	1:50	397 017
Isotypkontrolle	Ratte IgG2a	0,5mg/ml	1:25	559073

Das verwendete Protokoll für die Visfatin-Färbung von Paraffinschnitten entspricht dem Protokoll der Vimentin- und CD45-Färbung.

2.3 Methoden zur Datenanalyse und statistischen Auswertung

2.3.1 Scores

Leber-Score

Um die metabolischen Veränderungen der HFD evaluieren zu können, wurde anhand von histologischen Schnittbildern der prozentuale Anteil von Hepatozyten, die Fettvakuolen gebildet hatten, nach der Methode von Gilat *et al.* quantifiziert (Gilat et al. 2003). Dazu wurde von jedem Tier das gesamte Sichtfeld eines histologischen Schnittbilds in der HE-Färbung in 100x Vergrößerung betrachtet (Abbildung 3) und in prozentuale Bereiche aufgeteilt (Tabelle 2).

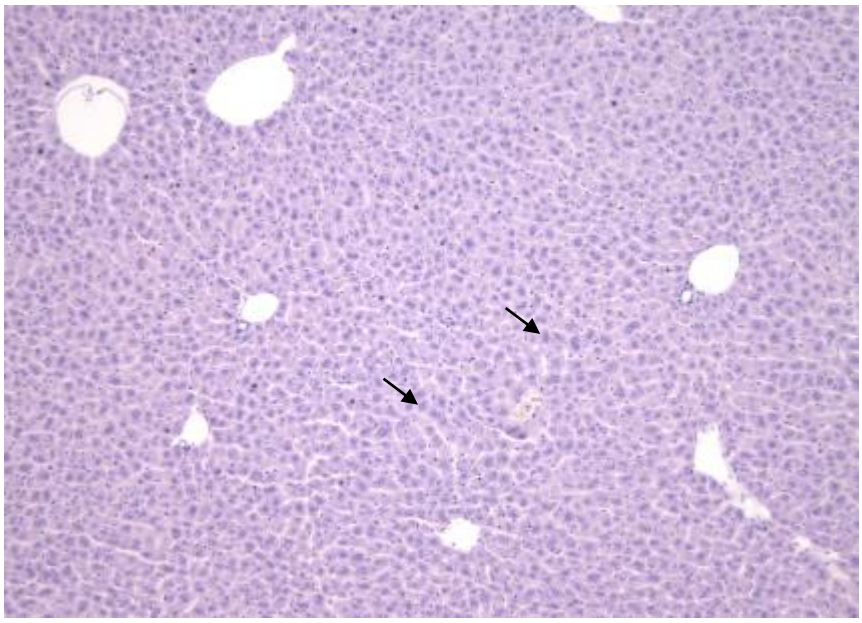

Abbildung 3: Histologische HE-Färbung der Leber eines gesunden ND Tieres (100x Vergrößerung). Im Leberparenchym lassen sich überwiegend keine Fettvakuolen erkennen. Die Zellkerne (Pfeile) und Zellgrenzen der Hepatozyten sind deutlich erkennbar und abgrenzbar.

Tabelle 2: Histologischer Leber-Score nach Gilat *et al*. Die prozentualen Bereiche beziehen sich auf das gesamte Sichtfeld eines histologischen Schnittbildes (HE-Färbung) des Leberparenchyms in 100x Vergrößerung.

Score Punktzahl	Definition
0	Kein sichtbar infiltriertes Fettgewebe
1	< 5% des Leberparenchyms ist durch Fettgewebe infiltriert
2	5 – 25% des Leberparenchyms ist durch Fettgewebe infiltriert
3	25 – 50% des Leberparenchyms ist durch Fettgewebe infiltriert
4	< 50% des Leberparenchyms ist durch Fettgewebe infiltriert

CLS-Score

Anhand von histologischen Schnittbildern nach Toluidinblau-Färbung wurden im Fettgewebe die Anzahl der CLS sowie die Anzahl der Adipozyten ausgezählt und ein prozentualer Quotient gebildet, welcher den prozentualen Anteil von CLS im Fettgewebsausschnitt widerspiegelte. Hierzu wurde für jedes Tier das gesamte Sichtfeld eines histologischen Schnittbilds in Toluidinblau-Färbung in 100x Vergrößerung betrachtet (Abbildung 4).

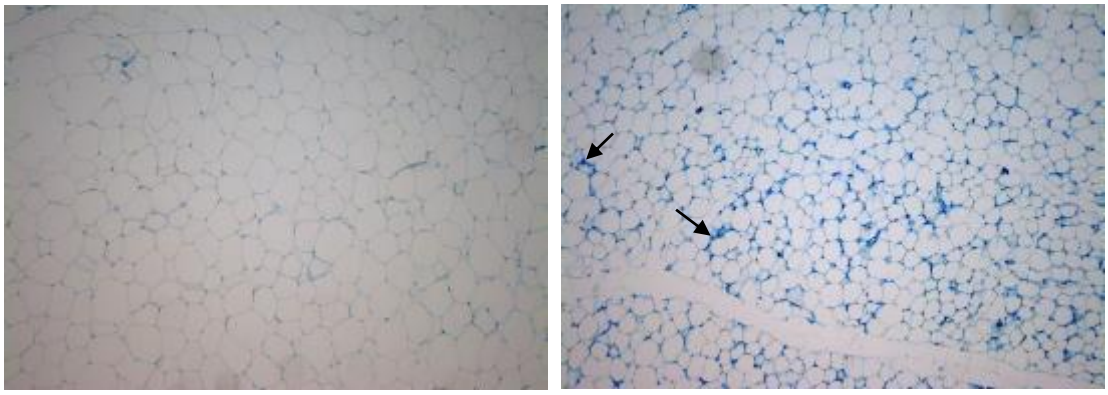

Abbildung 4: Toluidinblau-Färbung des Fettgewebes eines gesunden ND (links) und eines erkrankten ND Tieres (rechts) in jeweils 100x Vergrößerung. Im gesamten Sichtfeld wurden Adipozyten und CLS (Pfeile) ausgezählt und schließlich ein prozentualer Quotient gebildet.

Histologischer CIA-Score

Der in dieser Arbeit entwickelte CIA-Score diente der Quantifizierung entzündlicher Prozesse in den Kniegelenken der Mäuse, um einerseits eine erfolgreiche Arthritis-Induktion zu verifizieren und um andererseits eine Aussage über den Schweregrad der Arthritis treffen zu können. Hierzu wurden für den Score charakteristische Strukturen wie Gelenkknorpel, Meniskus sowie Deckzellschicht des Gelenks histologisch, anhand von verfügbaren Schnittbildern mit HE- und Safranin-O-Färbung, analysiert. Jeder dieser drei Teilbereiche wurde pro Bild beurteilt und nach Schweregrad der entzündlichen Veränderungen von 0 bis 3 bewertet. Die Definitionen sind in Tabelle 3, 4 und 5 aufgeführt sowie jeweils in Abbildung 5, 6, und 7 visualisiert. Die jeweiligen Teilscores wurden schließlich addiert, sodass der CIA-Score den Schweregrad arthritischer Gelenkveränderungen durch einen Score von 0 bis 9 beschreibt.

Bei der Auswertung stellte sich heraus, dass von insgesamt 63 immunisierten Tieren, 13 Tiere nicht an einer CIA erkrankt waren. Weder zeigten sich bei diesen Tieren klinische Entzündungszeichen, wie gerötete oder geschwollene Pfoten, noch ließen sich in

histologischen Färbungen der Gelenke inflammatorische Prozesse erkennen (CIA-Score 0). Da für das CIA-Modell bereits beschrieben wurde, dass nicht alle immunisierten Tiere erkranken und die Inzidenz ebenfalls innerhalb der Mausstämme variabel ist (Brand et al. 2007), wurden diese 13 Tiere aus den Auswertungen ausgeschlossen.

Der Teilbaustein des CIA-Scores der Deckzellschicht wurde basierend auf dem Score von Krenn *et al.* für das murine Gewebe modifiziert (Krenn et al. 2002).

Tabelle 3: Histologischer CIA-Teilscore: Knorpel

Score Punktzahl	Definition
0	Knorpelschicht vollständig intakt und durchgängig, keine Läsionen erkennbar
1	leichte Defekte an der Knorpelschicht, wenige sichtbare Kontinuitätsunterbrechungen („Löcher“)
2	multiple Defekte, vermehrt sichtbare Kontinuitätsunterbrechungen
3	massive Defekte, Knorpelmembran teilweise nicht mehr erkennbar, stellenweise vollständiges Fehlen des Knorpels, zelluläre Infiltrate in Knorpelschicht

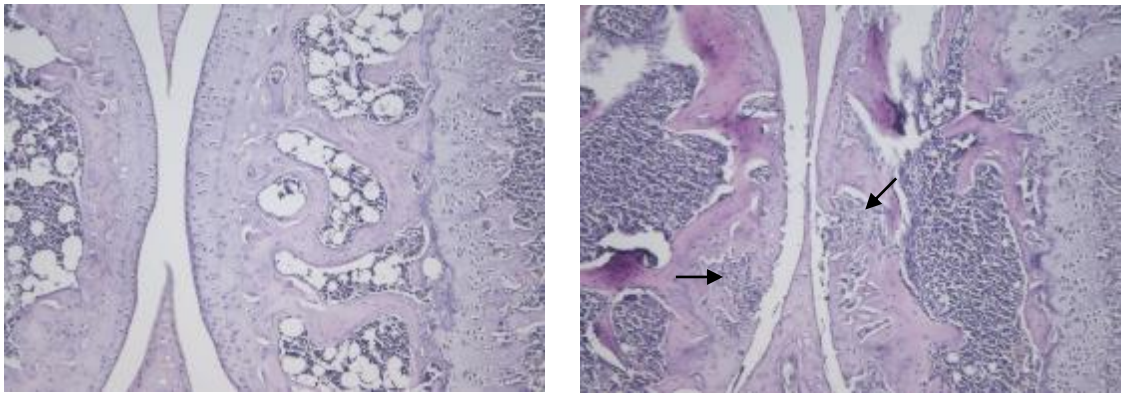

Abbildung 5: Exemplarischer Ausschnitt des Kniegelenks eines HFD gesunden (links) und eines HFD CIA Tieres (rechts) in 100x Vergrößerung. Anhand dieser Abbildung lassen sich die Definitionen aus Tabelle 3 visualisieren. Das gesunde Tier (links) wies eine vollständig intakte, durchgängige Knorpelschicht auf und erhielt null Punkte im CIA-Teilscore Knorpel. Im Gegensatz dazu zeigte das erkrankte Tier (rechts) mit einem CIA-Teilscore von drei, massive Defekte der Knorpelschicht, welche stellenweise „löchrig“ und aufgeraut wirkte. Zudem ließen sich multiple zelluläre Infiltrate in der Knorpelschicht erkennen (Pfeile).

Tabelle 4: Histologischer CIA-Teilscore: Meniskus

Score Punktzahl	Definition
0	intaktes meniskuläres Knorpelgewebe, keine Zellinvasionen, kein proliferativ verändertes submeniskuläres Bindegewebe
1	vereinzelte Zellinfiltrate im Meniskus, scharfe meniskuläre Zellgrenzen und weitgehend intakte Meniskusstrukturen, leichte submeniskuläre Zellhyperplasie
2	vermehrte Zellinfiltrate im Meniskus, unscharfe meniskuläre Zellgrenzen, starke submeniskuläre Zellhyperplasie
3	Meniskus weitgehend bis vollständig infiltriert, weitgehend keine meniskulären Zellgrenzen mehr erkennbar, massive submeniskuläre Zellhyperplasie

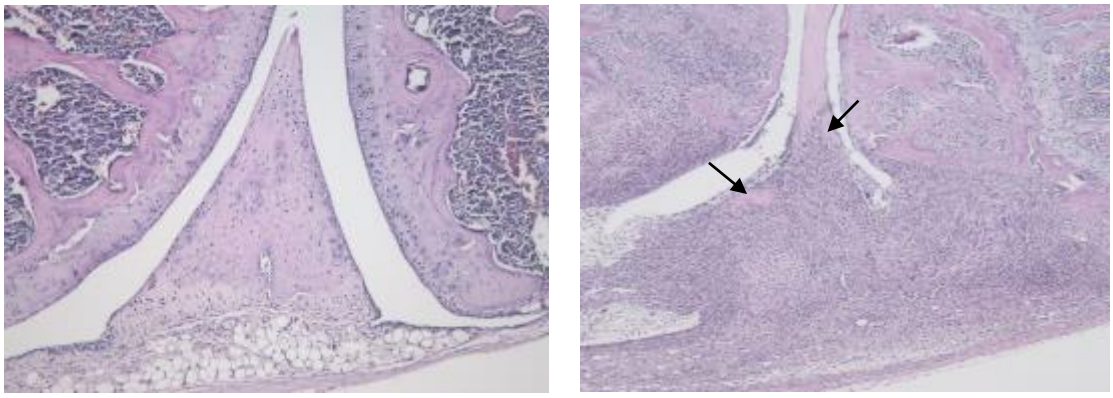

Abbildung 6: Exemplarischer Ausschnitt des Kniegelenks eines ND gesunden (links, 100x Vergrößerung) und eines ND CIA Tieres (rechts, 50x Vergrößerung). Anhand dieser Abbildung lassen sich die Definitionen aus Tabelle 4 visualisieren. Das gesunde Tier (links) wies intaktes, menisculäres Knorpelgewebe auf, zeigte weder Zellinvasionen noch proliferativ verändertes submenisculäres Bindegewebe und wurde mit dem Score null bewertet. Das erkrankte Tier (rechts) zeigte eine massive submenisculäre Zellhyperplasie, sowie eine massive Zellinfiltration in den Meniskus, dessen Knorpelsubstanz nur noch teilweise zu erkennen war (Pfeile). Das erkrankte Tier erhielt drei Punkte im CIA-Teilscore Meniskus.

Tabelle 5: Histologischer CIA-Teilscore: Synoviale Deckzellschicht

Score Punktzahl	Definition
0	intakte und nicht proliferierte Zellschicht, keine zellulären Infiltrate, keine Knorpel-Invasionszonen, deutlich abgrenzbare Synovialmembran
1	proliferierte Deckzellschicht mit 3-4 Zellreihen, keine Invasionszonen
2	proliferierte Deckzellschicht mit 5-6 Zellreihen, wenige Invasionszonen
3	proliferierte Deckzellschicht mit >6 Zellreihen, viele Invasionszonen

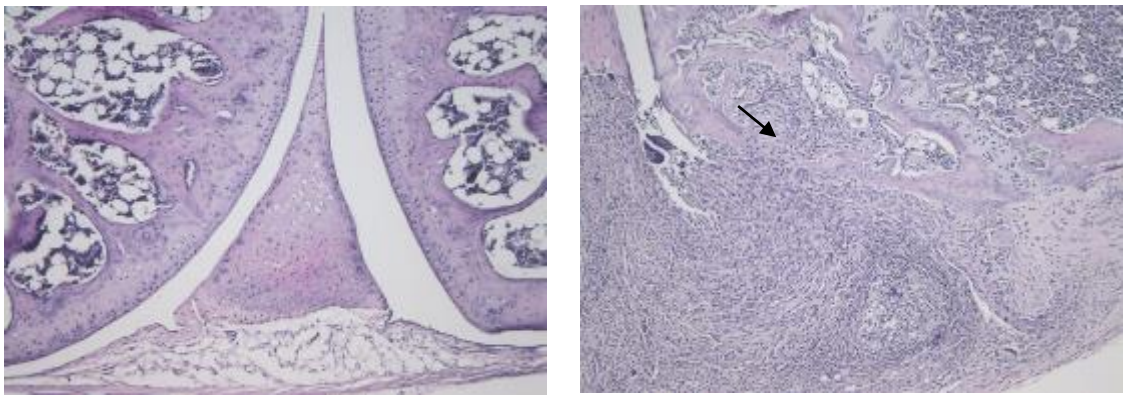

Abbildung 7: Exemplarischer Ausschnitt des Kniegelenks eines ND gesunden (links) und eines ND CIA Tieres (rechts) in 100x Vergrößerung. Anhand dieser Abbildung lassen sich die Definitionen aus Tabelle 5 visualisieren. Das gesunde Tier (links) zeigte eine intakte, nicht proliferierte Deckzellschicht ohne Invasionszonen und wurde mit null Punkten bewertet. Im Gegensatz dazu kam es bei dem erkrankten Tier (rechts) zu einer massiven Proliferation der Deckzellschicht mit mehr als 6 Zellreihen und Invasionszonen in den Gelenkknorpel (Pfeil). Das erkrankte Tier erhielt drei Punkte im CIA-Teilscore synoviale Deckzellschicht.

Histologischer Adipokin-Score

Der Adipokin-Score quantifiziert die Expression der verschiedenen Adipokine Leptin, Adiponektin und Visfatin im lokalen Gelenk. Anhand von immunhistologischen Schnittbildern wurden Gelenkknorpel und Meniskus der Tiere auf die Adipokin-Expression untersucht. Der Score gliedert sich somit in die zwei Bausteine „Knorpel“ und „Meniskus“, der anschließend zum Adipokin-Gesamtscore addiert und grafisch dargestellt wurde. Die Score-Kriterien sind für alle untersuchten Adipokine gleich. Der maximal erreichbare Score aus Knorpel und Meniskus ist 8.

Zur Beurteilung der Adipokin-Expression im Gelenkknorpel wurden die in den immunhistologischen Schnittbildern erkennbaren Färbesignale untersucht und je nach Quantität und Clusterbildung von 0 bis 4 bewertet (Tabelle 6).

Folgende Kriterien wurden für diese Arbeit definiert, um die Adipokin-Expression im Meniskus zu quantifizieren: Die Fläche des Meniskus wurde mittels des Programms „ImageJ“ gemessen, die Anzahl der Adipokin positiv gefärbten Zellen quantifiziert und ein Quotient aus Anzahl positiver Zellen zur Fläche gebildet. Für den Score wurde der Quotient in eine Punktzahl umgerechnet (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 6: Adipokin-Teilscore Knorpel. Der Begriff Signalantwort bezieht sich hier auf die immunhistochemischen Färbesignale, Adipokin-produzierender Zellen im immunhistochemischen Schnittbild des Gelenkknorpels.

Score Punktzahl	Definition
0	Keine Signalantwort, keine angefärbten Zellen erkennbar
0,5	Einzelne Zellen im Knorpel angefärbt (1-5)
1	Sehr wenige Zellen im Knorpel angefärbt (6-15)
1,5	Wenige Zellen im Knorpel angefärbt (16-30)
2	Einige Zellen im Knorpel angefärbt (31-50)
2,5	Viele Zellen im Knorpel angefärbt (51-75), vereinzelte Clusterbildung
3	Viele Zellen im Knorpel angefärbt (> 75), viele Cluster
3,5	Viele Zellen im Knorpel angefärbt, überwiegend angefärbte Zellen erkennbar, vereinzelt Zonen ohne angefärbte Zellen erkennbar
4	Sehr viele Zellen im Knorpel angefärbt, durchgängig alle Zellen positiv

Tabelle 7: Adipokin-Score Meniskus. Um die Adipokin-Expression von Zellen im Bereich des Meniskus beurteilen und diese ins Verhältnis zur Fläche des Meniskus setzen zu können, wurde die Fläche des Meniskus mittels ImageJ bestimmt. Anschließend wurden die, durch die jeweilige Adipokin Färbung (Leptin, Visfatin, Adiponektin), angefärbten Zellen gezählt und ein Quotient zur Fläche gebildet. Dieser Quotient reichte von 0,0 bis >1,76 und wurde in Score Punkte umgerechnet.

Score Punktzahl	Adipokin-Expression/Fläche [%]
0	0,0
0,5	0,00 – 0,25
1	0,26 – 0,50
1,5	0,51 – 0,75
2	0,76 – 1,00
2,5	1,01 – 1,25
3	1,26 – 1,50
3,5	1,51 – 1,75
4	>1,76

2.3.2 Statistische Auswertungen

Wie bereits beschrieben setzen sich in diesem Projekt die Stichproben aus vier unterschiedlichen Tiergruppen zusammen: gesund ND, gesund HFD, ND CIA, HFD CIA.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Graph Pad Prism Software (Version 9). Die Auswertung der CIA- und Adipokin-Scores wurde mittels nicht-parametrischen einfaktoriellen ANOVA mit anschließendem Kruskal-Wallis-Vergleichstest und multiplen Dunns-Vergleichest durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test ermöglichte die Auswertung von nicht-parametrischen unabhängigen Stichproben und untersuchte dabei, ob sich die zentralen Tendenzen der Stichproben unterschieden. Der anschließend durchgeführte Post-hoc-Test (Dunns-Test) diente der spezifischen Aufschlüsselung von signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Stichproben. Folglich konnte in diesem Projekt unterschieden werden, inwieweit die untersuchenden Parameter eher durch metabolische Effekte (ND, HFD) oder durch entzündliche Faktoren (gesund, CIA) signifikant beeinflusst wurden.

Die serologischen ELISA Messwerte wurden mittels einfaktoriellen ANOVA und anschließendem multiplem Turkeys-Vergleichstest mit einer einzelnen Varianz ausgewertet. Um mögliche Zusammenhänge zwischen den erhobenen Parametern innerhalb der Tiergruppen untersuchen zu können, erfolgte die Analyse mittels

einfacher linearer Regressionsanalyse. Ab einem Koeffizienten r^2 von > 0,3 konnte von einem statistischen Zusammenhang ausgegangen werden. Zudem diente die Korrelationsanalyse nach Spearman der Verifizierung sowie der Quantifizierung der Stärke eines ungerichteten Zusammenhangs zwischen den untersuchten Parametern. Die Rangkorrelation nach Spearman verminderte zudem durch die Konvertierung der Daten in Rangpaare den Einfluss von Ausreißern. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden in den Abbildungen wie folgt dargestellt: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$(***), $p < 0,0001$(****).

3. Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

Die Erhöhung des Körpergewichtes diente der Verifizierung der durch die HFD induzierten Adipositas. Die Messwerte wurden zum Zeitpunkt der Nekropsie 4, 5,5 oder 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung (Tag 0) erhoben.

Betrachtete man zunächst sämtliche Zeitpunkte im Überblick, so fiel auf, dass sowohl gesunde als auch erkrankte HFD Tiere zu jedem Zeitpunkt ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zu den ND Tieren aufwiesen (gesund HFD: 4 Wochen $p = 0,0054$, 5,5 Wochen $p = 0,0037$, 7 Wochen $p = <0,0001$; CIA HFD: 4 Wochen $p = 0,0039$, 5,5 Wochen $p = 0,0066$, 7 Wochen $p = 0,0003$). Verglich man die HFD Tiere untereinander, so hatten gesunde HFD Tiere in allen Zeitpunkten ein höheres Körpergewicht als die erkrankten HFD Tiere. Zudem zeigte sich bei gesunden HFD Tieren im Zeitraum von 5,5 bis 7 Wochen eine deutliche Gewichtszunahme im Zeitverlauf (Abbildung 8 und 9). Im Gegensatz dazu kam es bei den erkrankten HFD Tieren im Zeitraum von 4 bis 5,5 Wochen zu einer leichten Abnahme des Gewichtes. HFD CIA Tiere wiesen zu allen Zeitpunkten ein höheres Körpergewicht im Vergleich zu den ND CIA Tieren auf. Interessanterweise hatten HFD CIA Tiere zum 4 Wochen Zeitpunkt ein deutlich höheres Gewicht, im Vergleich zu den Tieren der 5- und 7 Wochengruppe (Tabelle 8, 9, 10).

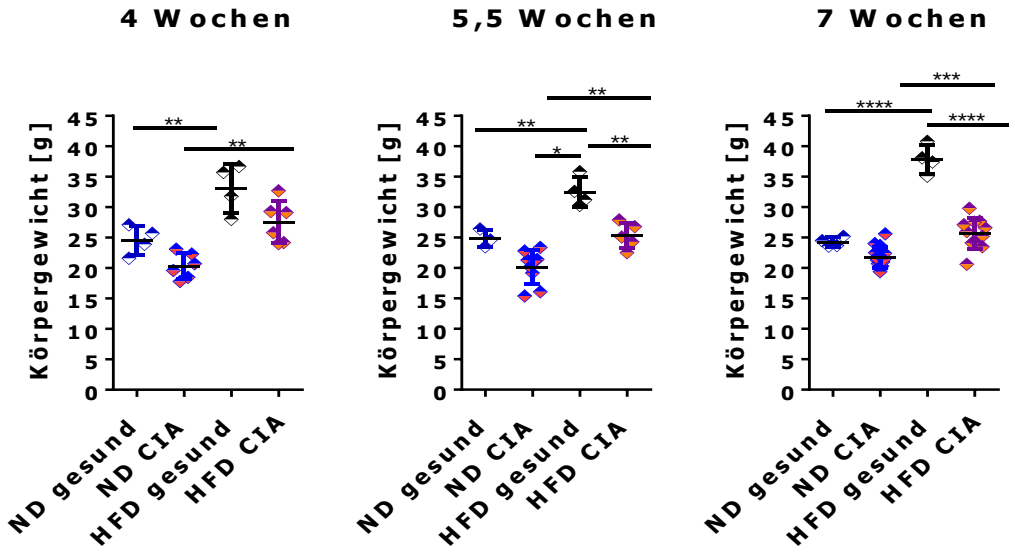

Abbildung 8: Körpergewicht der DBA/1JRj Mäuse zum Todeszeitpunkt. Insgesamt zeigte sich, dass sowohl gesunde als auch HFD CIA Tiere zu jedem Zeitpunkt ein signifikant höheres Körpergewicht im Vergleich zu den ND Tieren aufwiesen. Die CIA-Induktion bewirkte bei ND (5,5 Wochen p = 0,0442) und vor allem auch bei HFD Tieren eine Reduktion des Körpergewichtes im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen. Diese Reduktion ist zwischen den HFD Tieren sehr deutlich und zum 5,5- (p = 0,0021) und 7 Wochenzeitpunkt (p = < 0,0001) hochsignifikant.

Betrachtete man die ND Tiere, so entwickelte sich das Körpergewicht bei gesunden Tieren über den gesamten Zeitraum konstant. Auffallend war, dass ND CIA Tiere, vor allem 4 und 5,5 Wochen, nach erfolgter Immunisierung ein vermindertes Gewicht als die gesunden ND Tiere aufwiesen. Dieser Effekt war in der 7 Wochen Gruppe in abgeschwächter Form ebenfalls erkennbar.

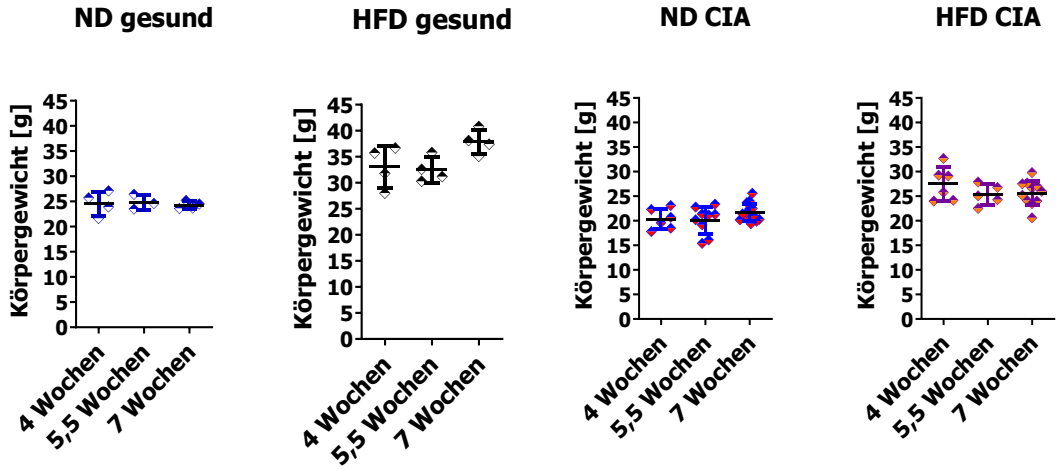

Abbildung 9: Körpergewicht der DBA/1JRj Mäuse als Zeitverlauf über 4 / 5,5 / 7 Wochen nach Induktion der CIA (entspricht 10 / 11,5 / 13 Wochen nach Fütterungsbeginn). Gesunde und erkrankte ND Tiere zeigten im Zeitverlauf ein überwiegend konstant bleibendes Körpergewicht.

Tabelle 8: Darstellung des Körpergewichts [g] der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erster Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	4	6	6
Minimum [g]	21,60	17,80	28,00	24,00
25 % Perzentile	22,18	18,33	28,95	24,15
Median [g]	24,80	20,15	33,75	27,45
75 % Perzentile	26,75	22,50	36,45	30,15
Maximum [g]	27,10	23,10	36,70	32,70
Mittelwert [g]	24,58	20,33	33,05	27,52
Standardabweichung	2,377	2,096	3,975	3,431
Standardfehler des Mittelwertes	1,188	0,8558	1,988	1,401

Tabelle 9: Darstellung des Körpergewichts [g] der Versuchsgruppen 5,5 Wochen nach erster Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	3	5	9
Minimum [g]	23,50	15,40	30,30	22,50
25 % Perzentile	23,50	17,65	30,53	23,40
Median [g]	24,60	21,20	31,90	25,10
75 % Perzentile	26,40	22,10	35,00	27,35
Maximum [g]	26,40	23,40	35,80	27,90
Mittelwert [g]	24,83	20,11	32,48	25,32
Standardabweichung	1,464	2,771	2,410	2,115
Standardfehler des Mittelwertes	0,8452	0,9237	1,205	0,9457

Tabelle 10: Darstellung des Körpergewichts [g] der Versuchsgruppen 7 Wochen nach erster Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	4	11	14
Minimum [g]	23,60	19,40	35,10	20,60
25 % Perzentile	23,63	20,28	35,68	24,00
Median [g]	24,10	21,35	37,75	26,00
75 % Perzentile	25,03	22,80	40,13	27,50
Maximum [g]	25,20	25,60	40,80	29,80
Mittelwert [g]	24,25	21,72	37,85	25,65
Standardabweichung	0,7506	1,756	2,347	2,518
Standardfehler des Mittelwertes	0,3753	0,4694	1,174	0,7593

3.2 Histologische Färbungen:

3.2.1 Leber-Score

Der Leber-Score diente in Ergänzung zum Körpergewicht zur Beurteilung von metabolischen Veränderungen durch die Adipositas-Induktion (HFD). Mit dem Leber-Score ließ sich das Ausmaß der Leberverfettung, also der vermehrten Einlagerung und Bildung von Fettvakuolen in die Hepatozyten, anhand von histologischen Schnittbildern in der H/E Färbung, beurteilen (Abbildung 10). Die Ergebnisse des Scores sind grafisch in Abbildung 11 und 12 dargestellt.

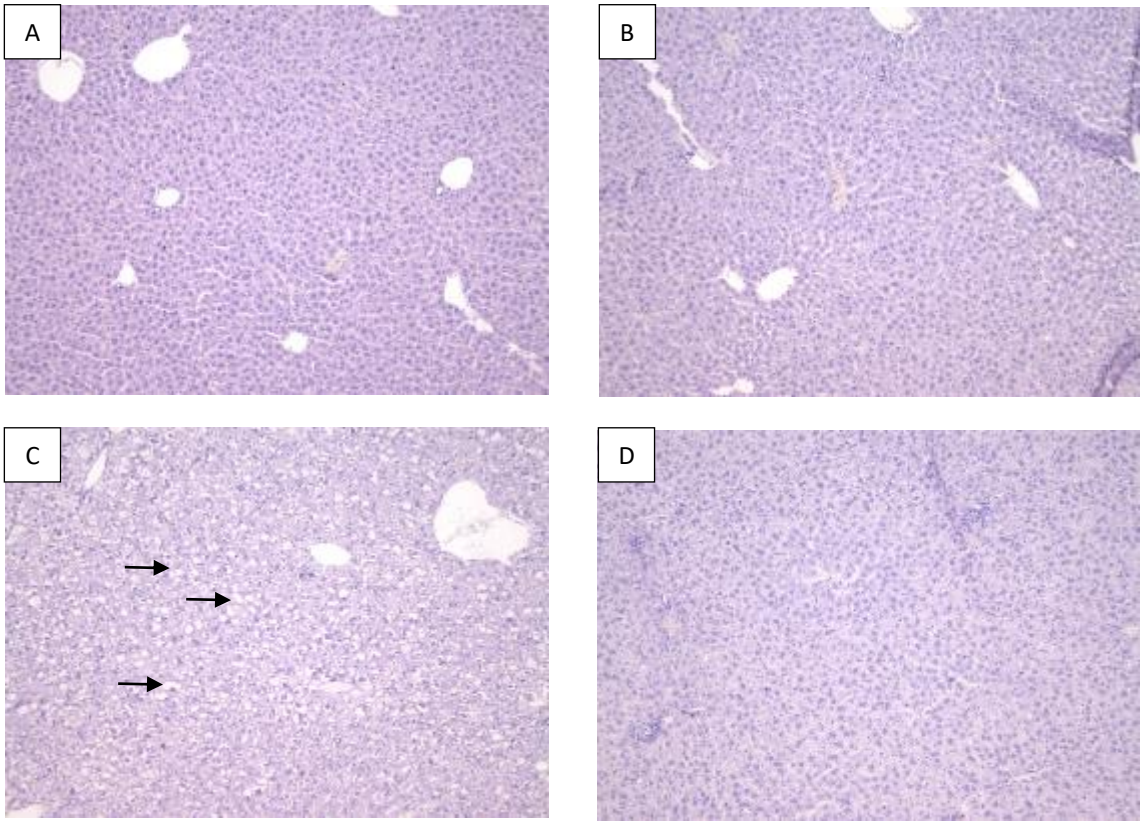

Abbildung 10: Histologische H/E-Färbung der Leber eines gesunden ND (A), erkrankten ND (B), gesunden HFD (C) und eines erkrankten HFD Tieres (D) in jeweils 100x Vergrößerung. Im Leberparenchym ließen sich sowohl bei gesunden ND (A) als auch erkrankten ND (B) Tieren überwiegend keine Fettvakuolen erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten gesunde HFD Tiere (C) massive steatohepatische Veränderungen im Leberparenchym. Es zeigten sich nicht eindeutig abgrenzbare Leberzellgrenzen sowie eine Vielzahl von Fettvakuolen in den Hepatozyten (im Bild als weiße Vakuolen erkennbar, Pfeile), welche die HFD induzierten metabolischen Veränderungen widerspiegelten. Auch bei erkrankten HFD Tieren (D) ließen sich im Vergleich zu ND Tieren vermehrt Fettvakuolen erkennen. Das Ausmaß der Leberverfettung war jedoch wesentlich geringer im Vergleich zu gesunden HFD Tieren.

Betrachtete man zunächst die Versuchsgruppen 4 Wochen nach Arthritis-Induktion, so ergab sich, dass gesunde HFD Tiere eine massive Leberverfettung aufwiesen und diese

im Vergleich zu der gesunden ND Gruppe signifikant erhöht war (p = 0,0436). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls in der 5,5 Wochen Gruppe (p = 0,0425). Interessanterweise wiesen HFD CIA Tiere 4 Wochen nach Immunisierung nur eine geringfügig erhöhte Leberverfettung im Vergleich zu ND Tieren auf. Diese nahm jedoch in der 5,5 Wochen Gruppe zu, sodass es hier zu einem Anstieg der Leberverfettung der HFD CIA Tiere im Vergleich zur ND CIA Gruppe kam.

Verglich man die HFD Tiere untereinander, so zeigte sich, dass die Arthritis-Induktion eine Abnahme der Leberverfettung trotz hochkalorischer Diät in der 4 und 5,5 Wochen Gruppe zur Folge hatte. Dieser Effekt ließ sich jedoch nicht auf die ND Tiere übertragen. Sowohl gesunde ND als auch erkrankte ND Tiere zeigten im Verlauf einen überwiegend konstanten Grad der Leberverfettung 4 und 5,5 Wochen nach Immunisierung (Tabelle 11, 12).

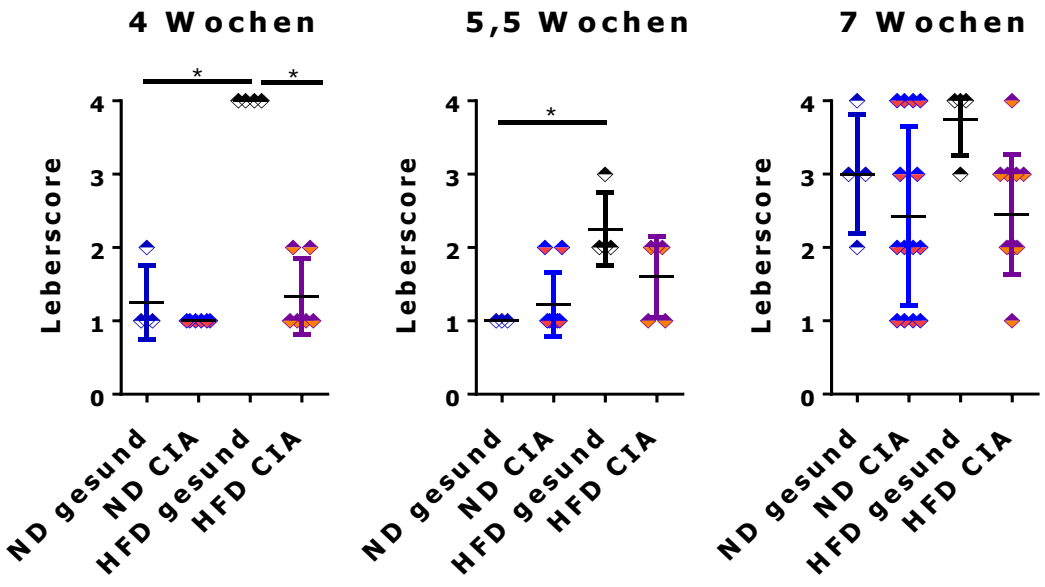

Abbildung 11: Leber-Score der DBA/1JRj Mäuse. Die HFD-Induktion bewirkte vor allem bei gesunden HFD Tieren und zu den ersten beiden Wochenzeitpunkten eine signifikante Zunahme der Leberverfettung im Vergleich zu gesunden ND Tieren (4 Wochen p = 0,0436; 5,5 Wochen p = 0,0425) . Die Induktion der Arthritis führt zu einer Abnahme der Leberverfettung bei HFD Tieren (4 Wochen p = 0,0375) und in geringem Maße auch bei ND Tieren zum 4 und 7 Wochenzeitpunkt.

Auffallend war, dass sich die Datenlage in der 7 Wochen Gruppe heterogener, im Vergleich zu den vorherigen Wochengruppen, darstellte (Tabelle 13). Sämtliche Tiergruppen wiesen hier im Durchschnitt eine Zunahme der Leberverfettung auf, jedoch waren die Score Werte der einzelnen Tiere äußerst volatil. Die in den vorangegangenen Gruppen sichtbare Tendenz, ließ sich trotz Datenstreuung erkennen. So zeigten auch in

der 7 Wochen Gruppe erkrankte und vor allem gesunde HFD Tiere eine erhöhte Leberverfettung im Vergleich zu den ND Tieren. Zudem bewirkte die CIA-Induktion bei HFD Tieren eine Abnahme des Scores.

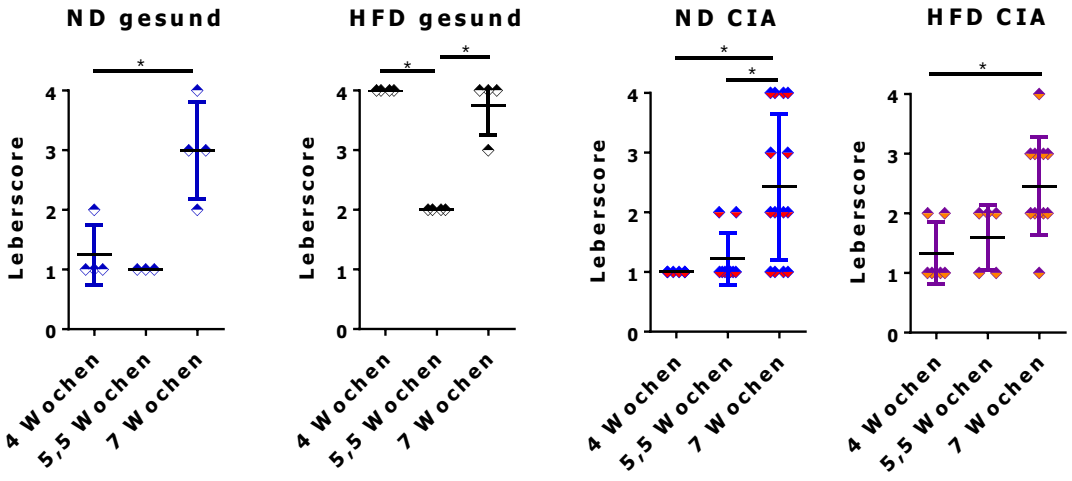

Abbildung 12: Leber-Score der DBA/1JRj Mäuse im Zeitverlauf. Auffallend war hier die deutliche Zunahme der Leberverfettung zum 7 Wochen Zeitpunkt in allen Gruppen. Außerdem zeigten sowohl ND als auch HFD CIA Tiere eine kontinuierliche Zunahme des Leber-Scores (ND CIA von 4 bis 7 Wochen p = 0,0103; HFD CIA von 4 bis 7 Wochen p = 0,0207).

Tabelle 11: Darstellung des Leber-Scores der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erster Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	6	4	6
Minimum [g]	1,000	1,000	4,000	1,000
25 % Perzentile	1,000	1,000	4,000	1,000
Median [g]	1,000	1,000	4,000	1,000
75 % Perzentile	1,750	1,000	4,000	2,000
Maximum [g]	2,000	1,000	4,000	2,000
Mittelwert [g]	1,250	1,000	4,000	1,333
Standardabweichung	0,5000	0,0	0,0	0,5164
Standardfehler des Mittelwertes	0,2500	0,0	0,0	0,2108

Tabelle 12: Darstellung des Leber-Scores der Versuchsgruppen 5,5 Wochen nach erster Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	1,000	1,000	2,000	1,000
25 % Perzentile	1,000	1,000	2,000	1,000
Median [g]	1,000	1,000	2,000	2,000
75 % Perzentile	1,000	1,500	2,750	2,000
Maximum [g]	1,000	2,000	3,000	2,000
Mittelwert [g]	1,000	1,222	2,250	1,600
Standardabweichung	0,0	0,4410	0,5000	0,5477
Standardfehler des Mittelwertes	0,0	0,1470	0,2500	0,2449

Tabelle 13: Darstellung des Leber-Scores der Versuchsgruppen 7 Wochen nach erster Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	2,000	1,000	3,000	1,000
25 % Perzentile	2,250	1,000	3,250	2,000
Median [g]	3,000	2,000	4,000	2,000
75 % Perzentile	3,750	4,000	4,000	3,000
Maximum [g]	4,000	4,000	4,000	4,000
Mittelwert [g]	3,000	2,429	3,750	2,455
Standardabweichung	0,8165	1,223	0,5000	0,8202
Standardfehler des Mittelwertes	0,4082	0,3267	0,2500	0,2473

3.2.2. CLS-Score

Mithilfe der Toluidinblau-Färbung des Fettgewebes ließen sich einerseits Rückschlüsse auf die Verteilung und Morphologie der Adipozyten ziehen und andererseits durch das Vorhandensein und die Anzahl invadierter Makrophagen (CLS) eine Aussage über den Entzündungszustand des Fettgewebes treffen (Abbildung 14). Um das Auftreten von CLS zu quantifizieren wurde im CLS-Score die Anzahl der CLS zur Gesamtzahl der Adipozyten ins Verhältnis gesetzt und als Quotient berechnet.

Betrachtete man zunächst morphologisch die Größe und Verteilung der Adipozyten bei gesunden HFD Tieren, so fiel auf, dass diese im Vergleich zu den ND Tieren deutlich hypertroph waren (Abbildung 13).

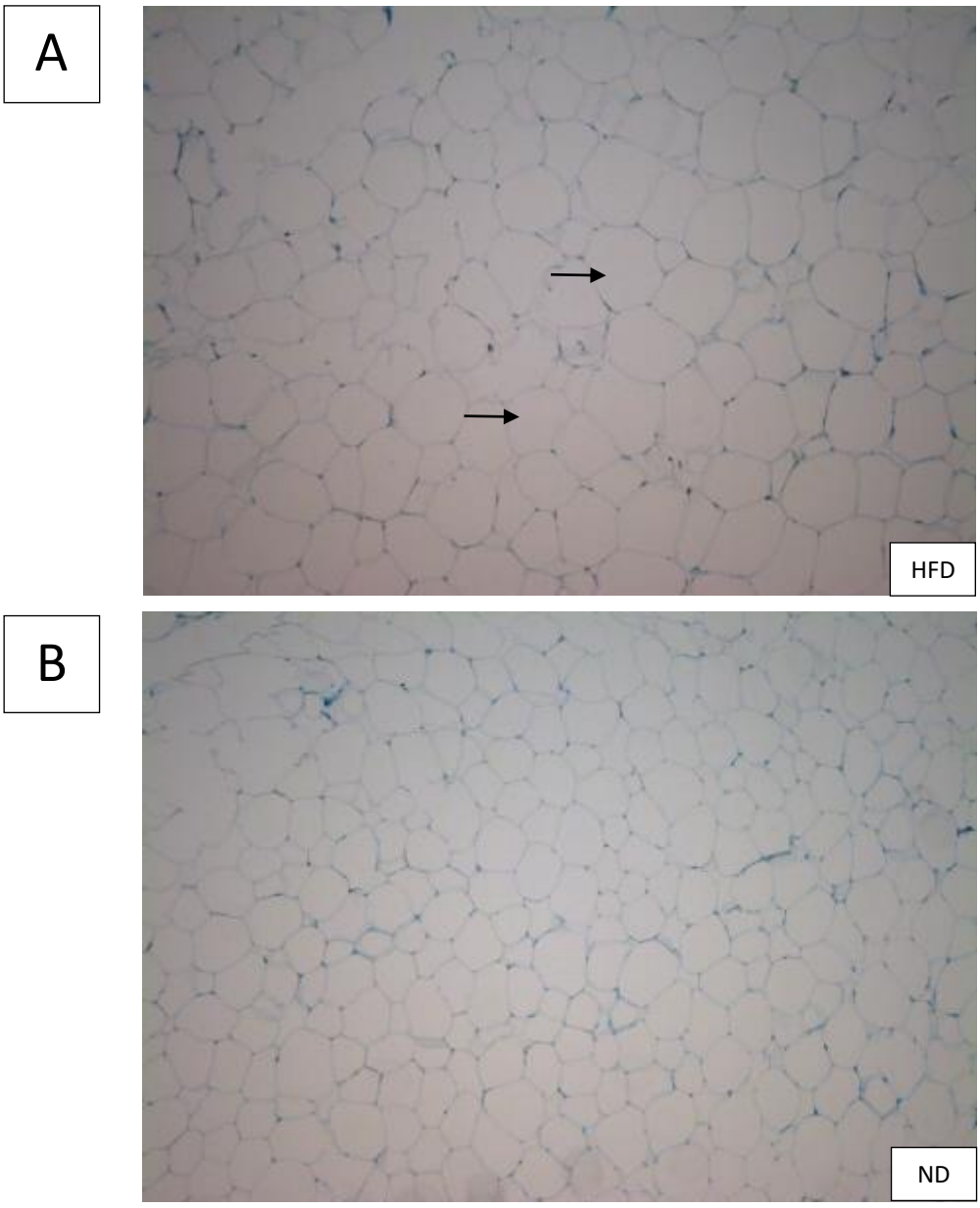

Abbildung 13: Toluidinblau-Färbung des Fettgewebes eines gesunden HFD Tieres (A) und eines gesunden ND Tieres (B). Beide Abbildungen sind in 100x Vergrößerung dargestellt. Verglich man A und B, so waren die Adipozyten der HFD Tiere, im Vergleich zu den ND Tieren, hypertroph (Pfeile) und in ihrer Anzahl vermindert.

Die Anzahl der CLS unterschied sich zwischen HFD und ND Tieren deutlich (Abbildung 15, 16). Zudem fiel auf, dass vor allem ND CIA Tiere eine signifikant höhere Anzahl von CLS gegenüber der gesunden ND Kontrollgruppe (4 Wochen p =

0,0005, 5,5 Wochen p = 0,0043, 7 Wochen p = 0,0135) sowie der HFD CIA Gruppe aufwiesen (zum 4 Wochen Zeitpunkt signifikant, p = 0,0377). Interessanterweise nahm die CLS Anzahl bei den ND CIA Tieren im Zeitverlauf kontinuierlich signifikant ab und näherte sich zum 7 Wochen Zeitpunkt dem Niveau der gesunden und erkrankten HFD Tiere an (Abbildung 16). Innerhalb der gesunden ND Tiere blieb die CLS Anzahl über den gesamten Zeitverlauf auf einem konstant niedrigen Niveau.

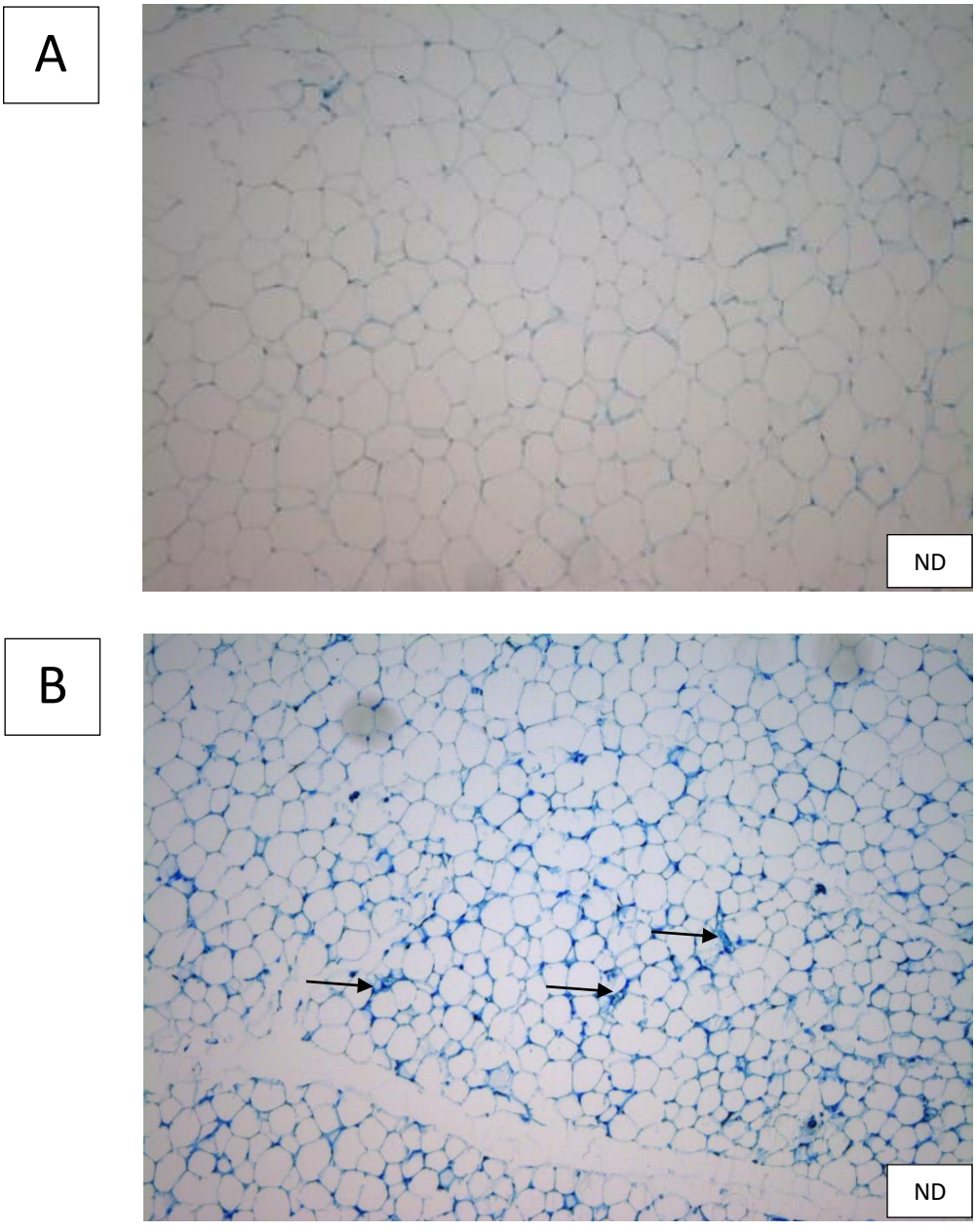

Abbildung 14: Toluidinblau-Färbung des Fettgewebes eines gesunden ND (A) und eines erkrankten ND Tieres (B) in jeweils 100x Vergrößerung. Auffallend war die Vielzahl invadierender Makrophagen im Fettgewebe des erkrankten ND Tieres, die sich kronenförmig um die Adipozyten legen und daher als „crown-like structures“ bezeichnet werden (Pfeile).

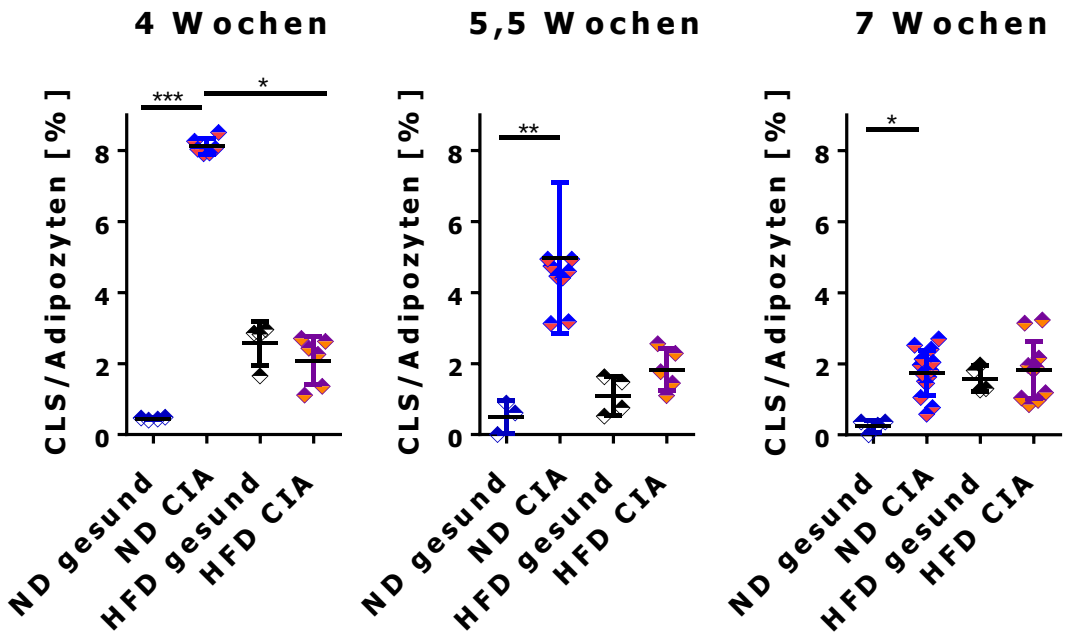

Abbildung 15: CLS-Score der Versuchsgruppen, in dem die prozentuale Anzahl aller CLS im Vergleich zur Gesamtzahl der Adipozyten in einem bestimmten Gesichtsfeld dargestellt wurde. Auffallend war hier die zu allen Zeitpunkten signifikante Erhöhung des CLS-Scores der ND CIA Tiere, im Vergleich zu der gesunden ND Kontrollgruppe. Zudem war die CLS Anzahl der ND CIA Tiere zum 4 Wochen Zeitpunkt signifikant höher als die der HFD CIA Tiere (p = 0,0377).

Im Gegensatz zu den ND CIA Tieren, hielte sich die Anzahl der CLS bei den HFD CIA Tieren über den Zeitverlauf vergleichsweise konstant. Bei den gesunden HFD Tieren kam es zum 5,5 Wochen Zeitpunkt zu einer signifikanten Reduktion der CLS (p = 0,0324) die jedoch 7 Wochen nach Immunisierung wieder leicht zunahm. Die HFD-Induktion bei gesunden Tieren bewirkte zu allen Zeitpunkten eine Zunahme der invadierenden Makrophagen im Vergleich zu den gesunden ND Tieren (Tabelle 14, 15, 16).

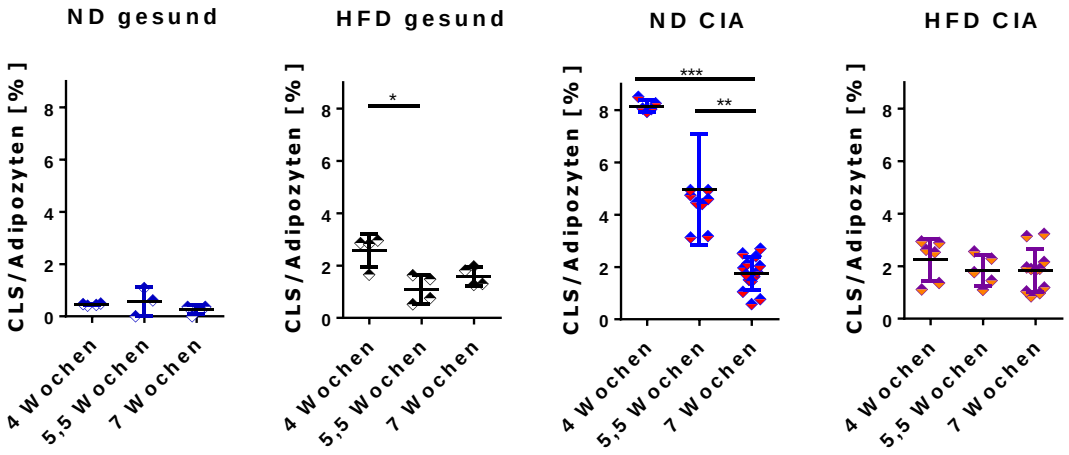

Abbildung 16: CLS-Score der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Interessanterweise kam es bei den ND CIA Tieren zu einer kontinuierlichen, signifikanten Abnahme der CLS Anzahl über den Zeitverlauf (4 bis 7 Wochen p = 0,0001, 5,5 bis 7 Wochen p = 0,0018). Im Gegensatz dazu blieb der CLS-Score bei HFD CIA Tieren auf einem konstanten Niveau, dass mit den gesunden HFD Tieren vergleichbar war. ND gesunde Tiere zeigten nur eine geringe CLS Anzahl im Vergleich zur gesunden HFD Gruppe.

Tabelle 14: Darstellung des CLS-Scores der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erster Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	6	4	6
Minimum [g]	0,4100	7,910	1,650	1,110
25 % Perzentile	0,4175	7,925	1,943	1,298
Median [g]	0,4550	8,050	2,840	2,345
75 % Perzentile	0,4850	8,323	2,935	2,650
Maximum [g]	0,4900	8,510	2,960	2,710
Mittelwert [g]	0,4525	8,118	2,573	2,083
Standardabweichung	0,0350	0,2289	0,6178	0,6802
Standardfehler des Mittelwertes	0,0175	0,09343	0,3089	0,2777

Tabelle 15: Darstellung des CLS-Scores der Versuchsgruppen 5,5 Wochen nach erster Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	0,0	3,130	0,5200	1,100
25 % Perzentile	0,0	3,795	0,5775	1,275
Median [g]	0,6100	4,600	1,115	1,770
75 % Perzentile	0,8900	4,940	1,593	2,425
Maximum [g]	0,8900	10,33	1,630	2,560
Mittelwert [g]	0,5000	4,971	1,095	1,834
Standardabweichung	0,4551	2,124	0,5429	0,5969
Standardfehler des Mittelwertes	0,2627	0,7079	0,2714	0,2670

Tabelle 16: Darstellung des CLS-Scores der Versuchsgruppen 7 Wochen nach erster Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	0,0	0,5800	1,260	0,8500
25 % Perzentile	0,0675	1,350	1,270	1,040
Median [g]	0,3150	1,770	1,555	1,890
75 % Perzentile	0,3600	2,200	1,930	2,160
Maximum [g]	0,3600	2,700	1,970	3,230
Mittelwert [g]	0,2475	1,736	1,585	1,833
Standardabweichung	0,1704	0,6320	0,3586	0,8088
Standardfehler des Mittelwertes	0,08518	0,1689	0,1793	0,2439

3.3.3 Auswertung und Entwicklung eines histologischen CIA-Scores

Um neben den metabolischen Veränderungen auch entzündliche Prozesse im Gelenk näher analysieren zu können, wurden anhand von verfügbaren H/E- und Safranin-O Färbungen histologischer Schnittbilder des murinen Kniegelenks (Abbildung 17, 19), das Ausmaß inflammatorischer Prozesse und der damit einhergehenden Gelenkdestruktion, anhand eines für diese Arbeit definierten Scores beurteilt (Tabelle 3-5). Von den insgesamt 50 CIA Tieren zeigten 9 Tiere nur sehr geringe entzündliche Gelenkveränderungen. Interessanterweise wiesen die übrigen 41 Tiere überwiegend starke Entzündungsreaktionen und folglich hohe CIA-Scores auf. Die Scores sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt.

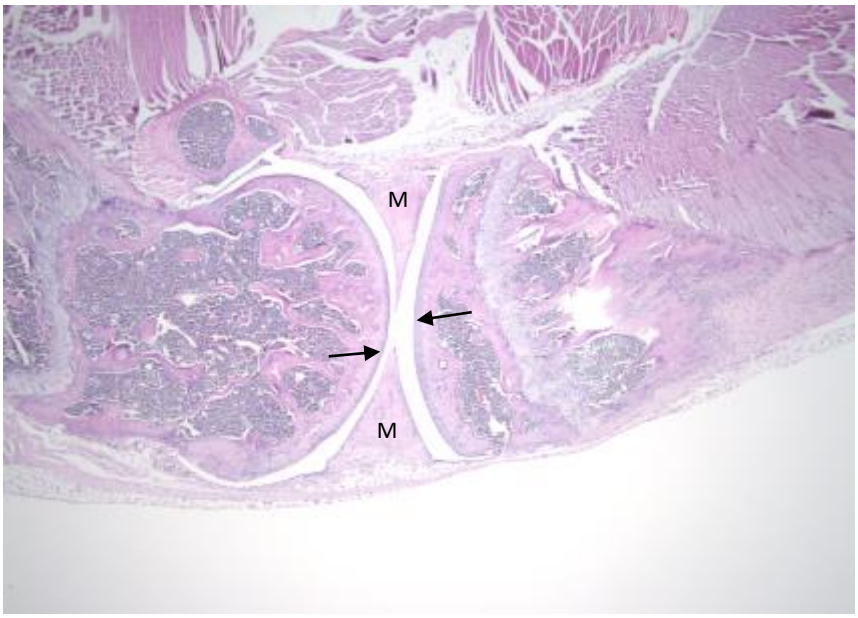

Abbildung 17: Histologische Übersichtsfärbung (H/E) des Kniegelenkes eines gesunden ND Tieres zum 5,5 Wochen Zeitpunkt. Darstellung des Meniskus (M) sowie der Knorpeloberflächen des hyalinen Knorpels (Pfeile).

Betrachtete man zunächst gesunde und erkrankte Tiere unabhängig von der Diät, so fiel auf, dass bei gesunden Tieren zu allen Zeitpunkten keine inflammatorischen Prozesse im Gelenk zu sehen waren. Im Gegensatz dazu zeigten die CIA Tiere, vor allem 5,5 Wochen nach erster Immunisierung eine sehr starke Gelenkentzündung, mit entsprechender Destruktion von Knorpel und Knochen, Zellinfiltrationen in Meniskus und Knorpel sowie eine stark hyperplastische Deckzellschicht (Abbildung 18, 20). Diese entzündlichen Veränderungen aller CIA Tiere ließen sich, bis auf einen Zeitpunkt, immer signifikant von den gesunden Tieren unterscheiden.

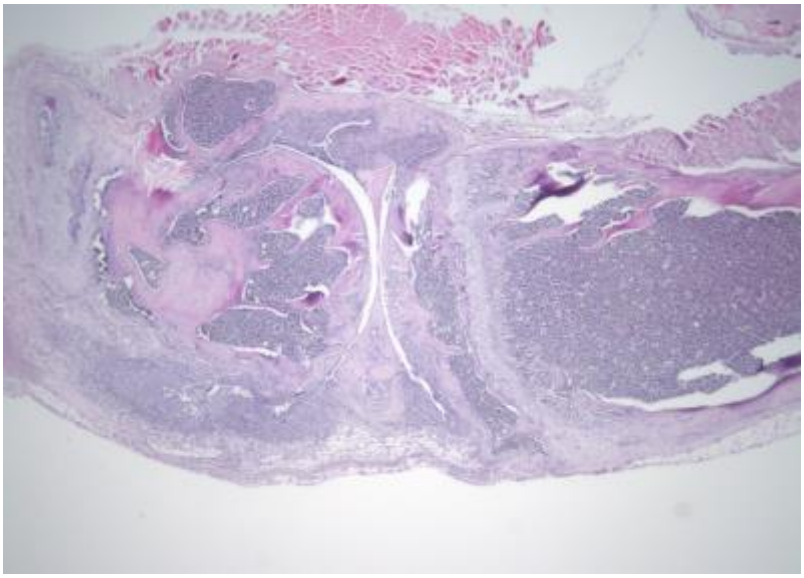

Abbildung 18: Histologische Übersichtsfärbung (H/E) eines HFD CIA Tieres 7 Wochen nach erster Immunisierung.

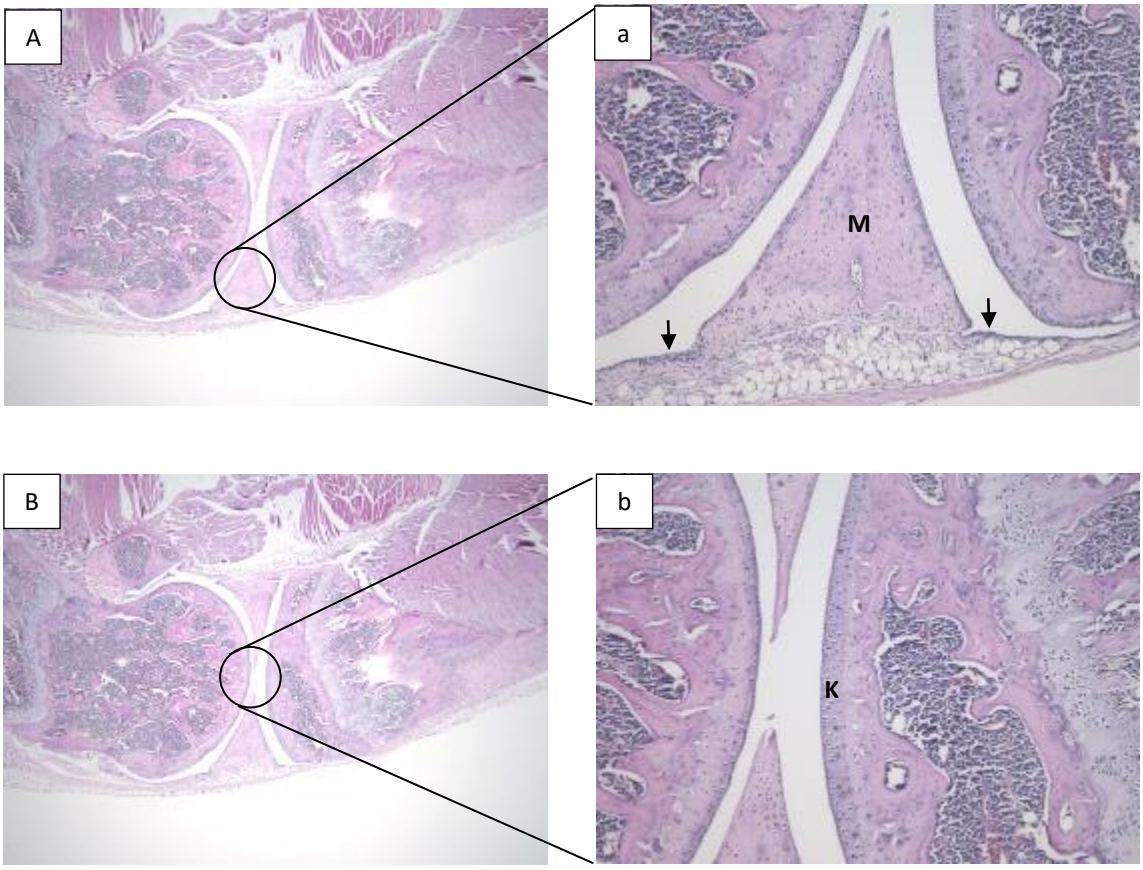

Abbildung 19: Darstellung des Kniegelenks eines gesundes ND Tieres zum 5,5 Wochenzeitpunkt (A, B). Vergrößerung des Meniskus (a). Der Meniskus (M) ist deutlich abgrenzbar, die Knorpeloberflächen (K) zeigen sich intakt und es sind keine infiltrierenden Zellen im Faserknorpel zu erkennen. Die Pfeile zeigen auf die Deckzellschicht, die sich hier nicht hochgradig proliferiert und nicht hyperplastisch zeigt. Der Zustand des Gelenkknorpelgewebes ist in der Vergrößerung (b) dargestellt und lässt sich als intakt, kontinuierlich und eindeutig abgrenzbar beschreiben.

4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung stellten sich die Scores der CIA Tiere unabhängig von diätetischen Einflüssen sehr variabel dar. So gab es zu diesem Zeitpunkt bereits einige Tiere, die starke entzündliche Veränderungen in den Gelenken aufwiesen. Bei der Mehrzahl der Tiere ließen sich jedoch nur moderate, bei einigen sogar keine Entzündungsvorgänge beobachten. Letzteres zeigte sich vor allem für ND CIA Tiere, da innerhalb jener Gruppe der histologische Gelenkzustand bei drei Tieren mit jeweils null Punkten bewertet wurde. Durch die Adipositas-Induktion kam es bei HFD CIA Tieren zu den 4 Wochenzeitpunkten insgesamt betrachtet zu stärkeren Entzündungsreaktionen, im Vergleich zu ND CIA Tieren (Tabelle 17).

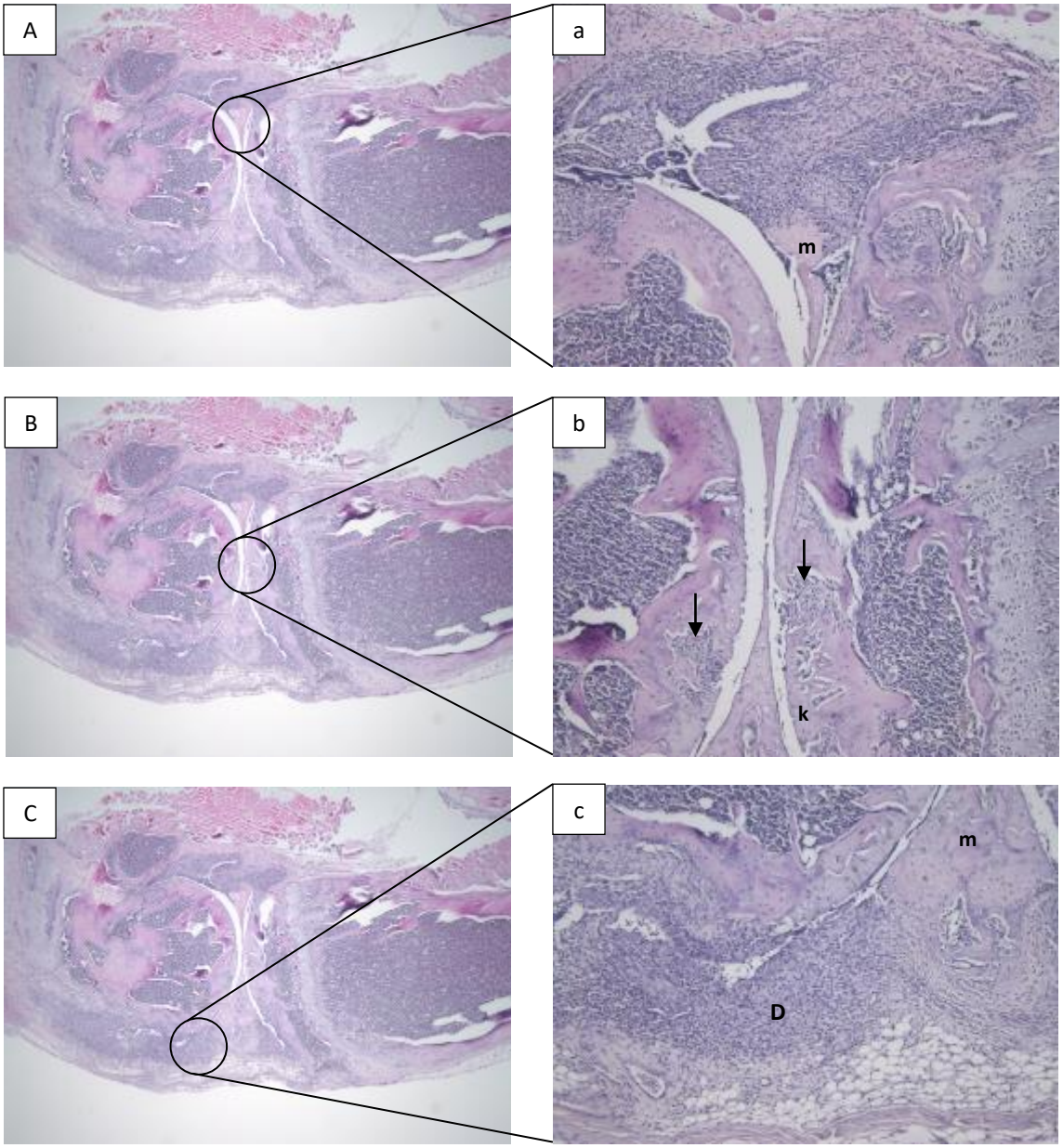

Abbildung 20: Darstellung eines kranken HFD Tieres zum 7 Wochenzeitpunkt. In den Abbildungen werden exemplarisch die entzündlichen Veränderungen in Meniskus (a), Knorpel (b) und Deckzellschicht (c) deutlich, die die Grundlage des CIA-Scores (Gelenk-Scores) darstellten. Charakteristisch für die starke Gelenkentzündung zeigte sich eine massive Zellinfiltration in den Meniskus (a), wodurch nur noch geringfügige Knorpelbestandteile (m) zu erkennen waren. Auch in der oberflächlichen Knorpelschicht des Gelenkknorpels (b) kam es durch die inflammatorischen Prozesse zu multiplen Destruktionen, die Knorpelschicht (k) wirkte diskontinuierlich, teilweise „löchrig“ und aufgeraut. Es stellten sich zudem multiple Zellinfiltrationen dar (Pfeile). Außerdem kam es zu einer stark hyperplastischen Veränderung (D) der Deckzellschicht (c). Insgesamt ließ sich zudem eine Abnahme Knochensubstanz beobachten.

5,5 Wochen nach der Immunisierung zeigten sich sowohl in der erkrankten HFD als auch in der erkrankten ND Gruppe bei fast allen Tieren sehr starke entzündliche Gelenkveränderungen mit entsprechend hohen Scores. Interessanterweise näherten sich die Werte von HFD und ND CIA Tieren an. Letztere wiesen lediglich eine geringfügig höhere Entzündungsaktivität auf.

7 Wochen nach CIA-Induktion kam es in beiden CIA Gruppen zu einer leichten Abnahme der Inflammation, was sich in leicht verminderten Scores widerspiegelte . Zu diesem Zeitpunkt ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen HFD und ND Tieren erkennen, jedoch kam es bei ND CIA Tieren zu einer geringfügig stärkeren Abnahme der Entzündungsintensität (Abbildung 21, 22).

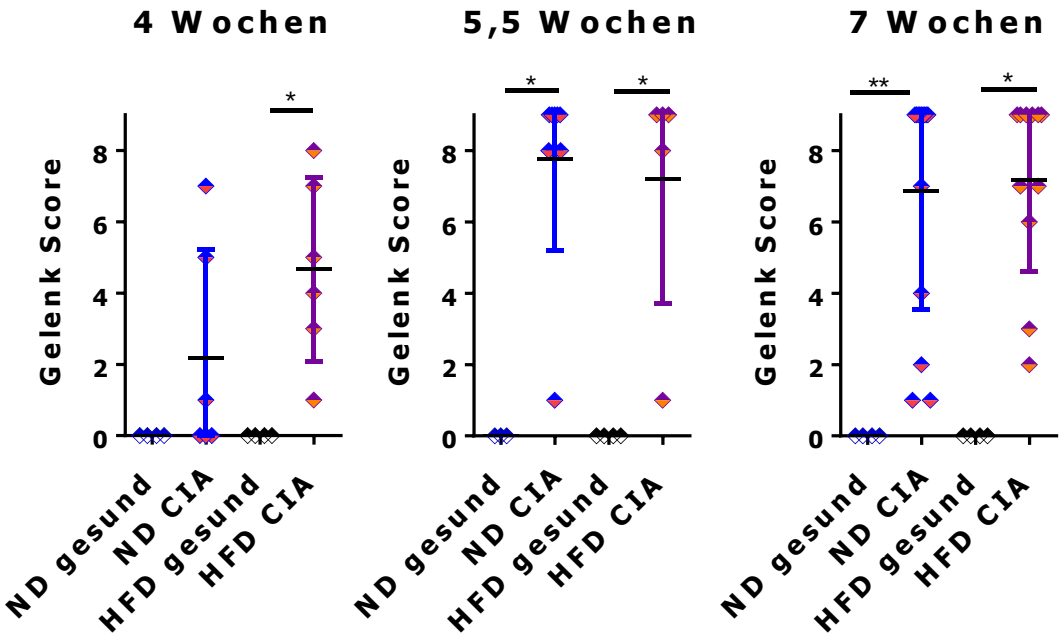

Abbildung 21: Darstellung des histologischen Gelenk-Scores (CIA-Score) der Versuchsgruppen. Gesunde Tiere zeigten sowohl bei HFD als auch bei ND keine Entzündungsaktivität. Im Gegensatz dazu kam es bei den CIA Tieren, vor allem 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung zu starken inflammatorischen Gelenkveränderungen (4 Wochen: HFD p = 0,0228, 5,5 Wochen: ND p = 0,0451; HFD p = 0,0474, 7 Wochen: ND p = 0,0080; HFD p = 0,0128). Interessanterweise zeigten HFD CIA Tiere zum 4 Wochenzeitpunkt einen deutlich höheren Gelenk-Score im Vergleich zu den ND CIA Tieren. In den beiden folgenden Zeitstadien zeigten sich jedoch nur noch geringfügige Unterschiede zwischen den CIA Tieren.

Interessanterweise zeigte sich bei ND CIA eine signifikante Zunahme (ausgehend von der 4 Wochen Gruppe) des Gelenk-Scores im Zeitverlauf (p = 0,0108, Abbildung 22). Dieser starke Anstieg 5,5 Wochen nach Immunisierung ließ sich bei den HFD CIA Tieren jedoch in diesem Maße nicht erkennen (Tabelle 18). Hier kam es zu einem

moderateren Anstieg, bei vergleichsweise höherer Entzündungsaktivität in der 4 Wochen Gruppe. Interessanterweise kam es bei ND CIA Tieren 7 Wochen nach erfolgter Immunisierung zu einer deutlich stärkeren Abnahme des Gelenk-Scores verglichen mit den HFD CIA Tieren (Tabelle 19).

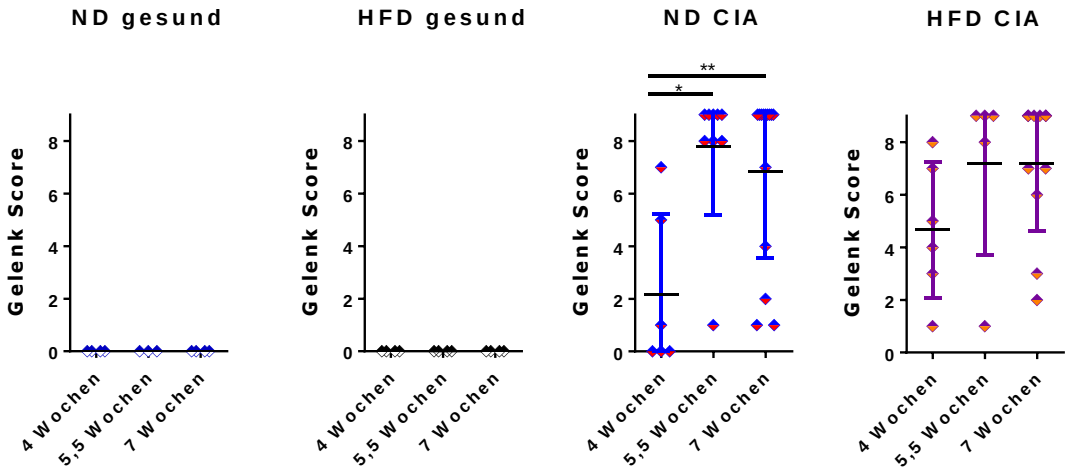

Abbildung 22: Gelenk-Score (CIA-Score) der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Gesunde Tiere zeigten über den gesamten Zeitverlauf keine Entzündungsaktivität. Bei den CIA Tieren kam bis zum 5,5 Wochenzeitpunkt zu einem deutlichen Anstieg des Scores, bei den ND CIA Tieren signifikant (4 Wochen ND CIA p = 0,0108, 5,5 Wochen ND CIA p = 0,0076). Interessanterweise war die Krankheitsremission bei ND CIA Tieren zum 7 Wochenzeitpunkt stärker ausgeprägt.

Tabelle 17: Gelenk-Score der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
4 Wochen	4	6	4	6
Tieranzahl pro Gruppe	0,0	0,0	0,0	1,000
Minimum [g]	0,0	0,0	0,0	2,500
25 % Perzentile	0,0	0,5000	0,0	4,500
Median [g]	0,0	5,500	0,0	7,250
75 % Perzentile	0,0	7,000	0,0	8,000
Maximum [g]	0,0	2,167	0,0	4,667
Mittelwert [g]	0,0	3,061	0,0	2,582
Standardabweichung	0,0	1,249	0,0	1,054

Tabelle 18: Gelenk-Score der Versuchsgruppen 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	0,0	1,000	0,0	1,000
25 % Perzentile	0,0	8,000	0,0	4,500
Median [g]	0,0	9,000	0,0	9,000
75 % Perzentile	0,0	9,000	0,0	9,000
Maximum [g]	0,0	9,000	0,0	9,000
Mittelwert [g]	0,0	7,778	0,0	7,200
Standardabweichung	0,0	2,587	0,0	3,493
Standardfehler des Mittelwertes	0,0	0,8625	0,0	1,562

Tabelle 19: Gelenk-Score der Versuchsgruppen 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	0,0	1,000	0,0	2,000
25 % Perzentile	0,0	3,500	0,0	6,000
Median [g]	0,0	9,000	0,0	9,000
75 % Perzentile	0,0	9,000	0,0	9,000
Maximum [g]	0,0	9,000	0,0	9,000
Mittelwert [g]	0,0	6,857	0,0	7,182
Standardabweichung	0,0	3,302	0,0	2,562
Standardfehler des Mittelwertes	0,0	0,8824	0,0	0,7725

3.3 Immunhistologische Färbungen

3.3.1 Leptin

Mithilfe von immunhistologischen Färbungen ließ sich eine Aussage über das Vorhandensein und die Quantität Adipokin exprimierender Zellen im lokalen Gelenk treffen. Um die Expression zu quantifizieren, wurden histologische Schnittbilder anhand eines Scores, wie in Methoden unter 2.3.1 und in Tabelle 6 und 7 dargestellt, beurteilt (Abbildung 23, 24). Der maximal erreichbare Score für die Färbung ist 8.

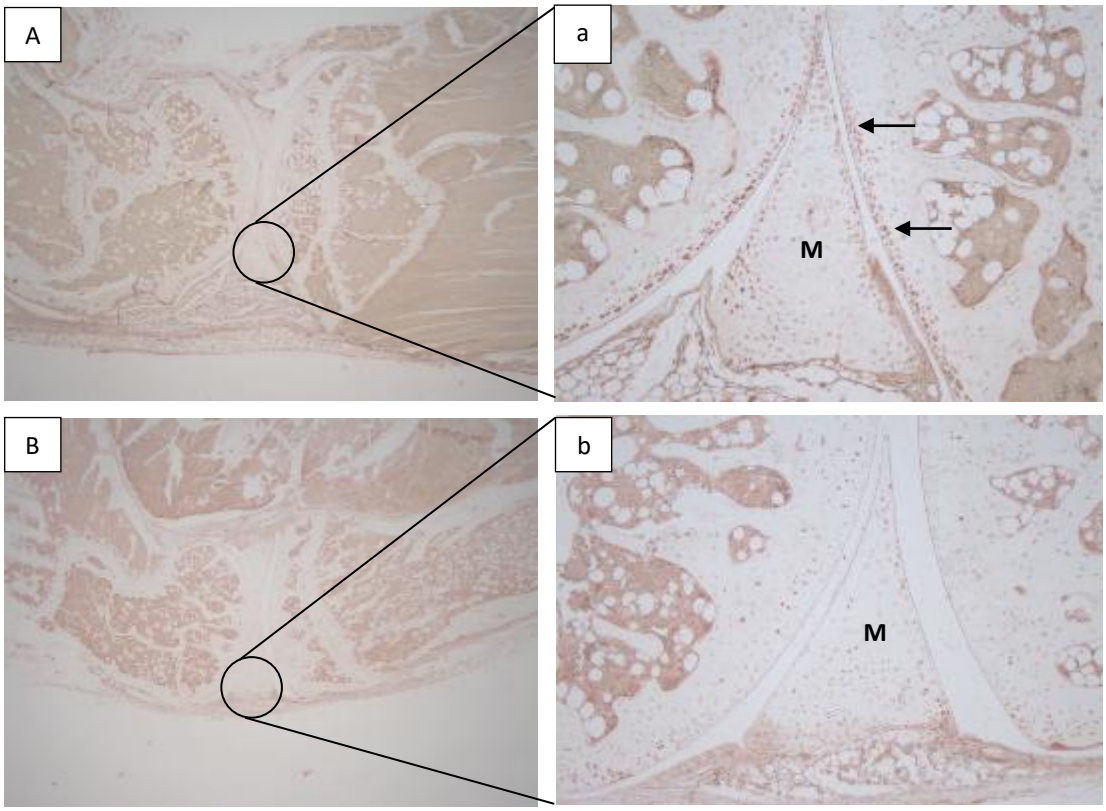

Abbildung 23: Immunhistologische Färbung des Kniegelenks eines gesunden HFD (A) und eines gesunden ND Tieres (B). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Leptin exprimierende Zellen in Meniskus (M) und im Gelenkknorpel (Pfeile) erkennen. Verglich man beide Vergrößerungen miteinander (a, b), so wiesen gesunde HFD Tiere (a) deutlich mehr Leptin exprimierende Zellen auf, als gesunde ND Tiere (b).

Betrachtete man zunächst die Expression von Leptin, Visfatin und Adiponektin im Vergleich, so fiel auf, dass die Expression von Leptin am stärksten ausgeprägt war, was sich ebenfalls in den Scores widerspiegelte. Der Leptin-Score ist in Abbildung 25 und 26 dargestellt.

4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung wiesen gesunde HFD Tiere vermehrt Leptin positive Zellen, im Vergleich zur gesunden ND Gruppe auf. Gleichermaßen war auch die Expression bei HFD CIA Tieren im Vergleich zu ND CIA Tieren erhöht.

In der 5,5 Wochen Gruppe waren keine Unterschiede hinsichtlich lokaler Leptin-Expression zwischen gesunden und erkrankten ND Tieren erkennbar. Wie bereits in der 4 Wochen Gruppe, hatten gesunde HFD Tieren höhere Leptin-Scores als gesunde ND Tiere (Abbildung 23). Interessanterweise kam es durch die CIA-Induktion bei HFD Tieren zu einer signifikanten Abnahme des Scores, im Vergleich zu gesunden HFD Kontrollgruppe ($p = 0{,}0368$, Tabelle 20, 21).

Zum Zeitpunkt Woche 7 zeigten sich erstmals Unterschiede zwischen gesunden und erkrankten ND Tieren (Tabelle 22). Letztere wiesen, wie bei HFD CIA Tieren, eine Reduktion der Leptin-Expression auf. In der HFD CIA Gruppe war diese Reduktion signifikant ($p = 0{,}0051$). Lediglich gesunde ND und HFD Tiere zeigten über den gesamten Zeitraum konstante Werte. Hier ließ sich vor allem die regelmäßig erhöhte Expression bei HFD Tieren im Vergleich zu ND Tieren hervorheben.

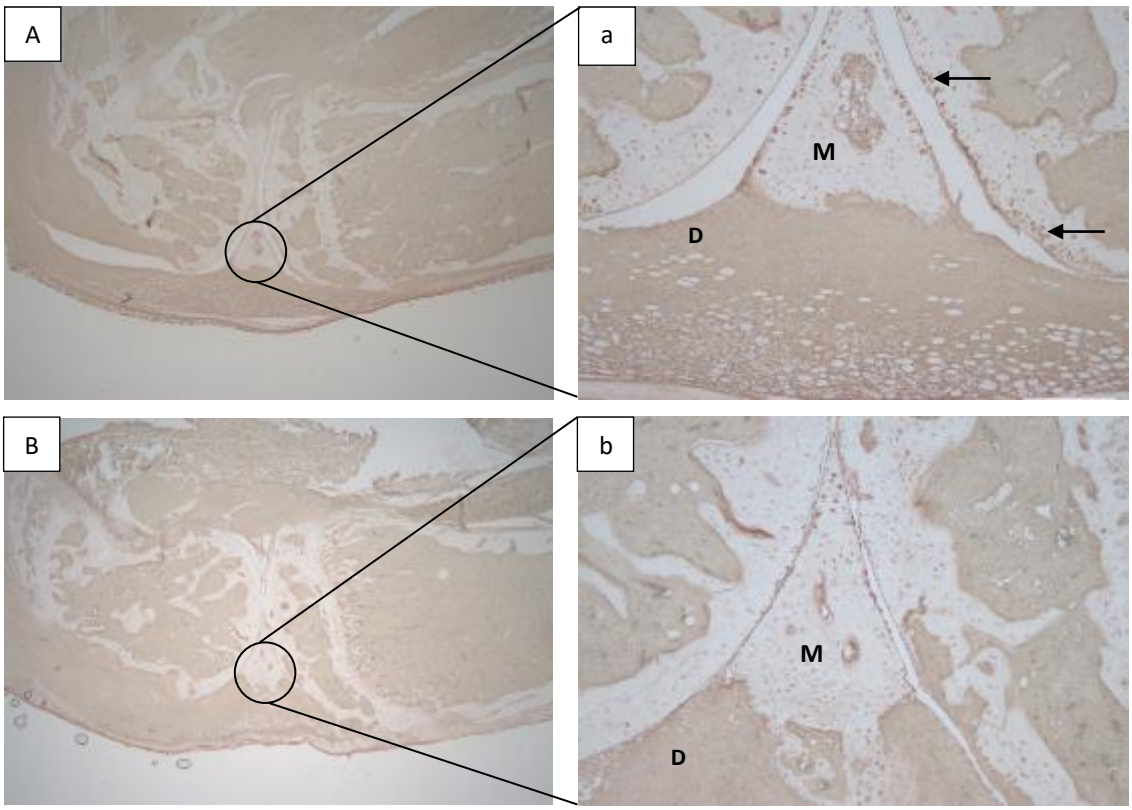

Abbildung 24: Immunhistologische Färbung des Kniegelenks eines erkrankten HFD (A) und eines erkrankten ND Tieres (B). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Leptin exprimierende Zellen in Meniskus (M) und im Gelenkknorpel (Pfeile) erkennen. Hyperplastische Deckzellschicht (D). Verglich man beide Vergrößerungen miteinander (a, b), so wiesen erkrankte ND Tiere (b) weniger Leptin exprimierende Zellen auf, als erkrankte HFD Tiere (a).

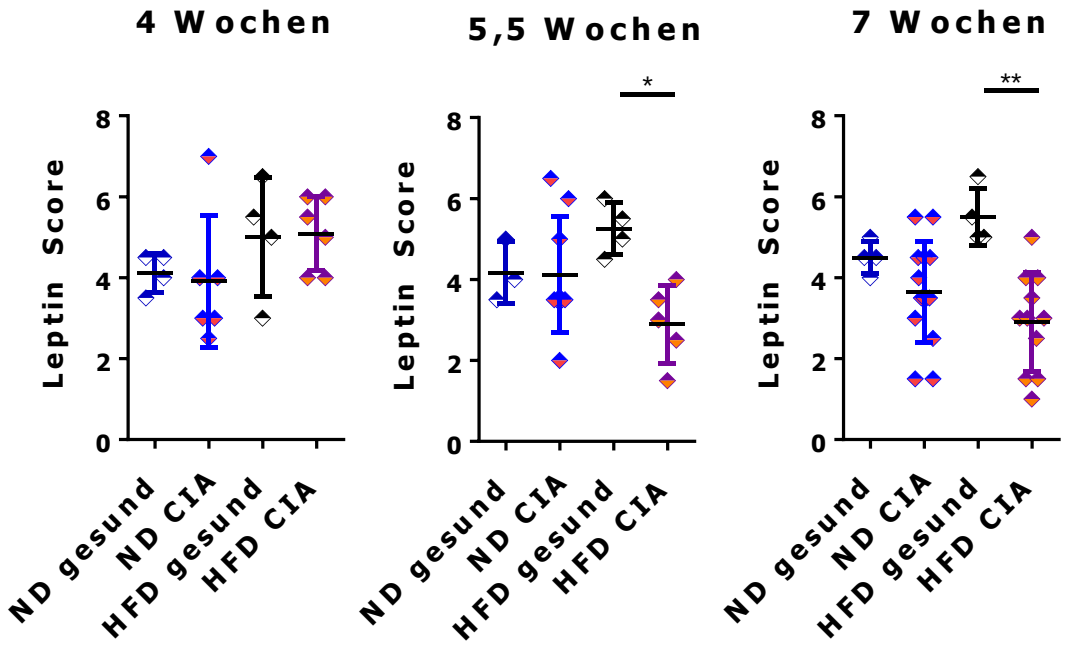

Abbildung 25: Leptin-Score der Versuchsgruppen. Anhand des Scores ließ sich die Expression von Leptin im Gelenk quantifizieren. Interessanterweise bewirkte die CIA-Induktion vor allem bei HFD Tieren 5,5 und 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung eine signifikante Reduktion der Leptin Expression im Gelenk (5,5 Wochen HFD p = 0,0368, 7 Wochen HFD p = 0,0051). Bei ND CIA Tieren war dieser Effekt lediglich in abgeschwächter Form zum 7 Wochenzeitpunkt erkennbar.

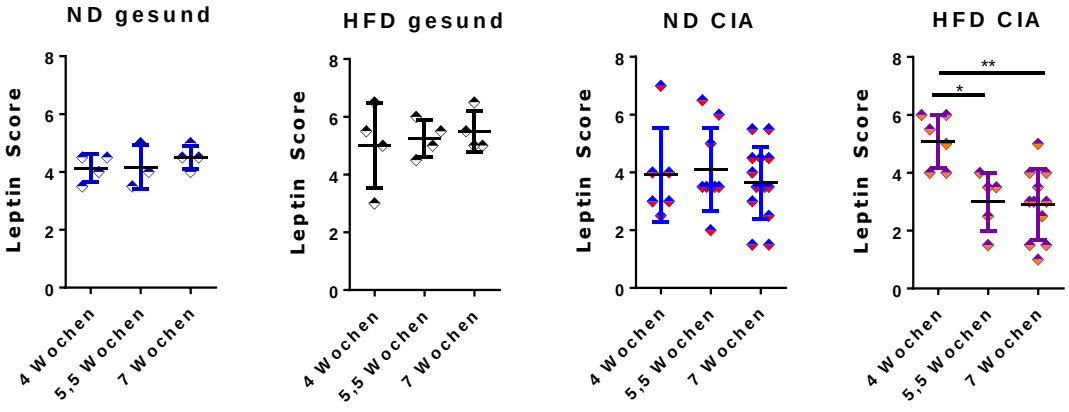

Abbildung 26: Leptin-Score der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Die Leptin-Expression der gesunden Kontrollgruppen nahm über den Zeitraum, vor allem bei HFD Tieren konstant zu. Außerdem wiesen gesunde HFD Tiere zu jedem Zeitpunkt mehr Leptin exprimierende Zellen, im Vergleich zu gesunden ND Tieren, auf. Die CIA-Induktion führte bei HFD Tieren zu einer signifikanten Abnahme der Leptin-Expression im Zeitverlauf (4 bis 5,5 Wochen p = 0,0446, 4 bis 7 Wochen p = 0,0076).

Tabelle 20: Leptin-Score der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erster Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	6	4	6
Minimum [g]	3,500	2,500	3,000	4,000
25 % Perzentile	3,625	2,875	3,500	4,000
Median [g]	4,250	3,500	5,250	5,250
75 % Perzentile	4,500	4,750	6,250	6,000
Maximum [g]	4,500	7,000	6,500	6,000
Mittelwert [g]	4,125	3,917	5,000	5,083
Standardabweichung	0,4787	1,625	1,472	0,9174
Standardfehler des Mittelwertes	0,2394	0,6635	0,7360	0,3745

Tabelle 21: Leptin-Score der Versuchsgruppen 5,5 Wochen nach erster Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	3,500	2,000	4,500	1,500
25 % Perzentile	3,500	3,500	4,625	2,000
Median [g]	4,000	3,500	5,250	3,000
75 % Perzentile	5,000	5,500	5,875	3,750
Maximum [g]	5,000	6,500	6,000	4,000
Mittelwert [g]	4,167	4,111	5,250	2,900
Standardabweichung	0,7638	1,431	0,6455	0,9618
Standardfehler des Mittelwertes	0,4410	0,4771	0,3227	0,4301

Tabelle 22: Leptin-Score der Versuchsgruppen 7 Wochen nach erster Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	4,000	1,500	5,000	1,000
25 % Perzentile	4,125	2,875	5,000	1,500
Median [g]	4,500	3,500	5,250	3,000
75 % Perzentile	4,875	4,500	6,250	4,000
Maximum [g]	5,000	5,500	6,500	5,000
Mittelwert [g]	4,500	3,643	5,500	2,909
Standardabweichung	0,4082	1,247	0,7071	1,221
Standardfehler des Mittelwertes	0,2041	0,3333	0,3536	0,3682

3.3.2 Visfatin

Die Beurteilung der Visfatin-Expression im Gelenk erfolgte, wie bei den anderen untersuchten Adipokinen, anhand des Visfatin-Scores, wie in Tabelle 6 und 7 beschrieben. Der Score ist in Abbildung 29 und in Abbildung 30 als Zeitverlauf dargestellt.

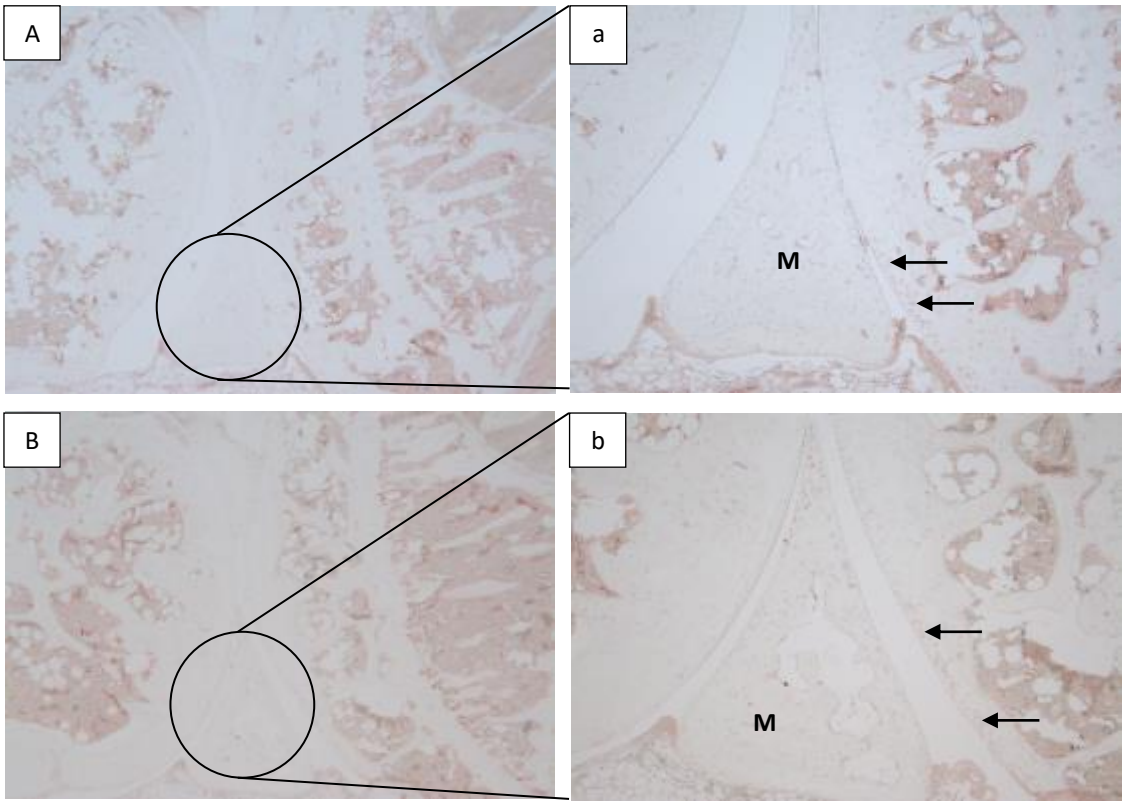

Abbildung 27: Immunhistologische Färbung des Kniegelenkes eines gesunden ND (A) und eines gesunden HFD Tieres (B). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Visfatin exprimierende Zellen in Meniskus (M) und im Gelenkknorpel (Pfeile) erkennen. In beiden Vergrößerungen (a, b) ließen sich einige angefärbte Zellen erkennen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen gesunden ND (a) und HFD (b) Tieren.

Insgesamt betrachtet, zeigte sich die Visfatin-Expression der gesunden Kontrollgruppen überwiegend konstant und unterlag nur geringfügigen Schwankungen. Zwischen den gesunden HFD und ND Tieren zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu ließ sich bei den erkrankten HFD Tieren zum 4 Wochenzeitpunkt eine signifikant höhere Visfatin-Expression, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe sowie zur ND CIA Gruppe feststellen (4 Wochen: HFD $p = 0,0289$, ND CIA $p = 0,0365$, Abbildung 28). Es zeigte sich jedoch, dass nach 5,5 Wochen die Anzahl Visfatin exprimierender Zellen bei HFD CIA Tieren wieder signifikant abnahm ($p = 0,0304$, Tabelle 23, 24). Interessanterweise kam es bei den ND

CIA Tieren zunächst zu einer leichten Zunahme von lokalem Visfatin, die jedoch 7 Wochen nach Immunisierung, wie bei HFD CIA Tieren, signifikant abnahm ($p = 0,0491$). Diese Kinetik wird durch die zeitliche Darstellung des Scores sehr deutlich (Abbildung 30). Auffallend ist, dass diese Kinetik schon bei der Quantifizierung des Leptins zu sehen war (Abbildung 26). Vergleichbar mit Leptin, kam es vor allem bei den HFD Tieren 5,5 und 7 Wochen nach erfolgter Immunisierung zu einer signifikanten Abnahme der Adipokin-Expression. Gleichermaßen zeigte sich bei ND CIA Tieren zunächst eine leichte Zunahme nach 5,5 Wochen, die jedoch zum 7 Wochen Zeitpunkt signifikant abnahm (Tabelle 25).

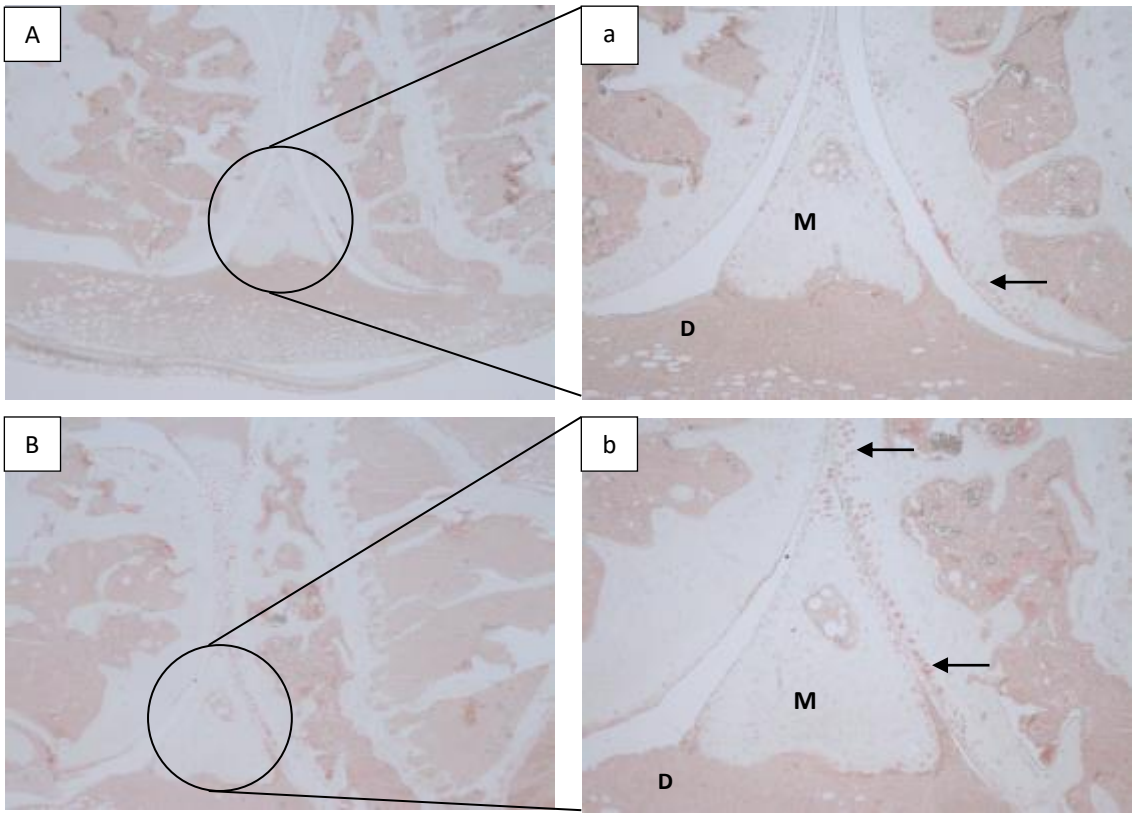

Abbildung 28: Immunhistologische Färbung des Kniegelenkes eines erkrankten ND (A) und eines erkrankten HFD Tieres (B). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Visfatin exprimierende Zellen in Meniskus (Meniskus) und im Gelenkknorpel (Pfeile) darstellen. Hyperplastische Deckzellschicht (D). In beiden Vergrößerungen (a, b) waren viele angefärbte Zellen zu erkennen, jedoch zeigten HFD CIA Tiere (B, b) wesentlich mehr Visfatin exprimierende Zellen.

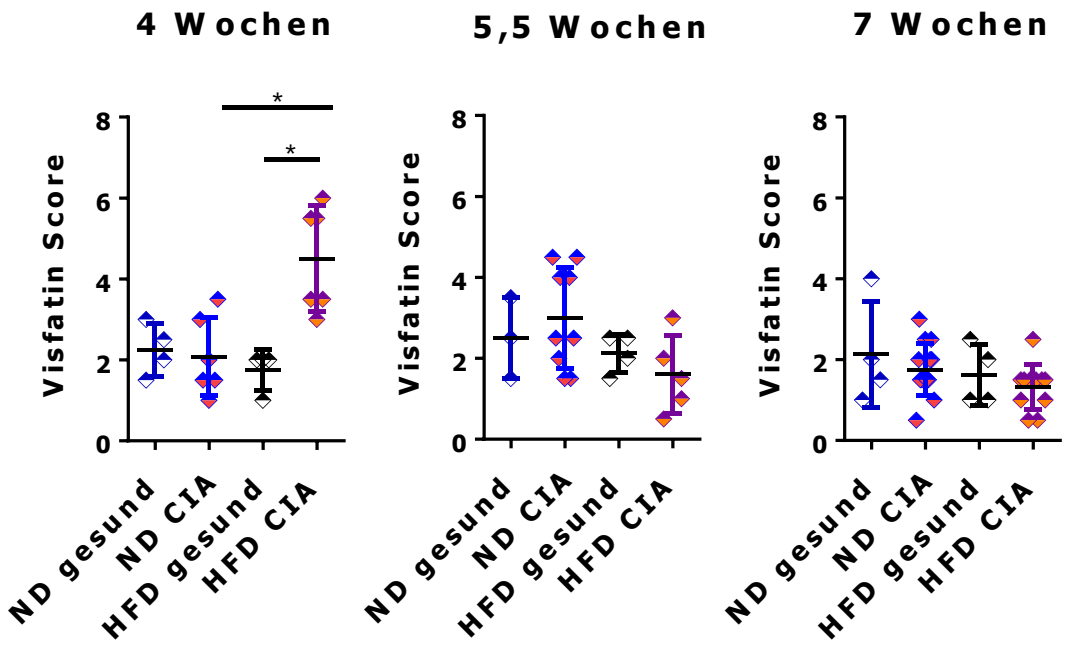

Abbildung 29: Visfatin-Score der Versuchsgruppen, der die lokale Visfatin-Expression im Gelenk veranschaulicht. Auffallend war hier die hohe Visfatin-Expression bei HFD CIA Tieren zum 4 Wochenzeitpunkt, die im weiteren Zeitverlauf signifikant abnahm (4 bis 5,5 Wochen p = 0,0304, 4 bis 7 Wochen p = 0,0014).

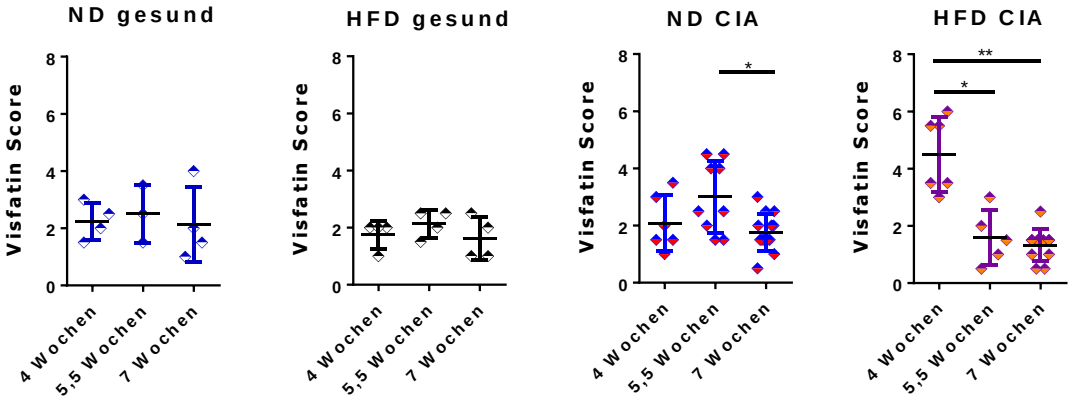

Abbildung 30: Visfatin-Score der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Zwischen den gesunden Kontrollgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, die jeweiligen Score Werte blieben über den gesamten Zeitverlauf überwiegend konstant. Interessanterweise kam es bei den ND CIA Tieren nach 5,5 Wochen zu einem leichten Anstieg der Visfatin-Expression, die jedoch zum 7 Wochenzeitpunkt signifikant abnahm (p = 0,0491). Die höchste Visfatin-Expression wiesen HFD CIA Tiere 4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung auf.

Tabelle 23: Visfatin-Score der Versuchsgruppen 4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	6	4	6
Minimum [g]	1,500	1,000	1,000	3,000
25 % Perzentile	1,625	1,375	1,250	3,375
Median [g]	2,250	1,750	2,000	4,500
75 % Perzentile	2,875	3,125	2,000	5,625
Maximum [g]	3,000	3,500	2,000	6,000
Mittelwert [g]	2,250	2,083	1,750	4,500
Standardabweichung	0,6455	0,9704	0,5000	1,304
Standardfehler des Mittelwertes	0,3227	0,3962	0,2500	0,5323

Tabelle 24: Visfatin-Score 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	1,500	1,500	1,500	0,5000
25 % Perzentile	1,500	1,750	1,625	0,7500
Median [g]	2,500	2,500	2,250	1,500
75 % Perzentile	3,500	4,250	2,500	2,500
Maximum [g]	3,500	4,500	2,500	3,000
Mittelwert [g]	2,500	3,000	2,125	1,600
Standardabweichung	1,000	1,250	0,4787	0,9618
Standardfehler des Mittelwertes	0,5774	0,4167	0,2394	0,4301

Tabelle 25: Visfatin-Score 7 Wochen nach erstmaliger Immunisierung.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	1,000	0,5000	1,000	0,5000
25 % Perzentile	1,125	1,500	1,000	1,000
Median [g]	1,750	1,500	1,500	1,500
75 % Perzentile	3,500	2,125	2,375	1,500
Maximum [g]	4,000	3,000	2,500	2,500
Mittelwert [g]	2,125	1,750	1,625	1,318
Standardabweichung	1,315	0,6430	0,7500	0,5600
Standardfehler des Mittelwertes	0,6575	0,1719	0,3750	0,1689

3.3.3 Adiponektin

Die Adiponektin-Expression im Gelenk wurde, wie bei den vorherigen Adipokinen, mithilfe des Adipokin-Scores (Tabelle 6 und 7) quantifiziert. Der Score ist in Abbildung 33 und Abbildung 34 als Zeitverlauf dargestellt.

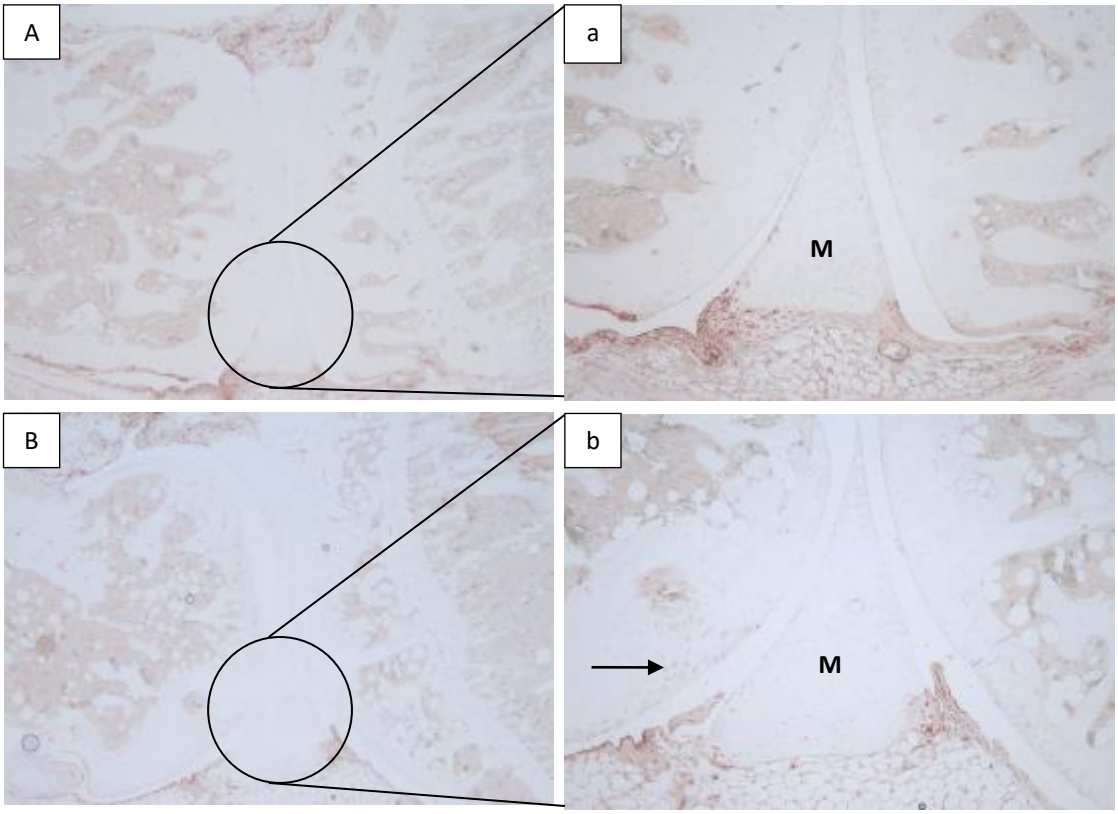

Abbildung 31: Immunhistologische Färbung des Kniegelenks eines gesunden ND (A) und eines gesunden HFD Tieres (B). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Adiponektin exprimierende Zellen in Meniskus (M) und im Gelenkknorpel (Pfeil) erkennen. In beiden Vergrößerungen (a, b) waren nur wenige angefärbte Zellen erkennen. Zwischen gesunden ND und HFD Tieren ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Die lokale Adiponektin-Expression war im Vergleich zur Leptin und Visfatin-Expression vor allem bei gesunden Tieren am geringsten ausgeprägt, was sich in den insgesamt niedrigen Score Werten widerspiegelte (Abbildung 31). Auffallend war jedoch, dass durch die Adiponektin Färbung, Bindegewebe am Meniskus Ursprung überwiegend stark angefärbt war, was sich am deutlichsten bei CIA Tieren zeigte (Abbildung 32).

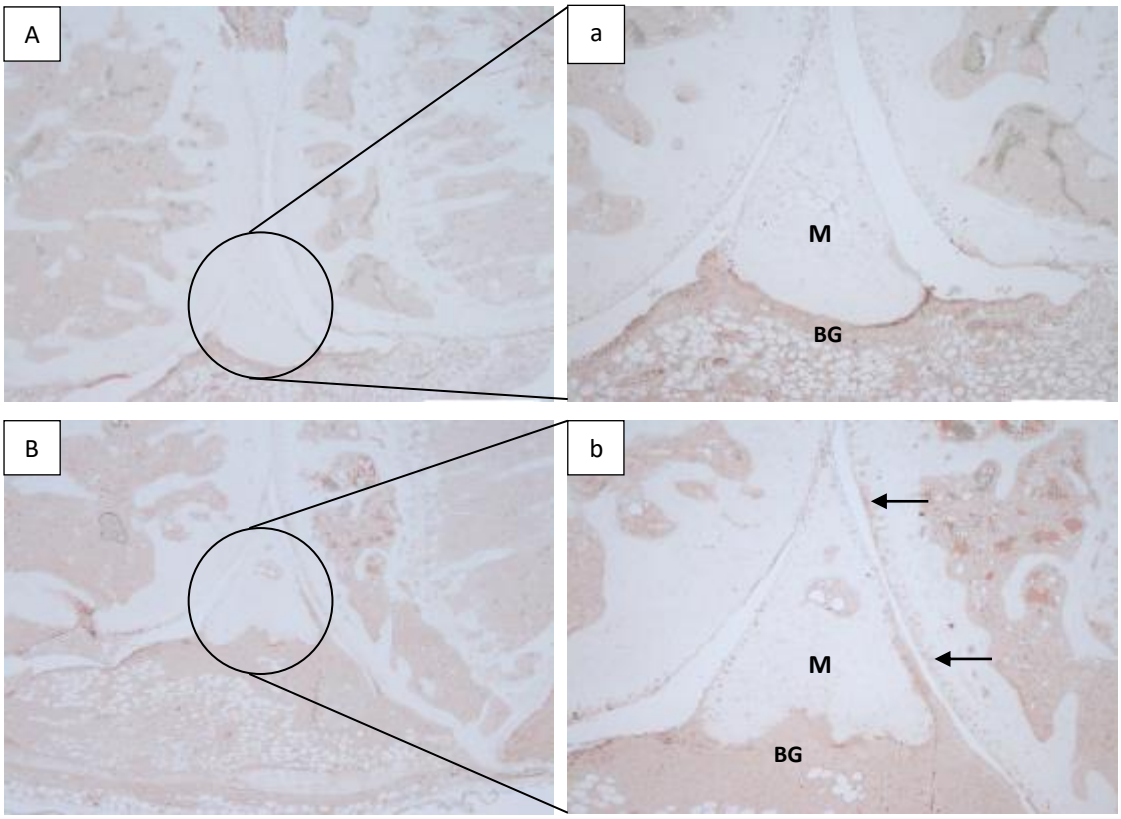

Abbildung 32: Immunhistologische Färbung des Kniegelenkes eines erkrankten ND (A) und eines erkrankten HFD Tieres (B) 4 Wochen nach erstmaliger Immunisierung. Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) ließen sich angefärbte, Adiponektin exprimierende Zellen in Meniskus (M) und im Gelenkknorpel (Pfeile) erkennen. HFD CIA Tiere zeigten deutlich mehr Adiponektin exprimierende Zellen (b), im Vergleich zu ND CIA Tieren (a). Außerdem fiel auf, dass sowohl bei ND als auch HFD CIA Tieren das Bindegewebe am Meniskus Ursprung (BG) wesentlich stärker angefärbt war, in Relation zu gesunden Tieren (Abbildung 26).

Betrachtete man zunächst die gesunden Kontrollgruppen, so zeigten sich zwischen gesunden HFD und ND Tieren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich lokaler Adiponektin-Expression. Gleichermaßen zeigten gesunde Tiere über den gesamten Zeitverlauf konstant niedrige Scores (Abbildung 34).

Interessanterweise wiesen, wie bei Leptin und Visfatin, HFD CIA Tiere zum 4 Wochenzeitpunkt eine signifikant höhere Adiponektin-Expression, in Relation zu gesunden HFD Tieren ($p = 0{,}0129$) sowie zu ND CIA Tieren auf ($p = 0{,}0437$, Tabelle 26, 27, 28). Zudem nahm über den Zeitverlauf der Adiponektin-Score bei HFD CIA Tieren signifikant ab (4 bis 7 Wochen $p = 0{,}0010$). Auch ND CIA Tieren zeigten wie bei Leptin und Visfatin, zunächst 5,5 Wochen nach Immunisierung eine leichte Zunahme und schließlich zum letzten Zeitpunkt eine Abnahme der Adiponektin-Expression (Abbildung 33).

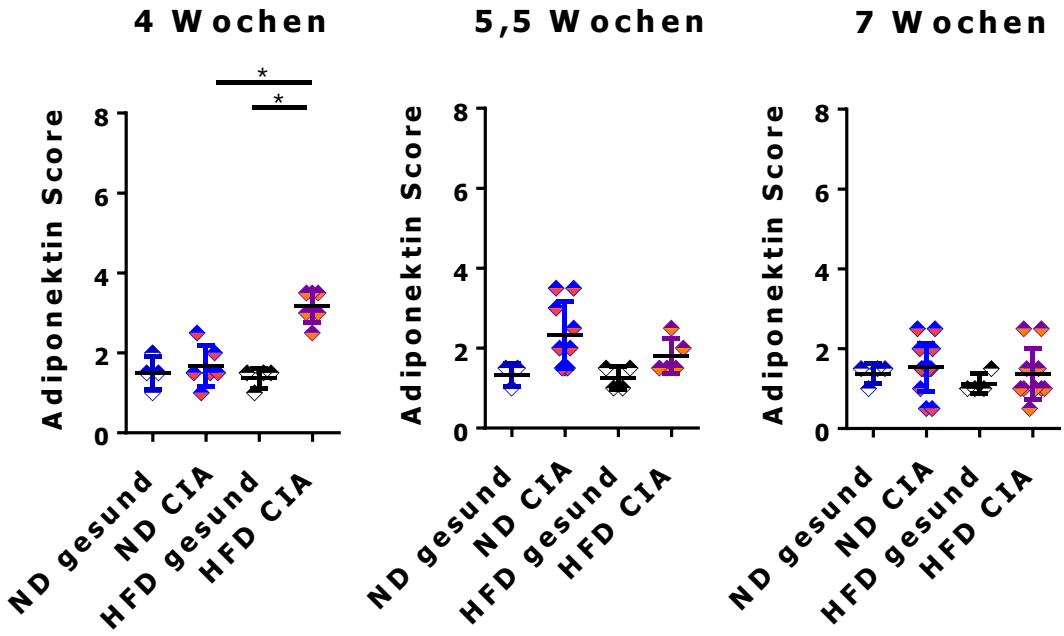

Abbildung 33: Adiponektin-Score der Versuchsgruppen zur Beurteilung lokaler Adiponektin-Expression im Gelenk. Interessanterweise wiesen HFD CIA Tiere zum 4 Wochenzeitpunkt signifikant höhere Score Werte als gesunde HFD (p = 0,0129) und erkrankte ND Tiere auf (p = 0,0437). ND CIA Tiere zeigten 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung eine leichte Zunahme, die jedoch wieder zum 7 Wochenzeitpunkt abnahm. Insgesamt betrachtet, ergaben die Auswertungen bei Adiponektin den geringsten Grad an lokaler Expression, im Vergleich zu Leptin und Visfatin.

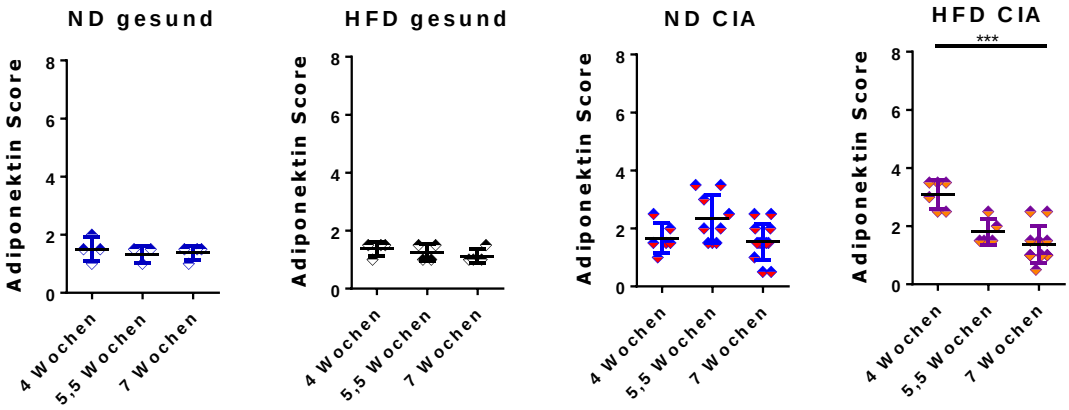

Abbildung 34: Adiponektin-Score der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Die Scores HFD und ND gesunder Tiere verliefen während des gesamten Zeitraums auf einem konstant niedrigen Niveau. Bei den HFD CIA Tieren kam es über den Zeitverlauf zu einer signifikanten Abnahme der Adiponektin-Expression im Gelenk (p = 0,0010).

Tabelle 26: Adiponektin-Score der Versuchsgruppen zum 4 Wochenzeitpunkt.

4 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	6	4	6
Minimum [g]	1,000	1,000	1,000	2,500
25 % Perzentile	1,125	1,375	1,125	2,875
Median [g]	1,500	1,500	1,500	3,250
75 % Perzentile	1,875	2,125	1,500	3,500
Maximum [g]	2,000	2,500	1,500	3,500
Mittelwert [g]	1,500	1,667	1,375	3,167
Standardabweichung	0,4082	0,5164	0,2500	0,4082
Standardfehler des Mittelwertes	0,2041	0,2108	0,1250	0,1667

Tabelle 27: Adiponektin-Score der Versuchsgruppen zum 5,5 Wochenzeitpunkt.

5,5 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	3	9	4	5
Minimum [g]	1,000	1,500	1,000	1,500
25 % Perzentile	1,000	1,500	1,000	1,500
Median [g]	1,500	2,000	1,250	1,500
75 % Perzentile	1,500	3,250	1,500	2,250
Maximum [g]	1,500	3,500	1,500	2,500
Mittelwert [g]	1,333	2,333	1,250	1,800
Standardabweichung	0,2887	0,8292	0,2887	0,4472
Standardfehler des Mittelwertes	0,1667	0,2764	0,1443	0,2000

Tabelle 28: Adiponektin-Score der Versuchsgruppen zum 7 Wochenzeitpunkt.

7 Wochen	ND gesund	ND CIA	HFD gesund	HFD CIA
Tieranzahl pro Gruppe	4	14	4	11
Minimum [g]	1,000	0,5000	1,000	0,5000
25 % Perzentile	1,125	1,375	1,000	1,000
Median [g]	1,500	1,500	1,000	1,000
75 % Perzentile	1,500	2,000	1,375	1,500
Maximum [g]	1,500	2,500	1,500	2,500
Mittelwert [g]	1,375	1,536	1,125	1,364
Standardabweichung	0,2500	0,6033	0,2500	0,6360
Standardfehler des Mittelwertes	0,1250	0,1612	0,1250	0,1918

3.3.4 Vimentin

Vimentin ist ein Intermediärfilament, dass vor allem in Zellen mesenchymalen Ursprungs, beispielsweise in Fibroblasten, exprimiert wird (Gilles et al. 1996). Um die invadierenden Zellen zu charakterisieren und mögliche Unterschiede zwischen entzündlichen und metabolisch induzierten Effekten zu analysieren, wurden immunhistologische Vimentin-Färbungen der Gelenke angefertigt. Es zeigte sich, dass die infiltrierenden Zellen Vimentin-positiv waren und daher als Zellen mesenchymalen Ursprungs charakterisiert werden konnten (Abbildung 35). Sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren waren keine Unterschiede durch die HFD-Induktion erkennbar.

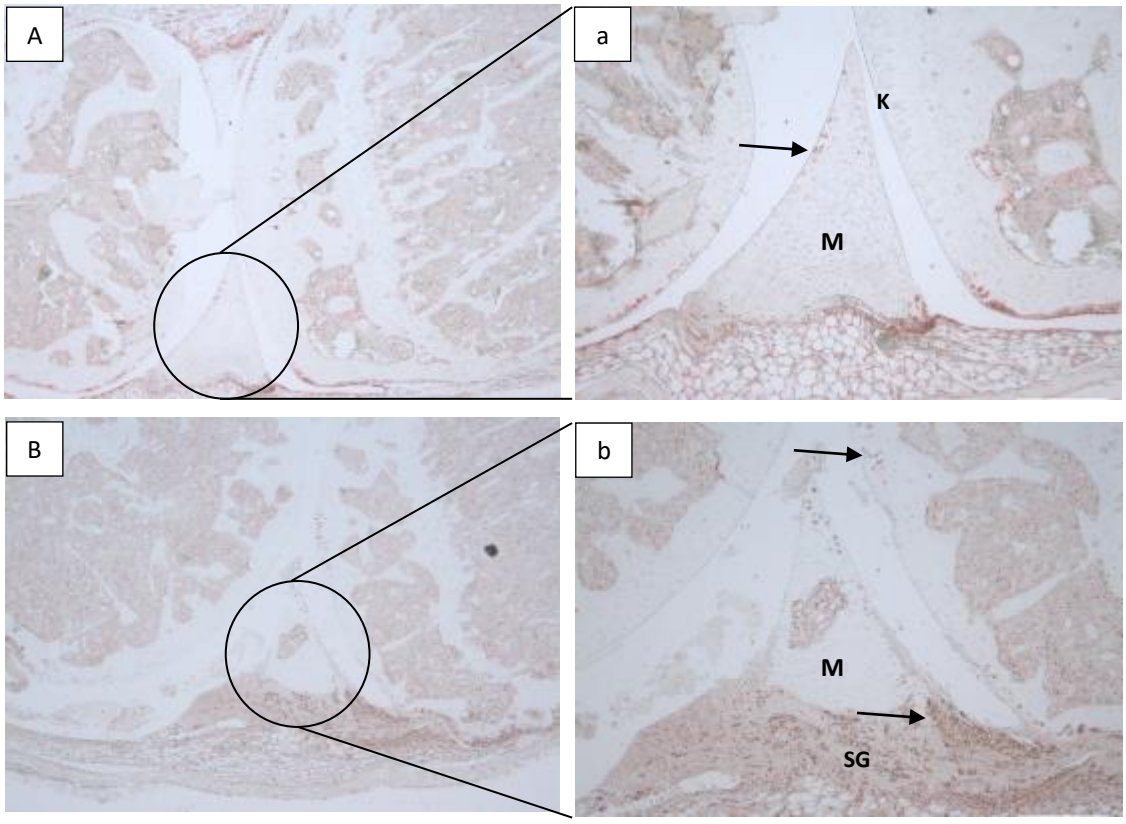

Abbildung 35: Immunhistologische Vimentin-Färbung muriner Kniegelenke. Darstellung eines gesunden ND Tieres (A) sowie eines erkrankten ND Tieres (B) 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung. Meniskus (M), oberflächliche Knorpelschicht (K). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) wurde deutlich, dass die infiltrierenden Zellen ins Synovialgewebe (SG), Vimentin-positiv (Pfeile) und somit mesenchymalen Ursprungs waren.

3.3.5 CD45

CD45 ist ein membranständiges Glykoprotein, dass eine Tyrosinphosphatase Aktivität besitzt und in immunologische Prozesse regulierend eingreifen kann. Das Protein wird vor allem in kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems und deren Vorläuferzellen, beispielsweise Leukozyten, Monozyten sowie B- und T-Zellen exprimiert (Rheinländer et al. 2018).

CD45 positive Zellen waren vor allem bei den CIA Tieren im Synovialgewebe erkennbar und bestätigten die Einwanderung von Leukozyten. Die HFD CIA Tiere unterschieden sich dabei nicht von den ND CIA Tieren (Abbildung 36).

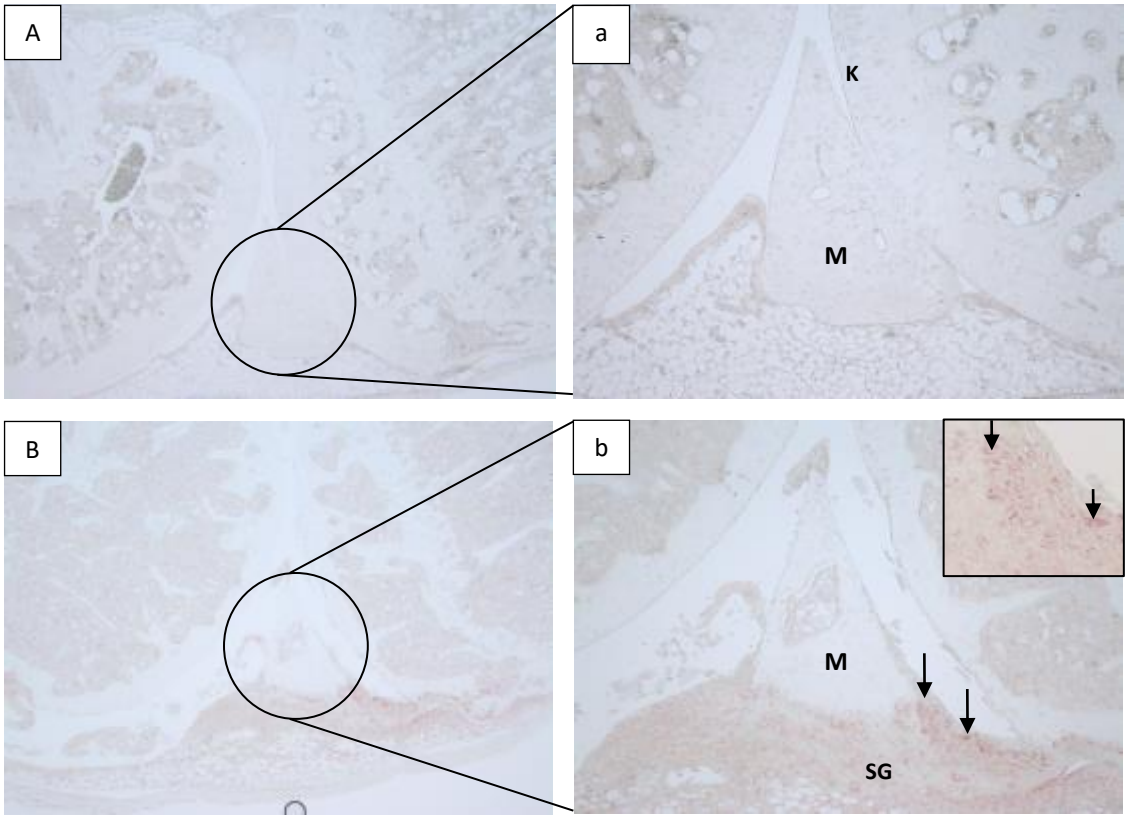

Abbildung 36: Immunhistologische CD45-Färbung muriner Kniegelenke. Darstellung eines gesunden ND Tieres (A) sowie eines erkrankten ND Tieres (B) 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung. Meniskus (M), oberflächliche Knorpelschicht (K). Anhand der jeweiligen Vergrößerungen (a, b) wurde deutlich, dass die infiltrierenden Zellen ins Synovialgewebe (SG) CD45-positiv und als Leukozyten charakterisiert werden konnten (Pfeile, Vergrößerung als Inset).

3.3.6 F4/80

Das F4/80 Molekül wird von murinen Makrophagen exprimiert (Dos Anjos Cassado 2017) und ermöglichte damit Schlussfolgerungen über das Vorhandensein und die Lokalisation von Makrophagen im Gelenk (Abbildung 37). Diese zeigten sich bei CIA Tieren vor allem im Synovialgewebe. Zwischen HFD und ND CIA Tieren ließen sich keine Unterschiede erkennen.

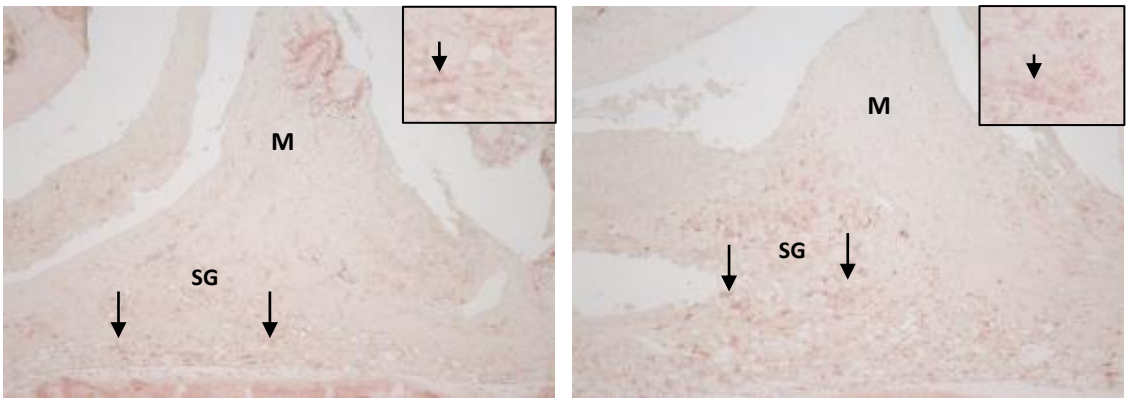

Abbildung 37: Darstellung immunhistologischer F4/80 Färbung eines Gelenkausschnitts bei einem erkrankten ND Tier zum (links) und einem erkrankten HFD Tier (rechts) 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung. Meniskus (M). Im Synovialgewebe (SG) zeigten sich viele F4/80 positive Zellen (Pfeile, Vergrößerungen als Inset), die folglich als Makrophagen identifiziert werden konnten. Zwischen ND und HFD CIA Tieren zeigten sich keine Unterschiede.

3.4 Serologie

3.4.1 Visfatin

Um neben der lokalen auch die systemische Expression und Reaktion sowohl auf die Arthritis als auch auf die induzierte Adipositas der Adipokine miteinander vergleichen zu können, wurden mittels ELISA systemische Konzentrationen der Adipokine Leptin, Adiponektin und Visfatin gemessen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Visfatin Serumkonzentrationen gezeigt, da die Konzentrationen für Leptin und Adiponektin bereits von Dr. Marie-Lisa Hülser untersucht wurden (Hülser 2019).

Betrachtete man zunächst die gesunden Gruppen, so hielten sich die Visfatin Konzentrationen 4 und 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung konstant (Abbildung 38, 39). Lediglich zum Zeitpunkt Woche 7 kam es zu einem leichten Anstieg der Messwerte. Zwischen ND und HFD gesunden Tieren ließen sich keine Unterschiede erkennen.

Die Arthritis-Induktion bewirkte bei den ND CIA Tieren eine deutliche Zunahme des systemischen Visfatins zum Zeitpunkt Woche 4, welche im Zeitverlauf auf einem relativ konstanten Niveau verblieb. Interessanterweise wiesen die ND CIA Tiere im ersten Zeitintervall signifikant höhere Messwerte als die korrespondierende HFD CIA Gruppe, auf ($p = 0{,}0305$). Nach 5,5 Wochen verhielten sich diese Konzentrationen jedoch invers, sodass HFD CIA Tiere signifikant höhere Visfatin Konzentrationen im Vergleich zu dem ND CIA Tieren aufwiesen ($p = 0{,}0212$). Im letzten Zeitintervall kam es schließlich zu einer Reduktion der Visfatin Konzentrationen bei sämtlichen erkrankten Tieren.

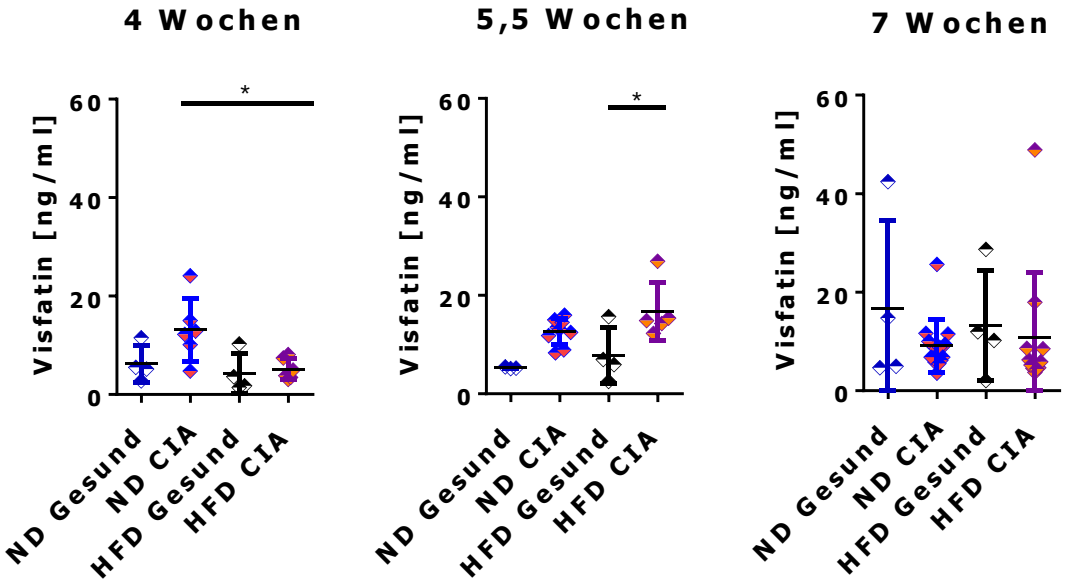

Abbildung 38: Darstellung serologischer Visfatin-Spiegel der Versuchsgruppen. Zwischen HFD und ND gesunden Tieren zeigten sich im gesamten Zeitverlauf keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise wiesen ND CIA Tiere zunächst signifikant höhere Visfatin-Spiegel auf (p = 0,0305), jedoch kam es 5,5 Wochen nach erstmaliger Immunisierung zu einer deutlichen Zunahme der Messwerte der HFD CIA Tiere (p = 0,0212).

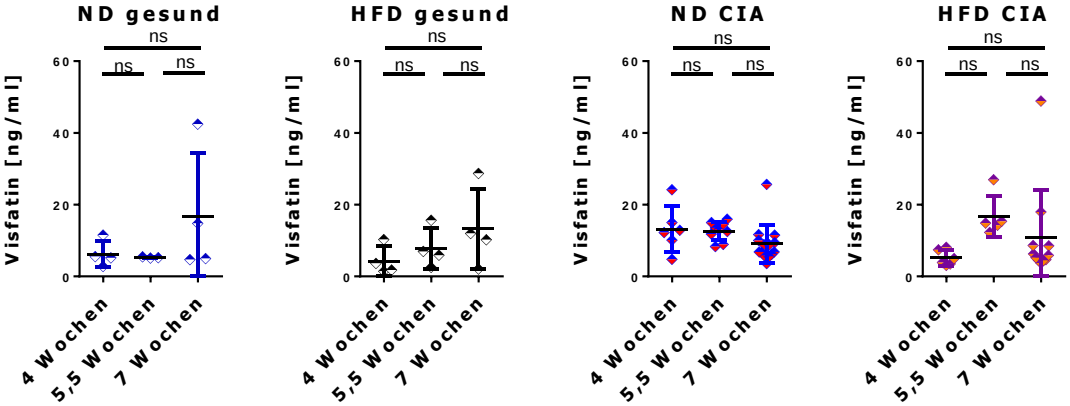

Abbildung 39: Darstellung serologischer Visfatin-Spiegel der Versuchsgruppen im Zeitverlauf. Die Serum-Visfatin-Konzentrationen der gesunden Tiere nahmen zum Zeitpunkt Woche 7 deutlich zu. Im Gegensatz dazu kam es bei den CIA Tieren eher zu einer Abnahme der Messwerte im letzten Zeitintervall. Es zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse.

3.5 Korrelationsanalysen

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den erhobenen Parametern analysieren zu können, erfolgte die Auswertung mittels linearer Regressionsanalyse sowie Rangkorrelation nach Spearman. Bei einem r^2-Wert (Bestimmtheitsmaß der linearen Regression) von über 0,3 wurde von einem statistischen Zusammenhang ausgegangen. Die Rangkorrelationen sind unter einem p-Wert von 0,05 bei zweiseitigem Signifikanztest signifikant. Die serologischen Messdaten der CRP-, Leptin- und Adiponektin-Spiegel wurden durch Frau Dr. Marie-Lisa Hülser erhoben (Hülser 2019), wurden jedoch im Rahmen dieser Arbeit mit den zusätzlich erhobenen Parametern in Korrelationsanalysen untersucht.

3.5.1 Körpergewicht

Die Messung des Körpergewichtes diente der Verifizierung metabolisch induzierter Veränderungen durch die Adipositas-Induktion. Das Körpergewicht korrelierte bei gesunden HFD Tieren mit den systemischen Leptin-Spiegeln ($r^2 = 0,35$, $p = 0,0022$, Abbildung 40). Außerdem zeigten gesunde HFD Tiere eine Korrelation zwischen Körpergewicht und Adiponektin-Score ($r^2 = 0,41$, $p = 0,0260$). Lediglich gesunde ND Tiere zeigten eine Korrelation zwischen Körpergewicht und Visfatin-Score ($r^2 = 0,44$).

Tabelle 29: Korrelationen des Körpergewichtes mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
Körpergewicht	Serum CRP	ND gesund	0,03280	-0,12730	0,71360
Körpergewicht	Serum Leptin	ND gesund	0,25280	0,41180	0,27070
Körpergewicht	Serum Adiponektin	ND gesund	0,07003	0,23640	0,48540
Körpergewicht	Serum Visfatin	ND gesund	0,00089	0,11820	0,73450
Körpergewicht	Leber-Score	ND gesund	0,00479	-0,04984	0,88600
Körpergewicht	CLS-Score	ND gesund	0,02205	-0,13240	0,69690
Körpergewicht	Leptin-Score	ND gesund	0,07800	0,30210	0,36430
Körpergewicht	**Visfatin-Score**	**ND gesund**	**0,44360**	0,65440	**0,03300**
Körpergewicht	Adiponektin-Score	ND gesund	0,23200	0,37310	0,26970
Körpergewicht	Serum CRP	HFD gesund	0,11500	0,44060	0,15420
Körpergewicht	**Serum Leptin**	**HFD gesund**	**0,35550**	0,81120	**0,00220**
Körpergewicht	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,00443	0,15760	0,62310
Körpergewicht	Serum Visfatin	HFD gesund	0,00411	0,00000	>0,9999
Körpergewicht	Leber-Score	HFD gesund	0,05871	0,22860	0,46970
Körpergewicht	CLS-Score	HFD gesund	0,00001	-0,02098	0,95600
Körpergewicht	Leptin-Score	HFD gesund	0,00819	-0,05388	0,87030
Körpergewicht	Visfatin-Score	HFD gesund	0,13770	-0,34600	0,27140
Körpergewicht	**Adiponektin-Score**	**HFD gesund**	**0,41120**	-0,67590	**0,02600**
Körpergewicht	Serum CRP	ND CIA	0,06704	-0,26540	0,16400
Körpergewicht	Serum Leptin	ND CIA	0,06961	0,46990	0,01340
Körpergewicht	Serum Adiponektin	ND CIA	0,04663	-0,20160	0,29440
Körpergewicht	Serum Visfatin	ND CIA	0,00487	0,03402	0,86090
Körpergewicht	Leber-Score	ND CIA	0,06804	0,25360	0,18430
Körpergewicht	CLS-Score	ND CIA	0,06449	-0,24660	0,19720
Körpergewicht	CIA-Score	ND CIA	0,03121	0,01450	0,86350
Körpergewicht	Leptin-Score	ND CIA	0,00004	-0,10940	0,57210
Körpergewicht	Visfatin-Score	ND CIA	0,01629	-0,19960	0,29920
Körpergewicht	Adiponektin-Score	ND CIA	0,00027	0,00713	0,97070
Körpergewicht	Serum CRP	HFD CIA	0,13190	0,27170	0,22130
Körpergewicht	**Serum Leptin**	**HFD CIA**	**0,59290**	0,84950	**<0,0001**
Körpergewicht	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,20140	-0,37840	0,08250
Körpergewicht	Serum Visfatin	HFD CIA	0,03637	0,01920	0,93240
Körpergewicht	Leber-Score	HFD CIA	0,00313	0,03816	0,15080
Körpergewicht	CLS-Score	HFD CIA	0,06149	0,31690	0,15080
Körpergewicht	CIA-Score	HFD CIA	0,04558	0,06420	0,79310
Körpergewicht	Leptin-Score	HFD CIA	0,11730	0,21180	0,34400
Körpergewicht	Visfatin-Score	HFD CIA	0,18830	0,17940	0,42450
Körpergewicht	Adiponektin-Score	HFD CIA	0,16550	0,28790	0,19390

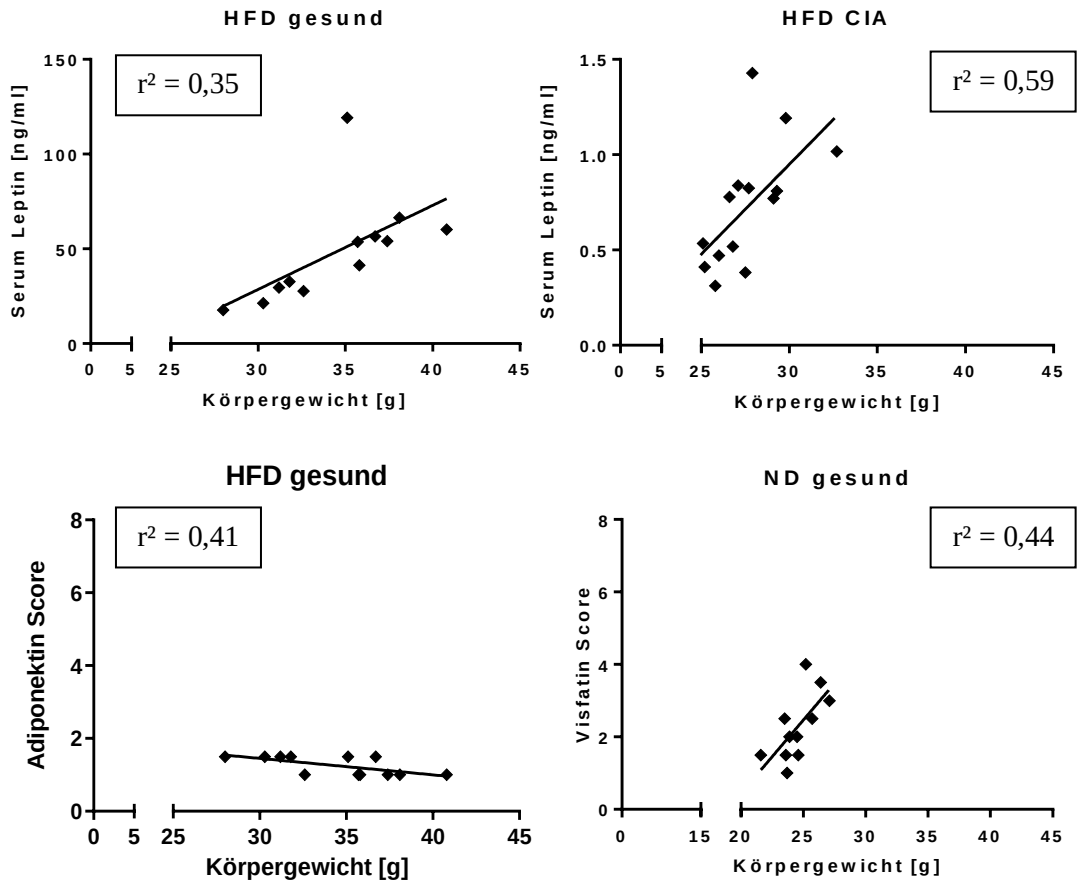

Abbildung 40: Korrelation bei gesunden HFD Tieren (links oben) und HFD CIA Tieren (rechts oben) zwischen Körpergewicht und systemischen Leptin-Spiegeln. Korrelation bei gesunden HFD und ND Tieren zwischen Adiponektin-Score (links unten) und Visfatin-Score (rechts unten) und dem Körpergewicht. Durch Zunahme des Gewichtes, kam es bei HFD Tieren auch zu einer Zunahme der systemischen Leptin-Konzentrationen im Serum. Zudem zeigten ND gesunde Tiere bei zunehmendem Körpergewicht auch eine höhere lokale Visfatin-Expression. Im Gegensatz dazu kam es bei HFD gesunden Tieren mit höherem Körpergewicht zu einer Abnahme der Adiponektin-Expression.

3.5.2 Leber-Score

Der Leber-Score diente in Ergänzung zum Körpergewicht der Quantifizierung metabolischer Veränderungen durch die Adipositas-Induktion. Interessanterweise zeigte die HFD-Induktion, vor allem bei gesunden HFD Tieren, positive korrelative Zusammenhänge zwischen Leber-Score und CRP-Serumspiegel ($r^2 = 0,44$, $p = 0,0083$, Abbildung 41) sowie zwischen Leber-Score und dem CLS-Score ($r^2 = 0,49$, $p = 0,0071$). Im Gegensatz dazu, konnten bei sämtlichen ND Tieren keine Korrelationen mit dem Leber-Score beobachtet werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Korrelationen des Leber-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
Leber-Score	Serum CRP	ND gesund	0,01332	0,09469	0,78330
Leber-Score	Serum Leptin	ND gesund	0,00100	-0,02496	0,94840
Leber-Score	Serum Adiponektin	ND gesund	0,07436	-0,19940	0,55300
Leber-Score	Serum Visfatin	ND gesund	0,24390	0,19940	0,55300
Leber-Score	CLS-Score	ND gesund	0,19990	-0,64590	0,03680
Leber-Score	Leptin-Score	ND gesund	0,07654	0,33380	0,30990
Leber-Score	Visfatin-Score	ND gesund	0,11810	-0,26780	0,42430
Leber-Score	Adiponektin-Score	ND gesund	0,00312	0,07013	0,88640
Leber-Score	**Serum CRP**	**HFD gesund**	**0,44470**	0,74510	**0,00830**
Leber-Score	Serum Leptin	HFD gesund	0,18090	0,46520	0,12880
Leber-Score	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,10960	-0,40280	0,19320
Leber-Score	Serum Visfatin	HFD gesund	0,00067	-0,15370	0,63080
Leber-Score	**CLS-Score**	**HFD gesund**	**0,49640**	0,75690	**0,00710**
Leber-Score	Leptin-Score	HFD gesund	0,00295	-0,02632	0,94270
Leber-Score	Visfatin-Score	HFD gesund	0,17130	-0,48150	0,12350
Leber-Score	Adiponektin-Score	HFD gesund	0,03846	0,19050	0,77270
Leber-Score	Serum CRP	ND CIA	0,21370	-0,51740	**0,00410**
Leber-Score	Serum Leptin	ND CIA	0,00624	0,04112	0,83860
Leber-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,07412	0,27560	0,14790
Leber-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,00473	-0,11060	0,56780
Leber-Score	CLS-Score	ND CIA	0,28750	-0,61670	**0,00040**
Leber-Score	Leptin-Score	ND CIA	0,00117	0,08637	0,65600
Leber-Score	Visfatin-Score	ND CIA	0,09704	-0,34800	0,06430
Leber-Score	Adiponektin-Score	ND CIA	0,03697	-0,16240	0,39980
Leber-Score	**Serum CRP**	**HFD CIA**	**0,37890**	-0,62850	**0,00170**
Leber-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,03293	0,19620	0,38160
Leber-Score	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,00550	0,09204	0,68370
Leber-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,00052	0,13810	0,54010
Leber-Score	CLS-Score	HFD CIA	0,20020	0,37480	0,08570
Leber-Score	Leptin-Score	HFD CIA	0,07532	-0,30210	0,17180
Leber-Score	Visfatin-Score	HFD CIA	0,20460	-0,46510	0,02920
Leber-Score	Adiponektin-Score	HFD CIA	0,17990	-0,44610	0,03740

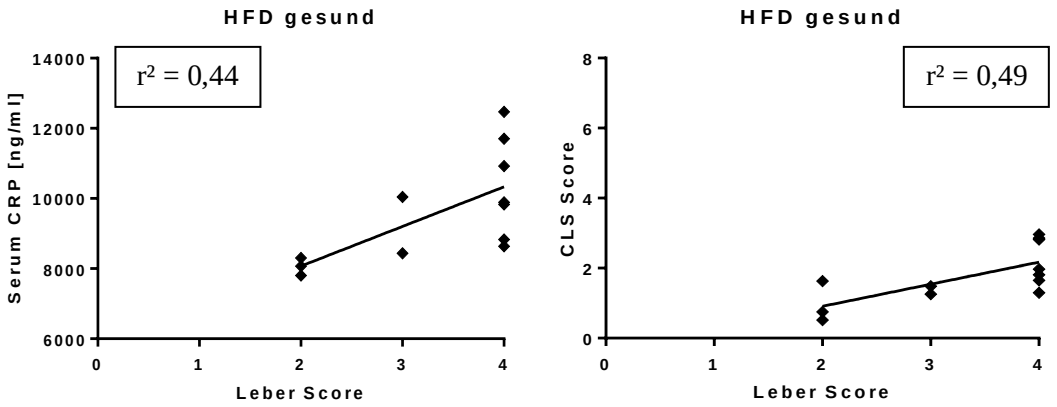

Abbildung 41: Korrelation zwischen Leber-Score und CRP-Serumspiegeln (links) sowie CLS-Score (rechts) bei gesunden HFD Tieren. Die positive Korrelation (r^2 = 0,44) zeigte einen korrelativen Zusammenhang zwischen dem Grad der Leberverfettung (Leber-Score) sowie systemischen CRP-Messwerten. Zudem zeigten HFD gesunde Tiere mit einem erhöhten Leberscore auch einen höheren CLS-Score und damit vermehrt infiltrierende Makrophagen in das Fettgewebe.

3.5.3 CLS-Score

Der CLS-Score beschreibt die Anzahl invadierender Makrophagen (CLS) in das Fettgewebe und lässt sich ferner als Indikator für inflammatorische Prozesse des Fettegewebes deuten. Wie bereits beschrieben, kam es bei gesunden HFD Tieren zu einer positiven Korrelation zwischen CLS-Score und Leber-Score (r^2 = 0,49 p = 0,0071), Abbildung 42). Des Weiteren zeigten sowohl gesunde HFD (r^2 = 0,41 p = 0,0202) als auch erkrankte ND Tiere (r^2 = 0,36, p = <0,0001) zwischen CLS-Score und systemischen CRP-Spiegeln einen korrelativen Zusammenhang (Tabelle 31).

Tabelle 31: Korrelationen des CLS-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
CLS-Score	Serum CRP	ND gesund	0,00251	-0,08219	0,81170
CLS-Score	Serum Leptin	ND gesund	0,03174	-0,14770	0,70170
CLS-Score	Serum Adiponektin	ND gesund	0,07392	0,04110	0,90780
CLS-Score	Serum Visfatin	ND gesund	0,00288	0,15530	0,64680
CLS-Score	Leber-Score	ND gesund	0,19990	-0,64590	0,03680
CLS-Score	**Leptin-Score**	**ND gesund**	**0,30520**	-0,59510	**0,04870**
CLS-Score	Visfatin-Score	ND gesund	0,03538	-0,06713	0,84400
CLS-Score	Adiponektin-Score	ND gesund	0,08798	0,29450	0,38110
CLS-Score	**Serum CRP**	**HFD gesund**	**0,41790**	0,67130	**0,02020**
CLS-Score	Serum Leptin	HFD gesund	0,03224	0,20280	0,52800
CLS-Score	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,00162	-0,09107	0,77820
CLS-Score	Serum Visfatin	HFD gesund	0,00747	-0,04196	0,90390
CLS-Score	**Leber-Score**	**HFD gesund**	**0,49640**	0,75690	**0,00710**
CLS-Score	Leptin-Score	HFD gesund	0,04744	-0,10060	0,75500
CLS-Score	Visfatin-Score	HFD gesund	0,18460	-0,54480	0,07170
CLS-Score	Adiponektin-Score	HFD gesund	0,03033	0,19310	0,58870
CLS-Score	**Serum CRP**	**ND CIA**	**0,36000**	0,67110	**<0,0001**
CLS-Score	Serum Leptin	ND CIA	0,00066	0,12620	0,53050
CLS-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,26840	-0,46780	**0,01050**
CLS-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,10390	0,43170	**0,01940**
CLS-Score	Leber-Score	ND CIA	0,28750	-0,61670	**0,00040**
CLS-Score	Leptin-Score	ND CIA	0,00268	-0,03633	0,85160
CLS-Score	Visfatin-Score	ND CIA	0,05640	0,22710	0,23610
CLS-Score	Adiponektin-Score	ND CIA	0,00000	0,10060	0,60350
CLS-Score	Serum CRP	HFD CIA	0,03759	0,29080	0,18920
CLS-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,00798	0,20500	0,36020
CLS-Score	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,09006	-0,40260	0,06320
CLS-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,04699	-0,12140	0,59050
CLS-Score	Leber-Score	HFD CIA	0,20020	0,37490	0,08570
CLS-Score	Leptin-Score	HFD CIA	0,03080	0,20320	0,36440
CLS-Score	Visfatin-Score	HFD CIA	0,00572	0,07080	0,75420
CLS-Score	Adiponektin-Score	HFD CIA	0,03395	0,23910	0,28390

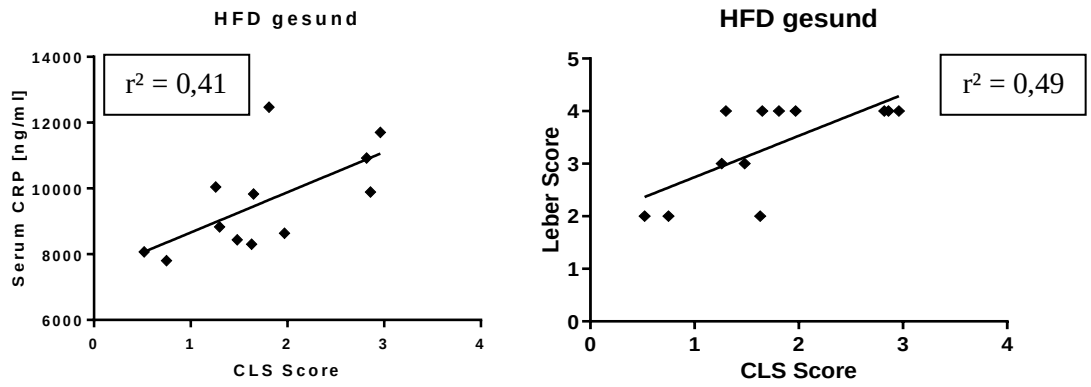

Abbildung 42: Korrelation zwischen zwischen CLS-Score und CRP-Serumspiegeln (links) sowie CLS-Score und Leber-Score (links) bei gesunden HFD Tieren. Die Anzahl der invadierenden CLS ins Fettgewebe verhielt sich proportional zur Serumkonzentration von CRP (r^2 = 0,41) und zum Leber-Score (r^2 = 0,49) bei gesunden HFD Tieren.

3.5.4 Gelenk-Score

Mithilfe des Gelenk-Scores (CIA Scores) konnte das Ausmaß entzündlicher Veränderungen innerhalb der murinen Gelenke evaluiert werden. Interessanterweise konnte jedoch nur für HFD CIA Tiere ein korrelativer Zusammenhang zwischen CIA-Score und CRP-Serumkonzentration beobachtet werden (r^2 = 0,32 p = 0,0064, Abbildung 43). Für ND CIA Tiere ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht darstellen (r^2 = 0,07, Tabelle 32).

Tabelle 32: Korrelationen des Gelenk-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen (r^2 > 0,3 sowie p < 0,05 fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
CIA-Score	Serum CRP	ND CIA	0,07184	-0,36840	0,05130
CIA-Score	Serum Leptin	ND CIA	0,00027	-0,20930	0,29460
CIA-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,00598	0,24450	0,20110
CIA-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,05805	-0,24890	0,19290
CIA-Score	Leber-Score	ND CIA	0,00039	0,14720	0,44610
CIA-Score	CLS-Score	ND CIA	0,12920	-0,34180	0,06960
CIA-Score	Leptin-Score	ND CIA	0,01579	-0,28610	0,13240
CIA-Score	Visfatin-Score	ND CIA	0,02651	-0,03897	0,84090
CIA-Score	Adiponektin-Score	ND CIA	0,15490	0,33230	0,07820
CIA-Score	**Serum CRP**	**HFD CIA**	**0,32560**	-0,56260	**0,00640**
CIA-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,01827	-0,28130	0,20470
CIA-Score	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,06868	0,26550	0,23240
CIA-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,00080	0,12190	0,58890
CIA-Score	Leber-Score	HFD CIA	0,02753	0,24040	0,28120
CIA-Score	CLS-Score	HFD CIA	0,01468	-0,10900	0,62920
CIA-Score	Leptin-Score	HFD CIA	0,24220	-0,59390	**0,00360**
CIA-Score	Visfatin-Score	HFD CIA	0,21710	-0,61450	**0,00230**
CIA-Score	Adiponektin-Score	HFD CIA	0,12980	-0,45480	**0,03350**

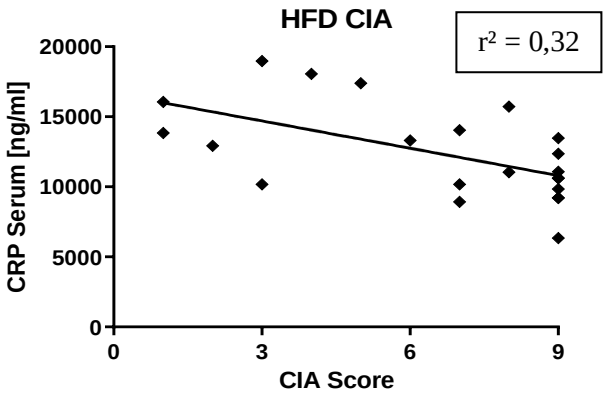

Abbildung 43: Korrelation zwischen CIA-Score und CRP-Serumspiegeln bei HFD CIA Tieren. Es zeigte sich ein inverser Zusammenhang, sodass bei zunehmenden CIA-Scores, die CRP-Konzentrationen abnahmen (r^2 = 0,32).

3.5.5 Leptin-Score

Die lokale Leptin-Expression wurde anhand des Leptin-Scores quantifiziert und erlaubte den Vergleich mit den serologisch gemessenen Leptin Konzentrationen. Auffallend war, dass bei allen Tieren, zu allen Zeitpunkten, keine Korrelation zwischen Leptin-Score und systemisch gemessenen Leptin-Spiegeln festgestellt werden konnte. Gleiches galt für den Vergleich zwischen Leptin-Score und systemisch gemessenen Adiponektin- und Visfatin-Spiegeln (Tabelle 33).

Im Gegensatz dazu, ließ sich zwischen Leptin-Score und Visfatin-Score bei allen Tieren eine Korrelation feststellen (gesund ND r^2 = 0,30; gesund HFD r^2 = 0,39; CIA ND r^2 = 0,34; CIA HFD r^2 = 0,67; Abbildung 44). Außerdem zeigte sich bei HFD CIA Tieren ein positiver korrelativer Zusammenhang zwischen Leptin-Score und Adiponektin-Score (r^2 = 0,54, p = 0,0003). Des Weiteren korrelierten Leptin-Score mit CRP-Serumspiegeln bei HFD CIA Tieren (r^2 = 0,45, p = 0,0026).

Tabelle 33: Korrelationen des Leptin-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
Leptin-Score	Serum CRP	ND gesund	0,05827	-0,12270	0,71890
Leptin-Score	Serum Leptin	ND gesund	0,23490	0,65530	0,05890
Leptin-Score	Serum Adiponektin	ND gesund	0,04115	-0,13220	0,69750
Leptin-Score	Serum Visfatin	ND gesund	0,01842	-0,25490	0,44650
Leptin-Score	Leber-Score	ND gesund	0,07654	0,33380	0,30990
Leptin-Score	**CLS-Score**	**ND gesund**	**0,30520**	-0,59510	**0,04930**
Leptin-Score	**Visfatin-Score**	**ND gesund**	**0,30890**	0,45950	0,15450
Leptin-Score	Adiponektin-Score	ND gesund	0,09343	-0,34870	0,24850
Leptin-Score	Serum CRP	HFD gesund	0,00768	0,24070	0,44870
Leptin-Score	Serum Leptin	HFD gesund	0,01302	-0,14370	0,65410
Leptin-Score	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,00272	-0,05217	0,87190
Leptin-Score	Serum Visfatin	HFD gesund	0,07419	0,44180	0,15170
Leptin-Score	Leber-Score	HFD gesund	0,00295	-0,02632	0,9427
Leptin-Score	CLS-Score	HFD gesund	0,04744	-0,10060	0,75550
Leptin-Score	**Visfatin-Score**	**HFD gesund**	**0,39340**	0,63160	**0,03120**
Leptin-Score	Adiponektin-Score	HFD gesund	0,13680	-0,32240	0,32250
Leptin-Score	Serum CRP	ND CIA	0,00027	-0,05712	0,76850
Leptin-Score	Serum Leptin	ND CIA	0,20490	0,30200	0,12570
Leptin-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,02849	-0,08192	0,67270
Leptin-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,13210	0,12620	0,51430
Leptin-Score	Leber-Score	ND CIA	0,00117	0,08637	0,65600
Leptin-Score	CLS Score	ND CIA	0,00268	-0,03633	0,85160
Leptin-Score	**Visfatin-Score**	**ND CIA**	**0,34400**	0,47720	**0,00890**
Leptin-Score	Adiponektin-Score	ND CIA	0,16000	0,25070	0,18970
Leptin-Score	**Serum CRP**	**HFD CIA**	**0,45700**	0,60910	**0,00260**
Leptin-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,01186	0,07135	0,75240
Leptin-Score	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,19560	-0,42070	0,05120
Leptin-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,00068	-0,08562	0,70480
Leptin-Score	Leber-Score	HFD CIA	0,07532	-0,30210	0,17180
Leptin-Score	CLS Score	HFD CIA	0,03080	0,20320	0,36440
Leptin-Score	**Visfatin-Score**	**HFD CIA**	**0,67350**	0,83740	**<0,0001**
Leptin-Score	**Adiponektin-Score**	**HFD CIA**	**0,54930**	0,69600	**0,0003**

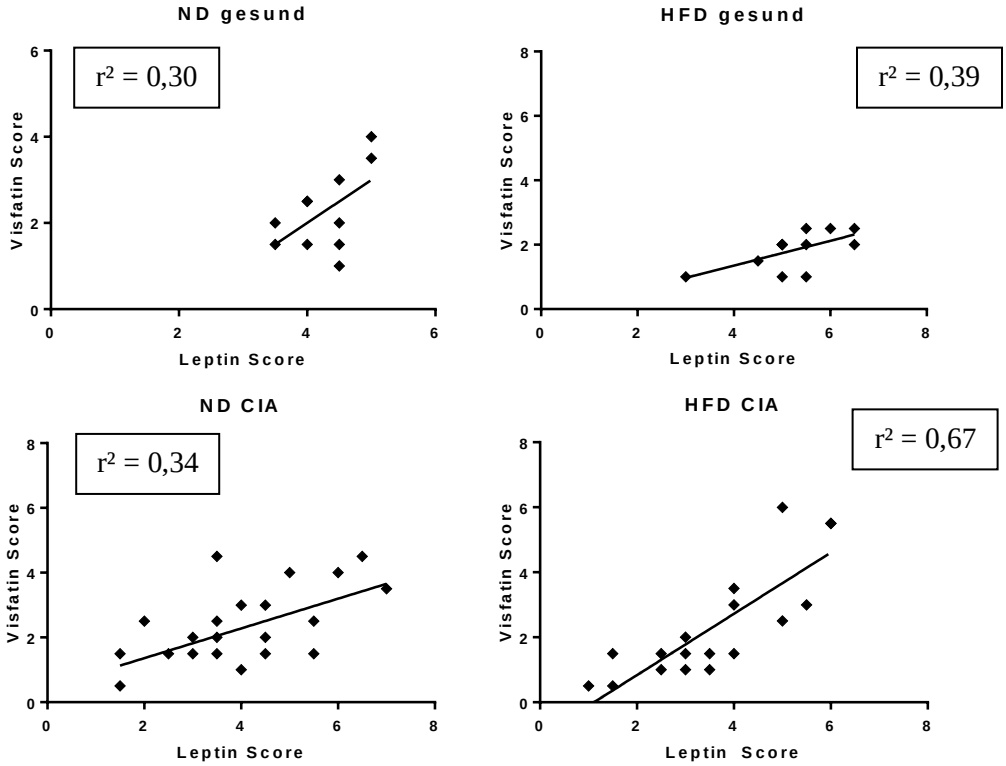

Abbildung 44: Darstellung der Korrelationen zwischen Leptin-Score und Visfatin-Score aller Versuchsgruppen. Bei HFD CIA Tieren war dieser Zusammenhang am stärksten ausgeprägt ($r^2 = 0,67$).

3.5.6 Visfatin-Score

Die lokale Visfatin-Expression verhielt sich ähnlich zur lokalen Leptin-Expression, was durch die bereits beschriebenen Korrelationen verdeutlicht wurde. Gleichermaßen ließen sich zwischen Visfatin-Score und systemischen Visfatin-Spiegeln sowie Adiponektin-Spiegeln bei keiner der Versuchsgruppen eine Korrelation feststellen (Tabelle 34). Lediglich gesunde HFD Tiere wiesen eine Korrelation zwischen Visfatin-Score und systemischen Leptin-Konzentrationen auf ($r^2 = 0,42$, $p = 0,0290$). Auffallend war die hohe Korrelation zwischen lokaler Visfatin und Adiponektin-Expression bei HFD CIA Tieren ($r^2 = 0,70$ $p = <0,0001$; Abbildung 45). Des Weiteren zeigte der Vergleich von Visfatin-Score mit den systemischen CRP-Werten bei HFD CIA Tieren einen korrelativen Zusammenhang ($r^2 = 0,65$, $p = 0,0002$).

Tabelle 34: Korrelationen des Visfatin-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
Visfatin-Score	Serum CRP	ND gesund	0,01992	-0,10140	0,76760
Visfatin-Score	Serum Leptin	ND gesund	0,26970	0,53650	0,13780
Visfatin-Score	Serum Adiponektin	ND gesund	0,01692	0,25810	0,44100
Visfatin-Score	Serum Visfatin	ND gesund	0,03266	-0,15210	0,65380
Visfatin-Score	Leber-Score	ND gesund	0,11810	-0,26780	0,42430
Visfatin-Score	CLS-Score	ND gesund	0,03538	-0,06713	0,84400
Visfatin-Score	**Leptin-Score**	**ND gesund**	**0,30980**	0,45950	0,15450
Visfatin-Score	Adiponektin-Score	ND gesund	0,07565	0,34590	0,29770
Visfatin-Score	Serum CRP	HFD gesund	0,16560	-0,36080	0,25010
Visfatin-Score	**Serum Leptin**	**HFD gesund**	**0,42840**	-0,64060	**0,02900**
Visfatin-Score	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,06540	-0,02581	0,94020
Visfatin-Score	Serum Visfatin	HFD gesund	0,04297	0,08099	0,80790
Visfatin-Score	Leber-Score	HFD gesund	0,17130	-0,48150	0,12350
Visfatin-Score	CLS-Score	HFD gesund	0,18460	-0,54480	0,07170
Visfatin-Score	**Leptin-Score**	**HFD gesund**	**0,39340**	0,63160	**0,03120**
Visfatin-Score	Adiponektin-Score	HFD gesund	0,02273	-0,15250	0,69910
Visfatin-Score	Serum CRP	ND CIA	0,00582	0,19130	0,32010
Visfatin-Score	Serum Leptin	ND CIA	0,26110	0,34170	0,08110
Visfatin-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,02306	-0,08638	0,65590
Visfatin-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,06144	-0,08638	0,65590
Visfatin-Score	Leber-Score	ND CIA	0,09704	-0,34800	0,06430
Visfatin-Score	CLS-Score	ND CIA	0,05640	0,22710	0,23610
Visfatin-Score	**Leptin-Score**	**ND CIA**	**0,34400**	0,47720	**0,00890**
Visfatin-Score	**Adiponektin-Score**	**ND CIA**	**0,36310**	0,56570	**0,00140**
Visfatin-Score	**Serum CRP**	**HFD CIA**	**0,65140**	0,71500	**0,00020**
Visfatin-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,03253	0,05469	0,80900
Visfatin-Score	Serum Adiponektin	HFD CIA	0,21900	-0,43290	**0,04420**
Visfatin-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,04491	-0,18080	0,42080
Visfatin-Score	Leber-Score	HFD CIA	0,20460	-0,46510	**0,02920**
Visfatin-Score	CLS-Score	HFD CIA	0,00572	0,07080	0,75420
Visfatin-Score	**Leptin-Score**	**HFD CIA**	**0,67350**	**0,83740**	**<0,0001**
Visfatin-Score	**Adiponektin-Score**	**HFD CIA**	**0,70130**	**0,77330**	**<0,0001**

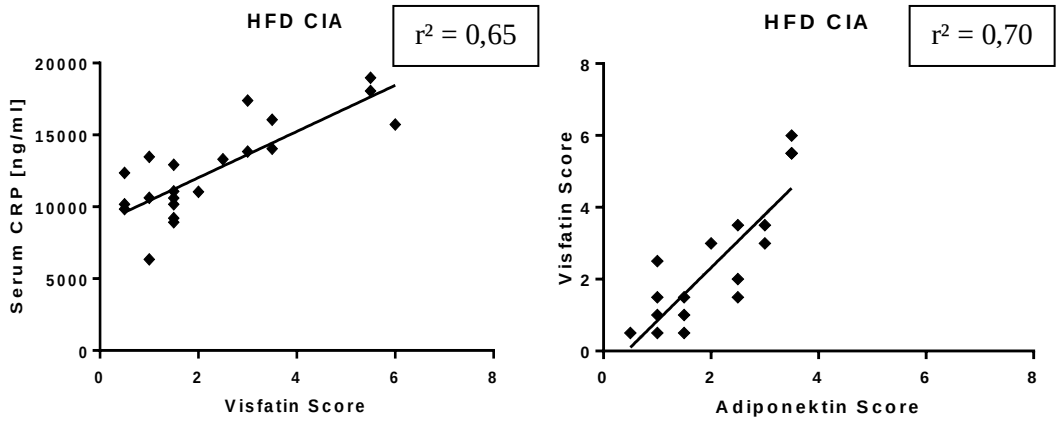

Abbildung 45: Korrelation zwischen Visfatin-Score und CRP-Serumspiegel (links) sowie zwischen Adiponektin-Score und Visfatin-Score (rechts) bei erkrankten HFD Tieren. Interessanterweise zeigten HFD CIA Tiere zwischen Visfatin-Score und systemischen CRP-Werten eine hohe Korrelation (r^2 = 0,65). Die lokale Visfatin-Expression verhielt sich bei HFD CIA Tieren sehr ähnlich zu der lokalen Adiponektin-Expression, was durch eine hohe Korrelation bestätigt wurde (r^2 = 0,70).

3.5.7 Adiponektin-Score

Wie bereits beschrieben, konnte bei HFD CIA Tieren sowohl zwischen lokaler Adiponektin- und Leptin-Expression (r^2 = 0,54, p = 0,0003) als auch zwischen lokaler Adiponektin- und Visfatin-Expression (r^2 = 0,70, p = <0,0001) Korrelationen festgestellt werden. Zudem zeigten, bis auf HFD CIA Tiere, sämtliche Versuchsgruppen keine korrelativen Zusammenhänge zwischen Adiponektin-Scores und systemischen Adiponektin-Spiegeln. Interessanterweise kam es bei HFD CIA Tieren zu einer inversen Korrelation zwischen lokaler Expression und systemischen Messwerten (r^2 = 0,45, p = 0,0012; Abbildung 46). Dies ist die einzige Korrelation, die zwischen lokaler und systemischer Adipokin- (Adiponektin) Expression festgestellt werden konnte. Zudem korrelierte der Adiponektin-Score mit systemischen Leptin-Spiegeln bei ND CIA Tieren (r^2 = 0,33, p = 0,0361; Tabelle 35).

Tabelle 35: Korrelationen des Adiponektin-Scores mit allen Parametern sowie allen Versuchsgruppen ($r^2 > 0,3$ sowie $p < 0,05$ fett). Die lokale Adipokin-Expression ist durch den jeweiligen Score dargestellt. Die Versuchsgruppen schließen die Tiere der entsprechenden Gruppen zu allen Zeitpunkten ein. r^2: Bestimmtheitsmaß der linearen Regression, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p: Signifikanz.

Parameter 1	Parameter 2	Versuchsgruppe	r^2	r	p
Adiponektin-Score	Serum CRP	ND gesund	0,00822	-0,10660	0,77270
Adiponektin-Score	Serum Leptin	ND gesund	0,05411	-0,02819	0,95830
Adiponektin-Score	Serum Adiponektin	ND gesund	0,00236	0,18120	0,60000
Adiponektin-Score	Serum Visfatin	ND gesund	0,00092	0,11730	0,74240
Adiponektin-Score	Leber-Score	ND gesund	0,00312	0,07013	0,88640
Adiponektin-Score	CLS-Score	ND gesund	0,08798	0,29450	0,38110
Adiponektin-Score	Leptin-Score	ND gesund	0,09343	-0,34870	0,24850
Adiponektin-Score	Visfatin-Score	ND gesund	0,07565	0,34590	0,29770
Adiponektin-Score	Serum CRP	HFD gesund	0,03787	-0,14480	0,69910
Adiponektin-Score	Serum Leptin	HFD gesund	0,00682	-0,28970	0,39390
Adiponektin-Score	Serum Adiponektin	HFD gesund	0,21030	-0,50780	0,10390
Adiponektin-Score	Serum Visfatin	HFD gesund	0,00222	0,19050	0,77270
Adiponektin-Score	Leber-Score	HFD gesund	0,03846	-0,32240	0,32250
Adiponektin-Score	CLS-Score	HFD gesund	0,03033	0,19310	0,58870
Adiponektin-Score	Leptin-Score	HFD gesund	0,13680	-0,32240	0,32250
Adiponektin-Score	Visfatin-Score	HFD gesund	0,02273	-0,15250	0,69910
Adiponektin-Score	Serum CRP	ND CIA	0,04182	0,27850	0,14340
Adiponektin-Score	**Serum Leptin**	**ND CIA**	**0,33590**	0,40500	**0,03610**
Adiponektin-Score	Serum Adiponektin	ND CIA	0,00479	-0,17090	0,37550
Adiponektin-Score	Serum Visfatin	ND CIA	0,03729	0,25960	0,17380
Adiponektin-Score	Leber-Score	ND CIA	0,03697	-0,16240	0,39980
Adiponektin-Score	CLS-Score	ND CIA	0,00005	0,10060	0,60350
Adiponektin-Score	Leptin-Score	ND CIA	0,16000	0,25070	0,18970
Adiponektin-Score	**Visfatin-Score**	**ND CIA**	**0,36310**	0,56570	**0,00140**
Adiponektin-Score	**Serum CRP**	**HFD CIA**	**0,54950**	0,71040	**0,00020**
Adiponektin-Score	Serum Leptin	HFD CIA	0,02310	0,10370	0,64600
Adiponektin-Score	**Serum Adiponektin**	**HFD CIA**	**0,45160**	-0,64300	**0,00120**
Adiponektin-Score	Serum Visfatin	HFD CIA	0,00034	-0,06741	0,76570
Adiponektin-Score	Leber-Score	HFD CIA	0,17990	-0,44610	**0,03740**
Adiponektin-Score	CLS-Score	HFD CIA	0,03395	0,23910	0,28390
Adiponektin-Score	**Leptin-Score**	**HFD CIA**	**0,54930**	0,69600	**0,00030**
Adiponektin-Score	**Visfatin-Score**	**HFD CIA**	**0,70130**	0,77330	**<0,0001**

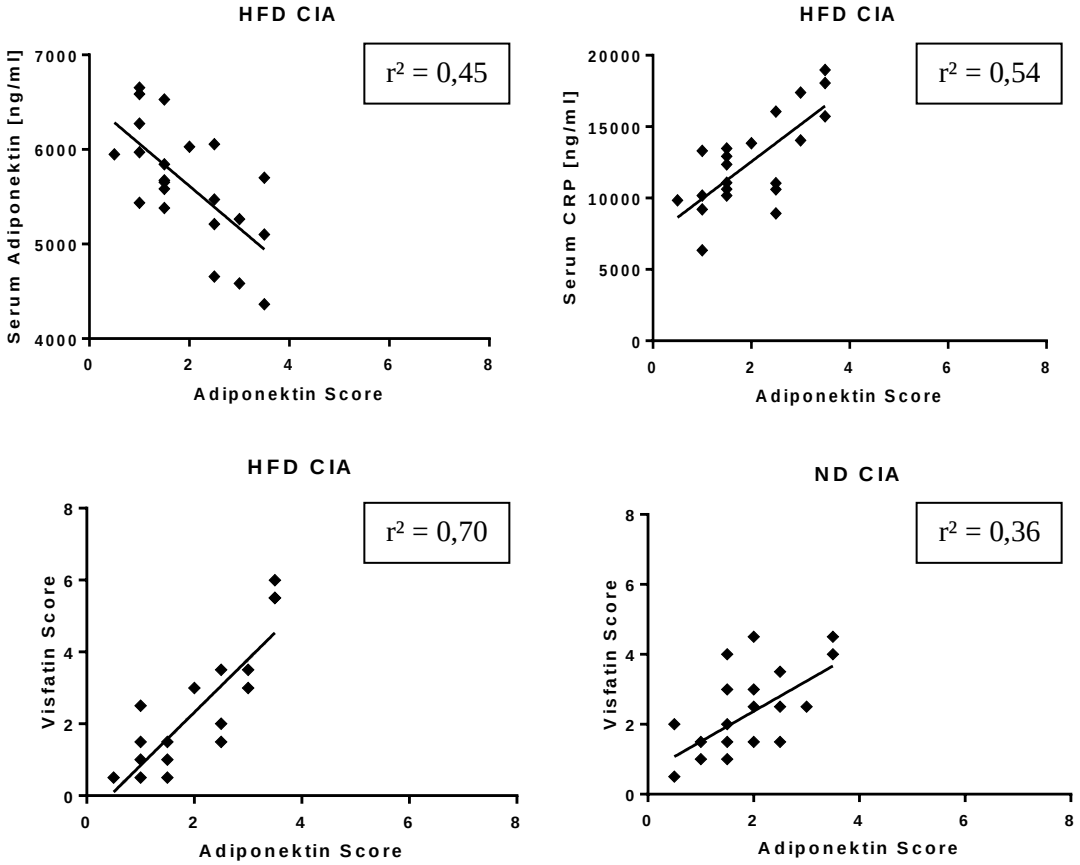

Abbildung 46: Korrelation zwischen Adiponektin-Score und systemischen Adiponektin-Spiegeln (links oben) sowie zwischen Adiponektin-Score und CRP-Serumspiegel (rechts oben) bei erkrankten HFD Tieren. Korrelation zwischen Adiponektin- und Visfatin-Score bei HFD CIA (links unten) sowie ND CIA Tieren (rechts unten). Als einzige Versuchsgruppe zeigten HFD CIA Tiere eine Korrelation zwischen lokaler und systemischer Adiponektin-Expression (r^2 = 0,45). Auffallend war, dass diese Korrelation invers war, sodass bei hohen Adiponektin-Scores, niedrige Adiponektin-Serumspiegel messbar waren. Im Vergleich zur lokalen Leptin- und Visfatin-Expression, korrelierten auch Adiponektin-Score und systemische CRP-Spiegel bei HFD CIA Tieren (r^2 = 0,54). Interessanterweise korrelierte die lokale Expression von Adiponektin sowohl bei HFD CIA Tieren als auch bei ND CIA Tieren (r^2= 0,36).

4. Diskussion

Ziel dieses Projekt war es, mögliche Einflüsse von Übergewicht und Adipokinen auf die Krankheitsintensität der Kollagen-induzierten Arthritis im Mausmodell, stellvertretend für die RA beim Menschen, zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen und dabei zwischen systemischen und lokalen Prozessen zu differenzieren. Rückblickend konnten sowohl die Induktion des Übergewichts durch die Applikation einer Hochfett-Diät als auch die Induktion entzündlicher arthritischer Prozesse durch die CIA erfolgreich durchgeführt werden.

4.1 Metabolische Veränderungen

4.1.1 Körpergewicht

Gesunde HFD Tiere wiesen zu allen Zeitpunkten ein signifikant höheres Körpergewicht als gesunde ND Tiere auf. Außerdem lag das Körpergewicht erkrankter HFD Tiere zu jedem Zeitpunkt über dem der erkrankten ND Tiere (Abbildung 8). Es zeigte sich, dass die Messung des Körpergewichts in dem CIA-Modell die Induktion des Übergewichtes belegen konnte und einen geeigneten Messparameter darstellte.

Die Induktion der Arthritis bewirkte, verglichen mit den gesunden Kontrollgruppen, jedoch bei allen erkrankten Tieren eine deutliche Abnahme des Gewichtes, was sich vor allem bei den HFD Tieren 5- und 7 Wochen nach Immunisierung signifikant zeigte (Abbildung 8). Diese Reduktion ließe sich einerseits durch eine verminderte Bewegung und andererseits durch eine verminderte Nahrungsaufnahme durch die inflammatorischen Prozesse der erkrankten Tiere erklären.

Die spezifische Rolle von Übergewicht im Rahmen der RA wird aufgrund heterogener Studienergebnisse weiterhin diskutiert (George und Baker 2016). Eindeutigere Ergebnisse liefern Studien im Kontext der degenerativen Arthrose. So ist bekannt, das Übergewicht einerseits mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Arthrose einhergeht und andererseits eine bestehende Erkrankung zunehmend verschlechtern kann, was unter anderem auf die biomechanische Belastung zurückgeführt wird (Lohmander et al. 2009), (Jiang et al. 2012).

Interessanterweise korrelierte das Körpergewicht bei gesunden HFD Tieren mit den systemisch gemessenen Leptin-Spiegeln (r^2 = 0,35, Abbildung 40). Auch in der Literatur ist der proportionale Zusammenhang zwischen Körpergewicht bzw. BMI und

systemischen Leptin-Spiegeln bekannt (Jéquier 2002). Die CIA-Induktion schien auf diese Korrelation, trotz des abnehmenden Gewichts bei HFD CIA Tieren, keinen Einfluss zu nehmen, da letztere ebenfalls eine positive Korrelation mit der systemischen Leptin Konzentration aufwiesen ($r^2 = 0,59$).

4.1.2 Leber-Score

Auch im Leber-Score zeigte sich in Relation zum Körpergewicht eine vergleichbare Kinetik. So wiesen gesunde HFD Tiere, vor allem zum Zeitpunkt Woche 4, einen signifikant höheren Grad der Leberverfettung im Vergleich zur gesunden ND Gruppe auf (Abbildung 11). Dies bestätigte, neben der Gewichtszunahme, ebenfalls die erfolgreiche Adipositas-Induktion, da bei ND Tieren kein vergleichbarer Effekt 4 Wochen nach Immunisierung beobachtet werden konnte. Auch beim Menschen kann Adipositas zu einer Verfettung der Leber führen, was unter dem Krankheitsbild der nicht alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) zusammengefasst wird (Roeb et al. 2015), (Noureddin und Sanyal 2018). Trotz deutlicher Abnahme der Leberverfettung, wiesen gesund HFD Tiere auch 5,5 Wochen nach Versuchsbeginn erhöhte Scores im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen auf. Interessanterweise bewirkte die CIA-Induktion lediglich bei HFD Tieren eine deutliche Abnahme des Leber-Scores zu allen Zeitpunkten in Relation zu gesunden HFD Tieren. Ein vergleichbarer Effekt blieb trotz identischer Arthritis-Induktion bei ND Tieren aus (Abbildung 12). Dies implizierte zum einen, dass die stark verfettete Leber der HFD Tiere mit einer deutlich stärkeren Lipolyse auf den entzündlichen Stimulus als die Leber der normalgewichtigen Tiere, reagierte. Zum anderen schien der Grad der Leberverfettung wesentlich stärker durch inflammatorische Prozesse beeinflusst worden zu sein, als das Körpergewicht der Tiere, da bei ND CIA Tieren eine deutliche Reduktion des Körpergewichtes, jedoch nicht des Leber-Scores, beobachtet werden konnte. Interessanterweise gibt es humane Studien, die bei Patienten mit rheumatologischen Erkrankungen wie der RA und der Psoriasis-Arthritis eine hohe Prävalenz an gleichzeitig vorhandener NAFLD beobachten konnten (Madanagobalane und Anandan 2012), (Wagan et al. 2020). Unklar ist jedoch, ob ein direkter Zusammenhang zwischen RA und NAFLD besteht und ob eine NAFLD direkt entzündliche Prozesse im Gelenk beeinflusst, da einige der untersuchten Patienten therapeutisch Methotrexat erhielten, das bei langer Einnahmedauer und hohen Konzentrationen hepatotoxische Wirkungen haben kann (Roeb et al. 2015).

7 Wochen nach Immunisierung kam es in allen Gruppen zu einer deutlich erhöhten Streuung der Einzelwerte, deren genaue Ursache unklar ist. Es zeigten sich jedoch die gleichen Tendenzen, wie beispielweise die Reduktion des Leber-Scores bei HFD CIA Tieren und erhöhte Scores bei gesunden HFD im Vergleich zu gesunden ND Tieren, die bereits zu den früheren Zeitpunkten beschrieben wurden.

4.1.3 CLS-Score

Wie bereits beschrieben, lassen sich die invadierenden Makrophagen als Ausdruck eines chronischen, entzündlichen Prozesses deuten. So ist bereits bekannt, dass Übergewicht und Adipositas mit einem milden, chronischen Entzündungszustand einhergehen (*chronic low-grade inflammation*) (Russolillo et al. 2013), (Cao 2014). Auch in diesem Modell ließ sich dieses Phänomen durch eine Vielzahl von Beobachtungen bestätigen. Die systemischen CRP-Werte, die bereits von Hülser 2019 erhoben wurden, zeigten vor allem 4 Wochen nach Immunisierung signifikant höhere Messwerte bei gesunden HFD Tieren im Vergleich zu gesunden ND Tieren (Hülser 2019). Zudem stellte sich eine positive Korrelation zwischen CRP-Werten und Leber-Score bei HFD Tieren dar (r^2 =0,44). Weiterhin zeigten gesunde HFD Tiere über den gesamten Zeitverlauf eine vermehrte Anzahl an CLS im Vergleich zu gesunden ND Tieren, was sich auf eine verstärkte Mobilisierung und Infiltration von Makrophagen zurückführen lässt (Abbildung 15). In einer Studie an DBA/1 Mäusen ließen sich ebenfalls durch die Induktion einer CIA eine erhöhte Anzahl invadierender Makrophagen im perivaskulären Fettgewebe beobachten (Sime et al. 2017).

Des Weiteren lassen sich auch in humanen Studien Zusammenhänge zwischen CLS-Anzahl und der RA herstellen. So konnte man bei Patienten mit RA anhand von periumbilikalen subkutanen Fettgewebsproben eine erhöhte Anzahl von CLS im Vergleich zu Patienten ohne RA feststellen. Interessanterweise zeigten in der gleichen Studie vor allem Patienten eines frühes RA-Stadiums eine besonders hohe Makrophagen-Infiltration (Giles et al. 2018). Letzteres ließ sich auch in diesem Projekt innerhalb der ND CIA Tiere wiederfinden. Überraschenderweise stellte sich bei den normalgewichtigen ND Tieren ein signifikanter Einfluss der CIA dar. So kam es bereits 4 Wochen nach Immunisierung zu einer starken Infiltration der CLS ins Fettgewebe, die bei keiner anderen Gruppe vergleichbar ausgeprägt war (Abbildung 15).

Die Ursache dieser hohen, frühzeitigen Infiltrationszahl der ND CIA Gruppe ließ sich anhand der in diesem Projekt erhobenen Daten auf die Interaktion zwischen

chronischem Entzündungszustand und den akuten entzündlichen Stimulus bei HFD Tieren durch die CIA-Induktion zurückführen. So kam es möglicherweise durch den mit der HFD induzierten chronischen Entzündungsprozess zu einer verminderten, reaktiven Entzündungsreaktion auf die CIA-Induktion. Da die entsprechenden Tiere bereits 6 Wochen lang vor Arthritis-Induktion mit einer HFD gefüttert wurden, stellten sich im Fettgewebe bereits entzündliche Prozesse ein. Diese frühzeitige Entzündungsreaktion, die sich bereits wenige Tage nach Beginn der HFD manifestieren kann, wurde bereits bei Mäusen beobachtet und wird unter anderem auf eine frühzeitige Infiltration von neutrophilen Granulozyten zurückgeführt (Elgazar-Carmon et al. 2008). Folglich könnte es durch die bereits vorhandenen inflammatorischen Prozesse, die eine erneute Immunreaktion abmilderten, zu keiner erneuten Zunahme invadierender Makrophagen gekommen sein. Im Gegensatz dazu kam es durch das Fehlen bestehender Entzündungsprozesse im Fettgewebe bei ND Tieren zu einer signifikant starken, reaktiven Antwort auf den entzündlichen Stimuli, was die hohe Anzahl von CLS zum 4 Wochenzeitpunkt erklären könnte.

Die HFD-unabhängige hohe CLS Zahl verdeutlichte jedoch auch, dass die invadieren Makrophagen nicht ausschließlich mit Übergewicht bzw. Adipositas zusammenhingen. So konnte man in einigen humanen Studien bei adipösen Menschen durch eine rasche Gewichtsabnahme nur eine geringfügige, teilweise sogar keine Abnahme der CLS feststellen (Burhans et al. 2018). Für eine verstärkte Mobilisation von Fettgewebsmakrophagen scheinen verschiedenste Faktoren die einen Einfluss auf die Energie-Homöostase haben, verantwortlich zu sein (Burhans et al. 2018). So kam es in einer Studie bei Mäusen durch Kälteexposition zu einer verstärkten Synthese von IL-4, was zu einer verstärkten Rekrutierung von Fettgewebsmakrophagen führte, die wiederum vermehrt Katecholamine sezernierten (Nguyen et al. 2011).

Des Weiteren zeigte sich bei ND Tieren über den Zeitverlauf eine signifikant kontinuierliche Abnahme der CLS, die sich gleichmäßig zur Abnahme der systemischen inflammatorischen Aktivität verhielt und interessanterweise durch eine positive Korrelation mit den systemischen CRP-Werten bestätigt wurde ($r^2 = 0,36$; Tabelle 31).

Verglich man die CRP-Konzentrationen bei HFD CIA Tieren mit den CLS-Scores über den Zeitverlauf, so ließ sich im Gegensatz zu ND CIA Tieren, keine Korrelation feststellen. Die CRP-Konzentrationen nahmen über den Zeitverlauf bei HFD CIA Tieren signifikant ab, was sich als kontinuierliche Abnahme der systemischen Entzündung interpretierbar ist, wohingegen die Anzahl der CLS konstant blieb

(Abbildung 16). Dies zeigte, dass die Anzahl der CLS bei HFD CIA Tieren eher an das Vorhandensein von Adipositas und weniger an den entzündlichen Stimulus der Arthritis-Induktion gekoppelt waren, was folglich die im Vergleich zu ND CIA Tieren geringe, aber konstante CLS Infiltration zusätzlich erklären könnte.

Alternativ könnten auch die Inhaltsstoffe der HFD-Fütterung, in Zusammenspiel mit dem entzündlichen CIA Stimulus, maßgeblich für die verminderte Einwanderung der CLS verantwortlich gewesen sein. Mit einem Fettanteil in Höhe von 58%, enthielt die Diät neben Sojabohnenöl vor allem auch Kokosnussöl. Da in der Literatur sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften beider Öle beschrieben wurden, die unter anderem auf die enthaltenden und das Verhältnis von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren zurückgeführt werden, wäre ein Diät-spezifischer Effekt plausibel (Ludwig et al. 2013), (Sokoła-Wysoczańska et al. 2018). Eine genaue Aussage lässt sich jedoch aufgrund der Komplexität und heterogenen Studienlage nicht treffen. Um den Einfluss von bestimmten Bestandteilen hochkalorischer Diäten im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen besser zu verstehen, könnte man beispielsweise im Rahmen eines CIA-Modells, selektiv spezifische Inhaltsstoffe hochdosiert als hochkalorische Diät verabreichen und die entzündlichen Prozesse im Fettgewebe untersuchen.

4.2 Entzündliche Veränderungen

4.2.1 Arthritis-Induktion

Insgesamt betrachtet konnte die Induktion der Arthritis sowohl bei ND als auch bei HFD Tieren erfolgreich induziert werden, was durch signifikant höhere Gelenk-Scores im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen belegt werden konnte (Abbildung 21). Auch in den systemischen CRP-Werten, die bereits von Hülser 2019 erhoben wurden, wiesen CIA Tiere hochsignifikant höhere Messwerte im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen auf (Hülser 2019). Interessanterweise wiesen HFD CIA Tiere zum 4-Wochenzeitpunkt erhöhte CRP-Werte, verglichen mit der entsprechenden ND CIA Gruppe auf. Betrachtete man die Entwicklung des CRPs über den Zeitverlauf, so kam es zu einer signifikanten Abnahme im Zeitraum von 4 bis 7 Wochen bei allen CIA Tieren (Hülser 2019), was zum einen eine abklingende systemische Entzündungsaktivität darstellte und zum anderen auch die Kinetik des CIA-Modells einer selbstlimitierenden Entzündung (Bessis et al. 2017), widerspiegelte. Gleichermaßen ließ sich diese Abnahme, wenn auch in deutlich geringeren Umfang, im histologischen Gelenk-Score

wiederfinden (Abbildung 22, Abnahme des Scores im Zeitraum von 5 bis 7 Wochen bei allen CIA Tieren).

Im histologischen Scoring wurde neben der Zellinfiltration auch die Schwere der Gelenkdestruktionen anhand von Schäden im Meniskus und Gelenkknorpel berücksichtigt. Es ist bereits bekannt, dass Gelenkschäden, die wie in diesem CIA-Modell durch eine anhaltende Synovitis verursacht wurden, auch beim Menschen im Rahmen der RA nur langsam und häufig nur durch medikamentöse Interventionen eine Remission erfahren (Ito et al. 2018). Folglich ließe sich die verminderte Abnahme des Gelenk-Scores, im Vergleich zur Abnahme der systemischen CRP-Werte, durch die verlangsamte gelenknahe Regeneration erklären.

Die Induktion der HFD schien anhand der histologisch beurteilten Gelenke während der Erkrankungsphase (Zeitraum 4- bis 7 Wochen) keinen signifikanten Einfluss auf die Intensität und damit der inflammatorischen Aktivität innerhalb Gelenke der CIA zu haben. Auffallend war jedoch, dass HFD CIA Tiere zum 4 Wochenzeitpunkt im Vergleich zu den ND CIA Tieren einen deutlich höheren Score aufwiesen. Weiterhin gab es bei den ND CIA Tieren zum gleichen Wochenzeitpunkt wesentlich mehr Tiere, die keine oder nur geringfügige histologische Entzündungszeichen zeigten. Von den insgesamt sieben Tieren der ND CIA Gruppe, hatten drei Tiere einen Gelenk-Score von null und ein Tier einen Gelenk-Score von eins. In der korrespondierenden HFD CIA Gruppe hatte lediglich ein Tier einen Score von eins (Abbildung 21). Daraus lässt sich schließen, dass die HFD-Induktion den Beginn der Gelenkarthritis beschleunigt haben könnte, was sich auch durch die erhöhten CRP-Spiegel im ersten Zeitstadium bei HFD CIA Tieren belegen ließe (Hülser 2019). Dieses Phänomen wurde ebenfalls durch Kim S-jae *et al.* bei DBA/1J Mäusen in einem CIA-Modell beschrieben und lässt sich nach den Autoren auf die MIP2 abhängige Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Gelenk bei HFD Mäusen zurückführen (Kim et al. 2017). Interessanterweise konnten die Autoren, wie in diesem Projekt, keine HFD induzierten Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Arthritis über den Zeitverlauf (hier 4 bis 7 Wochen) beobachten. Auch in einem weiteren CIA-Modell konnte bei DBA/1J Mäusen durch die Induktion einer HFD eine frühere und schwerere Arthritis im Vergleich zu den ND Tieren beobachtet werden (Na et al. 2017). In der Arbeit von Kim S-jae *et al.* gab es zudem Hinweise auf eine zeitlich verzögerte Remission der murinen Arthritis, die auf eine vermehrte Aktivität proinflammatorischer M1 Makrophagen bei HFD Tieren zurückgeführt wurde (Kim et al. 2017). In diesem Projekt ließen sich jedoch keine

Unterschiede hinsichtlich Remissionsgeschwindigkeit zwischen HFD und ND Tieren sowohl in den CIA-Scores als auch anhand der systemischen CRP-Spiegel feststellen. Somit hatte die HFD-Induktion keinen direkten Einfluss auf die Abnahme der Entzündungsaktivität. Einen indirekten Einfluss von Übergewicht ließ sich jedoch in humanen Studien feststellen. Beispielsweise zeigten verschiedene Untersuchungen, dass die Effektivität medikamentöser Therapien bei adipösen Patienten mit RA vermindert waren (Gremese et al. 2013), (Schäfer et al. 2020).

Im Gegensatz dazu wurde in einem CIA-Modell mit einem anderen Mausstamm (C57BL/6 Mäuse) eine Verschlechterung der Gelenkinflammation, einhergehend mit einer erhöhten Anzahl an Th17-Zellen bei HFD Tieren, beobachtet (Jhun et al. 2012). Dies impliziert, dass es für zukünftige Studien durchaus wichtig ist, Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen zu berücksichtigen, da neben HFD-induzierten Unterschieden auch bereits die Inzidenz der CIA zwischen verschiedenen Mausstämmen variabel ist (Brand et al. 2007). Interessanterweise konnten auch beim Menschen in Studien geschlechterspezifische Unterschiede hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen RA und Adipositas beobachtet werden. So gibt es einerseits Daten, die ein reduziertes Erkrankungsrisiko bei Männern mit erhöhten BMI Werten aufzeigen (Turesson et al. 2016). Andererseits gibt es Daten, die bei adipösen Frauen eine vermindertes Ansprechen auf TNF-Inhibitoren belegen (Schäfer et al. 2020). Dies impliziert, dass durch die individuelle Anpassung der Medikation an Geschlecht und BMI, die Effektivität zukünftiger Therapiestrategien verbessert werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die HFD in diesem Modell keinen signifikanten Einfluss auf die Intensität der CIA hatte. Vielmehr schien die HFD den Beginn der Arthritis zu beschleunigen. Da das Fettgewebe als endokrines Organ die Fähigkeit besitzt, proinflammatorische Prozesse zu fördern (Proença et al. 2014), könnte die HFD und die damit induzierte Adipositas auch indirekt über die Adipokine einen Einfluss auf den Manifestationszeitpunkt gehabt haben.

4.3 Adipokine

4.3.1 Leptin

Der spezifische Einfluss von Leptin im Kontext der RA scheint trotz heterogener Daten eher proinflammatorischen Charakters zu sein (Yoshino et al. 2011b), (Carrión et al. 2019). Interessanterweise konnte im aktuellen Projekt bereits im Rahmen der Adipositas-Induktion beobachtet werden, dass es bei HFD CIA Tieren zu einer frühzeitigen Manifestation der Arthritis gekommen war, da zum 4 Wochenzeitpunkt wesentlich mehr HFD als ND Tiere inflammatorische Prozesse aufwiesen. Betrachtete man nun die lokale Leptin-Expression in den Gelenken (Abbildung 25 und 26), die anhand des Leptin-Scores beurteilt wurden, so zeigten sich bei HFD CIA Tieren zum 4 Wochenzeitpunkt deutlich höhere Scores, im Vergleich zu den ND CIA Tieren im gleichen Zeitintervall. Dies impliziert, dass die hohe Leptin-Expression in Zusammenhang mit dem frühzeitigen Krankheitsgeschehen bei HFD Tieren stehen könnte. Auch in der Literatur gibt es Studien, die anhand eines Tiermodells proinflammatorische Wirkungen des Leptins beobachten konnten. So zeigte sich in einem murinen CIA-Modell, dass Leptin die Th17-Zellantwort verstärken kann und folglich eine gesteigerte Gelenkentzündung zur Folge hatte (Deng et al. 2012). In der gleichen Studie konnte neben der verstärkten Entzündungsaktivität auch durch eine intraartikuläre Injektion von Leptin in die Kniegelenke der Mäuse nach bereits induzierter CIA, eine frühzeitige und schwerere Arthritis beobachtet werden, die sich ungefähr eine Woche vor den Kontrollgruppen manifestierte (Deng et al. 2012). Diese Beobachtungen unterstützen die Datenlage dieses Projektes und lassen eine wesentliche Beteiligung des Leptins an dem frühzeitigen Entzündungsgeschehen bei HFD Tieren schlussfolgern. In einem Tiermodell bei Leptin defizienten Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass der Schweregrad der Arthritis, sowie die IL-1β und TNF-α Konzentrationen im Synovium des Kniegelenkes im Vergleich zu den Kontrollgruppen vermindert waren (Busso et al. 2002), was die proentzündliche Rolle des Leptins zusätzlich unterstützt.

Des Weiteren korrelierten Körpergewicht und systemische Leptin-Spiegel bei gesunden HFD (r^2 = 0,3555) und vor allem bei HFD CIA Tieren (r^2 = 0,5929). Dieser Zusammenhang zwischen Körpergewicht bzw. BMI und systemischen Leptin-Spiegeln, der auch in der Literatur bekannt ist (Jéquier 2002), impliziert dass durch die Adipositas bei HFD Tieren gewissermaßen auch höhere Leptin Messwerte vorhanden waren. Dies

wurde dadurch bestätigt, dass HFD CIA Tiere zum 4 Wochenzeitpunkt das höchste Körpergewicht innerhalb aller HFD CIA Gruppen zu allen Zeitpunkten aufwiesen (Abbildung 8). Es erscheint demnach durchaus nachvollziehbar, dass durch eine höhere Konzentration und Expression von Leptin die proinflammatorischen Eigenschaften des Hormons mit für die frühzeitige Manifestation der Arthritis bei HFD Tieren verantwortlich gewesen sein könnte.

Interessanterweise lassen sich auch in humanen Studien Zusammenhänge zwischen Leptin und der RA herstellen. Einige Studien zeigten, dass Patienten mit RA erhöhte Leptin-Spiegel aufwiesen und die erhöhten Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung zusammenhingen (Yoshino et al. 2011b), (Lee et al. 2007). Andere konnten keinen quantitativen Unterschied zwischen gesunden und Patienten mit RA feststellen (Hizmetli et al. 2007), (Tian et al. 2014). Vergleicht man nun die systemischen Leptin Messwerte im Tiermodell, die bereits durch Hülser 2019 erhoben wurden, mit der lokalen Leptin-Expression im Gelenk, fallen deutliche Unterschiede auf (Hülser 2019). Wie bereits durch Hülser 2019 beschrieben kam es durch die CIA-Induktion sowohl bei ND als auch HFD Tieren, zu einer starken Reduktion der Leptin Messwerte zu allen Zeitpunkten, im Vergleich zu den gesunden Kontrollgruppen. Interessanterweise ließen sich diese Messwerte auf die lokale Leptin-Expression nicht übertragen, da die dortige Expression nur bei HFD Tieren und nur zum 5,5- und 7 Wochenzeitpunkt durch die CIA-Induktion signifikant reduziert wurde (Abbildung 25). Zudem kam es bei den lokalen Messwerten zu einer vergleichsweise geringeren Reduktion der Scores.

Im Gegensatz zu diesen Daten zeigten Synovia-Proben bei Patienten mit RA erniedrigte Leptin Konzentrationen im Vergleich zu systemischen Plasmaproben (Bokarewa et al. 2003), (Toussirot et al. 2015). Daraus lässt sich schließen, dass die Übertragbarkeit der murinen Leptin-Regulation auf den Menschen nur einschränkt möglich ist. Im Tiermodell schienen lokale und systemische Leptin-Expression unterschiedlich auf den Entzündungsstimulus zu reagieren, was auch indirekt durch das ähnliche Verhalten des lokalen und systemischen Leptins bei gesunden HFD Tieren bestätigt wurde. So kam es bei gesunden HFD Tieren sowohl systemisch als auch im lokalen Gelenk zu einer Zunahme der Leptin-Konzentration über Zeitraum von 4 bis 7 Wochen. Bei einigen Adipokinen, wie beispielsweise Adiponektin, sind bereits unterschiedliche Wirkungen im systemischen Kreislauf und im lokalen Gelenk beschrieben worden (Tang et al. 2007), (Neumann et al. 2011). Dies legt nahe, dass auch die Wirkung und Regulierung

von Leptin sehr komplex und von den an dem Wirkungsort vorherrschenden Milieu abhängig sein könnte.

Da die systemischen Leptin-Spiegel mit dem BMI bzw. dem Körpergewicht der Tiere positiv korrelierten, ließe sich, wie durch Hülser 2019 beschrieben, die starke Reduktion durch einen erhöhten Energierumsatz und Energiebedarf der Tiere während der Erkrankung teilweise begründen (Hülser 2019). Außerdem könnten die CIA Tiere ihre Nahrungsaufnahme durch die Krankheitsinduktion und den damit verbundenen Schmerzen, reduziert haben. Dies würde zum einen durch eine Abnahme des Körpergewichtes (Abbildung 8) sowie durch die Abnahme der Leberverfettung (Abbildung 11) bestätig werden. Unklar verbleibt jedoch, warum die systemischen Leptin-Spiegel auch bei ND CIA Tieren so deutlich reduziert wurden, da anhand der metabolischen Scores HFD CIA Tiere sowohl bei Körpergewicht als auch Leber-Score wesentlich stärker von der Reduktion betroffen waren.

Vergleicht man lokale Leptin-Spiegel bei CIA Tieren mit den entsprechenden CRP-Werten, so konnte nur bei HFD CIA Tieren eine positive Korrelation beobachtet werden. Systemische Leptin-Spiegel wiesen bei CIA Tieren jedoch keine Korrelation zu den CRP-Werten auf, was sich auf die starke Reduktion durch die CIA-Induktion zurückführen lässt. Auch in der humanen Literatur liefert der Zusammenhang zwischen Leptin und CRP keine eindeutigen Ergebnisse. So gibt es Studien, die einen positiven Zusammenhang zwischen systemischem Leptin- und CRP-Spiegeln bei Patienten mit RA zeigten (Yoshino et al. 2011b), aber auch Studien die einen inversen Zusammenhang zwischen IL-6 und CRP zu systemischen Leptin-Spiegeln bei Patienten mit RA beobachten konnten (Popa et al. 2005). Die heterogene Datenlage lässt sich aber auch durch die in einigen Studien niedrige Fallzahl und durch geschlechter- sowie therapiespezifische Unterschiede der untersuchten Patienten erklären.

Die Adipositas-Induktion schien einerseits die Menge des systemischen Leptins und andererseits auch die lokale Expression, zumindest zu Beginn der Entzündung, zu erhöhen. Letztere könnte folglich die Entstehung der Arthritis beschleunigt haben. Die Abnahme der lokalen Leptin-Expression im Zeitverlauf könnte, ähnlich wie die systemischen CRP-Werte, das Abklingen der Entzündung widerspiegeln, was durch eine positive Korrelation zwischen CRP und Leptin-Score bei HFD CIA Tieren unterstrichen wird ($r^2 = 0{,}4570$). Für den CIA-Score ließ sich eine vergleichbare Korrelation nicht herstellen. Dies ließe sich dadurch erklären, dass im histologischen Gelenk-Score vor allem die bleibenden Schäden, wie beispielsweise Knorpel- und

Meniskusschäden, beurteilt wurden und die Reparationszeit und folglich auch Remissionszeit, im Vergleich zur systemischen Abnahme der CRP-Konzentration zeitlich verzögert war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zwischen dem lokalen und dem systemischen Kreislauf durch die CIA-Induktion zu einer unterschiedlichen Expression und womöglich auch Regulation des Leptins gekommen ist. Aus diesem Grund, sollten mögliche therapeutische Ansätze diese Diskrepanz berücksichtigen und möglichst eher selektiv im lokalen, betroffenen Gelenk ihre Wirkung entfalten.

4.3.2 Visfatin

Die Wirkung von Visfatin wird im rheumatologischen Kontext überwiegend als eher proinflammatorisch beschrieben (Brentano et al. 2007), (Moschen et al. 2007). So gibt es murine Studien, in denen durch die Inhibition der Nampt-Aktivität der Schweregrad der Arthritis verringert werden konnte (Busso et al. 2008). In einem CIA-Modell bei Visfatin defizienten DBA/1J Mäusen konnte ebenfalls eine Reduktion der Entzündungsaktivität beobachtet werden (Li et al. 2019).

Diese Daten implizieren einen proinflammatorischen Effekt des Visfatins im Kontext von murinen CIA-Modellen. Im aktuellen Projekt ließ sich jedoch kein direkter inflammatorischer Einfluss des Visfatins auf den Schweregrad der Arthritis feststellen, da sich weder eine Korrelation zwischen Visfatin- und CIA-Score, noch zwischen systemischen Visfatin-Spiegeln und dem CIA-Score darstellen ließ. Interessanterweise zeigte jedoch die Kombination aus CIA-Induktion und HFD 4 Wochen nach Immunisierung eine signifikante Zunahme der lokalen Visfatin-Expression, im Vergleich zu gesunden HFD und erkrankten ND Tieren, welche im weiteren Zeitverlauf wieder signifikant abnahm (Abbildung 29 und 30). Diese Kinetik fiel bereits bei der lokalen Expression des Leptins auf und wurde, aufgrund des korrelativen Zusammenhangs zum Körpergewicht (Jéquier 2002), im Kontext einer frühzeitigen Arthritis-Manifestation diskutiert. 4 Wochen nach CIA-Induktion zeigten mehr HFD CIA Tiere inflammatorische Gelenkprozesse und höhere lokale Leptin- und Visfatin-Konzentrationen. Bisher wurden die „verfrühten“ Entzündungszeichen im Kontext der HFD und der lokalen Leptin-Expression diskutiert. Eine frühzeitige Arthritis-Manifestation könnte jedoch auch unabhängig von diätetischen Einflüssen, durch Visfatin induziert worden sein. Hinweise dafür liefert eine Studie von Lie *et al.*, bei der es im Rahmen eines CIA-Modells bei Visfatin defizienten DBA/1J Mäusen, unabhängig

von diätetischen Einflüssen, zu einer verzögerten Manifestation der Arthritis gekommen war. Folglich könnte Visfatin einen beschleunigenden Einfluss auf den Beginn der CIA gehabt haben, was in diesem Projekt durch die signifikant höhere Visfatin-Expression im Gelenk bei HFD CIA Tieren bestätigt werden würde. Außerdem zeigte sich bei ND CIA Tieren erst verspätet, also nach 5,5 Wochen, eine deutliche Zunahme des Scores, die schließlich wieder signifikant abnahm (Abbildung 30).

In einer weiteren Studie konnte zudem durch die selektive Inhibierung von Visfatin eine verminderte IL-6 Synthese durch Makrophagen sowie eine verlangsamte klinische Progredienz der CIA bei DBA/1 Mäusen beobachtet werden, was die proentzündliche Rolle des Adipokins unterstützt (Présumey et al. 2013).

In humanen Studien konnten bei Patienten mit RA erhöhte Serum Visfatin-Spiegel im Vergleich zu gesunden Patienten beobachtet werden (Lee und Bae 2018), (Franco-Trepat et al. 2019). Zudem korrelierten Visfatin Konzentrationen bei Patienten mit RA sowohl in Proben aus der Gelenkflüssigkeit als auch in Serumproben mit dem Schweregrad der Arthritis und der klinischen Entzündungsaktivität (Brentano et al. 2007). Dies impliziert, auch in Anlehnung an die lokale Visfatin-Expression in diesem Projekt, dass Visfatin maßgeblich an entzündlichen Prozessen im Gelenk beteiligt sein könnte. Zudem könnte Visfatin einerseits als diagnostischer Parameter zur Evaluation der Krankheitsintensität und andererseits auch zur Verlaufskontrolle der RA bestimmt werden (Franco-Trepat et al. 2019).

Neben einem diagnostischen Nutzen ließe sich möglicherweise auch therapeutisch durch eine selektive Antagonisierung, zumindest im arthritischen Gelenk, eine Krankheitsremission erreichen. Vergleichbare molekulare Antagonisten, die speziell in die Visfatin vermittelte NAD-Synthese eingreifen, wurden bereits in Studien mit geringer Probandenzahl im Rahmen von Krebstherapien getestet, erwiesen sich aber aufgrund des Nebenwirkungsspektrums als unzureichend effektiv und benötigen weiterer Forschung (Heideman et al. 2010), (Franco-Trepat et al. 2019). Der therapeutische Einsatz spezieller Visfatin-Inhibitoren ist zudem bei der RA als systemische Autoimmunerkrankung kritisch zu sehen, da Visfatin eine bedeutende Rolle im Rahmen der zellulären NAD Synthese einnimmt, welches wiederum als essentielles Coenyzm an verschiedensten metabolischen Prozessen beteiligt ist. Die Nebenwirkungen einer systemischen Antagonisierung könnten womöglich den Symptomen eines NAD-Mangels und dem Krankheitsbild Pellagra ähneln (Wan et al. 2011). Eine Antagonisierung scheint daher nur im lokalen, gelenknahen Kontext

sinnvoll zu sein, was folglich keiner kurativen systemischen Therapie, sondern vielmehr die Linderung gelenkpezifischer Entzündungsprozesse unterstützen könnte.

Unklar verbleibt der Zusammenhang zwischen HFD-induziertem Übergewicht und Visfatin. So konnten in einigen Studien bei adipösen Menschen erhöhte Serum Visfatin-Spiegel nachgewiesen werden (Chang et al. 2011). Zudem kam es durch eine Gewichtsabnahme mittels bariatrischer Chirurgie zu einer signifikanten Abnahme der Visfatin-Serumspiegel bei adipösen Frauen (Terra et al. 2012). Im Gegensatz dazu führte die Induktion einer HFD bei Mäusen zu einer Reduktion von Visfatin (Yoshino et al. 2011a), (Nielsen et al. 2018). Anhand der in diesem Projekt erhobenen Daten ließ sich jedoch kein spezifischer Zusammenhang zwischen Übergewicht und Visfatin-Expression erkennen (Abbildung 8, 30). Gleichermaßen wiesen gesunde ND und HFD Tiere keine signifikanten Unterschiede in den systemischen Visfatin-Spiegeln auf (Abbildung 39). Auffallend war jedoch, dass die Induktion der CIA und damit die Gabe eines entzündlichen Stimulus, diese Tendenzen der gesunden Tiere veränderte. So kam es vor allem bei HFD CIA Tieren ausgehend von geringen Serumspiegeln in der 4 Wochengruppe zu einer deutlichen Zunahme 5,5 Wochen nach Immunisierung (Abbildung 39). Gegenteilig verhielt sich die lokale Visfatin-Expression, die ihr Maximum in der 4 Wochengruppe hatte und über den weiteren Zeitverlauf signifikant abnahm. Systemische und lokale Visfatin Konzentrationen stimmten folglich nicht überein und verhielten sich durch die CIA-Induktion teilweise entgegengesetzt.

Die bereits beschriebenen Gemeinsamkeiten der lokalen Visfatin- und Leptin-Expression, spiegelten sich auch in den Korrelationsanalysen wieder. So kam es bei sämtlichen Gruppen zu einem korrelativen Zusammenhang zwischen Visfatin- und Leptin-Scores (Tabelle 33). Dies impliziert, dass sich sowohl Leptin als auch Visfatin im lokalen Gelenk ähnlich verhielten und womöglich auch reguliert wurden. Interessanterweise konnte in einer Studie an C57BL/6JBomTac Mäusen durch die Gabe von Leptin eine Erhöhung der NAMPT-Spiegel (Visfatin) im Hypothalamus beobachtet werden (Guia et al. 2020), was ebenfalls einen Zusammenhang von Visfatin und Leptin in anderen körpereignen Strukturen impliziert. Im Gegensatz dazu ließ sich in dieser Arbeit jedoch kein Zusammenhang zwischen systemischen Konzentrationen von Visfatin und Leptin feststellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in diesem Projekt kein direkter Einfluss von Visfatin, auf die Intensität der CIA feststellen ließ. Allerdings implizierte die ausgeprägte, lokale Visfatin-Expression bei HFD CIA Tieren bereits 4 Wochen nach

Immunisierung, dass Visfatin die entzündlichen Prozesse beschleunigt haben und folglich eine bedeutende Rolle als Entzündungsmediator könnte. Um diesen Zusammenhang genauer zu beleuchten, könnten in zukünftigen Studien mit einem vergleichbaren HFD-CIA-Modell, zusätzlich Visfatin-defiziente Mäuse hinsichtlich der zeitlichen Arthritis-Manifestation, aber auch der Intensität der Arthritis, untersucht werden.

4.3.3 Adiponektin

Im Vergleich zu Leptin und Visfatin, sind für Adiponektin in der Literatur bereits eine Vielzahl von gegensätzlichen Wirkungen beschrieben worden. So scheint Adiponektin im systemischen Kreislauf protektiv hinsichtlich der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes oder einer Insulinresistenz zu wirken. Zudem besitzt das Zytokin auch antiinflammatorische Fähigkeiten, die beispielsweise das Risiko von atherosklerotischen Gefäßveränderungen reduzieren (Fatel et al. 2018). Adiponektin verfügt im rheumatologischen Kontext eher über proinflammatorische Eigenschaften, indem es beispielsweise die Synthese von proinflammatorischen Substanzen wie Prostaglandin E2, IL-6, IL-8, MMPs-1 fördern kann (Frommer et al. 2010). Interessanterweise ließen sich auch in diesem murinen CIA-Modell Hinweise für unterschiedliche Wirkungen des Adiponektins beobachten.

Wie bereits bei Leptin und Visfatin beschrieben, kam es bei HFD CIA Tieren zum 4 Wochenzeitpunkt zu einer signifikant höheren Adiponektin-Expression im Gelenk, im Vergleich zu den gesunden HFD und den erkrankten ND Tieren, welche im Zeitverlauf wieder signifikant abnahm (Abbildung 33 und 34). 4 Wochen nach Arthritis-Induktion zeigten mehr HFD CIA Tiere inflammatorische Gelenkprozesse sowie höhere lokale Expressionen aller untersuchten Adipokine Leptin, Visfatin und Adiponektin. Folglich könnte auch Adiponektin in Zusammenhang mit der HFD frühzeitig entzündliche Prozesse im Gelenk begünstigt haben. Unterstützt wird dies auch indirekt durch die ND CIA Tiere, bei denen es erst 5,5 Wochen nach Immunisierung zu einer Zunahme der lokalen Adiponektin-Expression kam, die schließlich ebenfalls wieder 7 Wochen nach CIA-Induktion abgenommen hatte (Abbildung 34).

In einem murinen CIA-Modell mit DBA/1J Mäusen konnte durch die intraartikuläre Injektion von Adiponektin eine frühzeitige und intensivere Arthritis induziert werden (Sun et al. 2015). Interessanterweise kam es in der gleichen Studie, in der frühen Phase der Arthritis (Tag 35 nach erstmaliger Immunisierung) zu einer deutlich erhöhten

Adiponektin-Expression im Gelenk, die jedoch 45 Tage nach erstmaliger Arthritis wieder abnahm. Die untersuchten DBA/1J Mäuse erhielten während des Studienverlaufs keine hochkalorische Diät. Vergleicht man nun diese Ergebnisse mit den erhobenen Adiponektin-Scores in diesem Projekt, so kam es bei ND CIA Tieren zu sehr ähnlichen Zeitpunkten einerseits zu einer Erhöhung der lokalen Adiponektin-Signalantwort (5,5 Wochen, entspricht Tag 38) und andererseits 7 Wochen nach Immunisierung (entspricht Tag 49) zu einer Abnahme der Expression. Außerdem zeigten die ND CIA Tiere, wie an Tag 35 in der Studie von *Sun et al.*, zum 5,5 Wochenzeitpunkt den höchsten Adiponektin- sowie den höchsten CIA-Score (Abbildung 21), was für einen proinflammatorischen Effekt des Adiponektins im gelenknahen Kontext spricht. In einer weiteren murinen Studie an DBA/1J Mäusen konnte ebenfalls durch die intraartikuläre Injektion von Adiponektin eine stärkere synoviale Entzündungsreaktion beobachtet werden (Liu et al. 2020). Das Zusammenspiel von HFD und Adiponektin wurde von Sun *et al.* nicht untersucht, allerdings scheint es durchaus möglich, dass zusätzlich zur Wirkung des Adiponektins, die HFD-Induktion den Beginn der Arthritis beschleunigte. Dies würde durch die hohe lokale Adiponektin-Expression der HFD CIA Tiere in der 4 Wochengruppe (Tag 28) bestätigt werden.

Interessanterweise hatten bereits auch Deng *et al.* eine frühzeitige und stärkere Arthritis in einem CIA-Modell beschrieben, was den Autoren zufolge auf eine verstärkte Aktivität der Th-17 Zellen durch Leptin zurückzuführen war. Auch Sun *et al.* führten die frühzeitige Arthritis auf eine verstärkte Aktivität von Th-17 Zellen zurück, die jedoch laut dieser Studie durch Adiponektin stimuliert wurde. Folglich sollten weitere Versuche mit anderen Adipokinen durchgeführt werden, um die jeweilige Rolle des Adipokins in Zusammenhang mit der Th-17 Aktivität und einer damit einhergehenden verfrühten und verstärkten Arthritis, besser beurteilen zu können.

Einen weiteren Erklärungsansatz biete eine Studie von Kontny *et al.*, in der durch Adiponektin RASF stärker auf einen proinflammatorischen Stimulus reagierten (Kontny et al. 2015). Dies unterstützt die Datenlage, dass die hohe Adiponektin-Expression in diesem Projekt eine frühzeitige und stärkere Entzündungsreaktion im Gelenk bedingt haben kann und dass Adiponektin vor allem in der frühen Phase der RA eine essentielle Rolle als Entzündungsmediator spielt.

Da Adipokine vor allem von weißem Fettgewebe synthetisiert und freigesetzt werden (Proença et al. 2014), wäre es durchaus logisch, dass die HFD eine vermehrte

Freisetzung des Adiponektins bedingte. Schlussfolgernd würde das bedeuten, dass auch bei gesunden HFD Tieren eine Erhöhung der lokalen Adiponektin-Expression zu beobachten gewesen wäre. Es ließ sich jedoch kein solcher Zusammenhang darstellen, da sich die Anzahl Adiponektin positiver Zellen im Gelenk zwischen gesunden ND und HFD Tieren nicht unterschied (Abbildung 33). Folglich bedingt die HFD-Induktion für sich, keine Erhöhung der lokalen Adiponektin-Expression, sondern vielmehr in Zusammenspiel mit dem entzündlichen Stimulus durch die CIA-Induktion. Auch die systemischen Adiponektin-Spiegel, die bereits von Hülser 2019 erhoben wurden, erfuhren durch die HFD-Induktion keine Zunahme, vielmehr kam es bei gesunden HFD Tieren zu einer leichten Abnahme, 7 Wochen nach Immunisierung (Hülser 2019). Letzteres ist bereits in der Literatur als antiproportionaler Zusammenhang zwischen systemischem Adiponektin-Konzentrationen und dem Körpergewicht bzw. BMI beschrieben worden (Hu et al. 1996), (Nigro et al. 2014), (Gariballa et al. 2019).

In einigen human Studien sind hohe Adiponektin-Spiegel mit einem verminderten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert (Hotta et al. 2000). Diese antiinflammatorischen Eigenschaften des Hormons stehen im Gegensatz zu den bisher im gelenknahen Kontext diskutierten proinflammatorischen Wirkungen. Vergleicht man die lokale und systemische Adiponektin-Konzentration bei HFD CIA Tieren, so ließ sich ein inverser Zusammenhang feststellen ($r^2 = 0,45$; Abbildung 46). Im Gegensatz zu der hohen lokalen Expression wiesen HFD CIA Tiere 4 Wochen nach Immunisierung niedrige systemische Adiponektin-Spiegel auf. Zudem ließ sich über den Zeitverlauf eine Zunahme der systemischen Konzentration, entgegengesetzt zur lokalen Expression, beobachten. Des Weiteren korrelierten systemische CRP-Werte mit der Höhe des Adiponektin-Scores bei HFD CIA Tieren (Abbildung 46). Umgekehrt kam es bei hohen systemischen Adiponektin-Spiegeln zu geringen systemischen CRP-Werten. Interessanterweise konnte auch in einer humanen Studie bei Patienten mit RA ein inverser Zusammenhang zwischen CRP- und systemischen Adiponektin-Spiegeln beobachtet werden, bei dem die Patienten trotz schwerer RA und hohem CRP verminderte Adiponektin-Spiegel aufwiesen (Gonzalez-Gay et al. 2008). Auch unabhängig von arthritischen Erkrankungen, konnte bei adipösen Frauen ein inverser Zusammenhang zwischen systemischen CRP- und Adiponektin-Spiegeln beobachtet werden (Menezes et al. 2019). Im Gegensatz dazu gibt es auch humane Studien, die eine positive Korrelation zwischen Schweregrad der RA sowie dem radiologischen

Gelenkschaden und den systemischen Adiponektin-Spiegeln beobachten konnten (Rho et al. 2009), (Klein-Wieringa et al. 2011).

Trotz der heterogenen Datenlage finden sich einige Hinweise, dass im Zuge der systemischen Abnahme der CRP-Werte und der damit einhergehenden signifikanten Zunahme der systemischen Adiponektin-Konzentrationen, Adiponektin im systemischen Kontext an antiinflammatorischen Prozessen beteiligt sein könnte (Folco et al. 2009). Eine hohe lokale Adiponektin-Expression war in diesem Projekt mit hohen CRP-Werten assoziiert und spiegelte den proinflammatorischen Einfluss auf das gelenknahe Entzündungsgeschehen wieder (r^2= 0,54; Abbildung 46).

Die verschiedenen Eigenschaften des Adiponektins und die heterogenen Studienergebnisse lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Isoformen und Rezeptoren des Hormons erklären (Garaulet et al. 2007). In diesem Projekt wurden mit dem verwendetem ELISA-Kit sämtliche Isoformen des Adiponektins gemessen, was eine spezifische Aufschlüsselung Isoformen abhängiger Effekte nicht zuließ. Die Komplexität des Adiponektins und dessen heterogene Eigenschaften erschweren zudem die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien. Es konnten jedoch bereits Isoform spezifische monoklonale Antikörper gegen Adiponektin hergestellt werden, die auch in einem CIA-Modell an DBA/1J Mäusen eine Reduktion der Gelenkentzündung sowie eine geringfügige Reduktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und IL-6 erzielen konnten (Lee et al. 2018). Interessanterweise gibt es jedoch auch Adiponektin-Rezeptor-Agonisten, wie beispielsweise „AdipoRon*"*, durch den in murinen Studien signifikante antidiabetische Effekte vermittelt sowie proinflammatorisch codierende Gensequenzen für Zytokine wie IL-6 in ihrer Expression reduziert wurden (Okada-Iwabu et al. 2013). Auch im Rahmen einer onkologischen Studie konnte durch die Gabe von „AdipoRon" das Wachstum pankreatischer Tumorzellen reduziert werden (Messaggio et al. 2017). Dies impliziert, dass Adiponektin neben der RA auch für weitere Krankheitsentitäten ein attraktives therapeutisches Ziel darstellt. Möglicherweise lassen sich zukünftig durch die selektive Beeinflussung Adiponektin vermittelter Signalkaskaden proinflammatorische Wirkungen, beispielsweise im Rahmen der RA unterbinden und gleichzeitig antiinflammatorische Effekte, wie antidiabetische sowie anti-atherosklerotische Prozesse, fördern. Eine therapeutische Antagonisierung aller Isoformen scheint jedoch aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen und des limitierten Nutzen-Risiko-Verhältnisses nicht empfehlenswert.

Zusammenfassend kam es bei allen HFD CIA Tieren zu einer Zunahme aller lokal untersuchten Adipokin-Expressionen. Trotz verschiedener Parallelen in der Literatur, ließ sich in diesem Projekt eine spezifische Ursache, dass wesentlich mehr HFD CIA Tiere bereits 4 Wochen nach Immunisierung erkrankt waren, nicht eindeutig herausarbeiten. Allerdings impliziert die Tatsache, dass dies nur bei HFD Tieren beobachtet werden konnte, einen definitiven Zusammenhang mit Übergewicht bzw. Adipositas. Um den selektiven Einfluss der Adipokine Leptin, Visfatin und Adiponektin genauer analysieren zu können, müsste in zukünftigen Studien anhand eines vergleichbaren HFD-CIA-Modells, eine selektive Inhibition der jeweiligen Adipokine erfolgen.

5. Zusammenfassung

Die RA als chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung gewinnt global gesehen und vor allem in der westlichen Welt zunehmend an Bedeutung. Trotz intensiver Forschung hat bis heute noch kein kurativer Therapieansatz den klinischen Alltag erreichen können, was vor allem auf die multifaktorielle Pathogenese der Erkrankung zurückgeführt wird (Woolf et al. 2012), (Robert Koch Institut 2015).

Ziel dieser Arbeit war es spezifische Scores zur Charakterisierung und Einteilung der in einem CIA-Modell induzierten Arthritis zu erarbeiten, um einerseits mögliche Adipositas-induzierte Veränderungen auf die Intensität und Progredienz der Arthritis untersuchen zu können und andererseits die Rolle von Adipokinen wie Leptin, Visfatin und Adiponektin im Rahmen der entzündlichen Arthritis zu evaluieren.

Die induzierte Adipositas hatte in diesem Mausmodell keinen direkten Einfluss auf die Schwere der Arthritis, jedoch zeigten übergewichtige Tiere früher arthritische Gelenksveränderungen und damit Krankheitszeichen. Dies impliziert, dass auch beim Menschen eine Adipositas zu einer früheren Krankheitsmanifestation führen könnte und folglich trotz heterogener Studienlage als Risikofaktor berücksichtigt werden sollte (George und Baker 2016). Zudem verdichten sich die Hinweise, dass sich die Adipositas auch negativ auf die Effektivität medikamentöser Therapiestrategien auswirken kann (Schäfer et al. 2020).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit vor allem bei übergewichtigen Tieren eine erhöhte gelenknahe Expression von Leptin, Visfatin und Adiponektin festgestellt werden, die sich einhergehend mit systemischen und gelenksnahen Entzündungszeichen sehr wahrscheinlich negativ und damit proentzündlich auf die Arthritis ausgewirkt haben. Auffallend war, dass sich diese Beobachtungen in den systemischen Messwerten aller untersuchten Adipokine nicht widerspiegelten und sich speziell bei Adiponektin invers zueinander verhielten. Die Rolle der systemischen vs. lokalen Adipokine sollte folglich auch beim Menschen differenziert betrachtet werden, da zudem bereits unterschiedliche Wirkungen im gelenknahen und systemischen Kontext beobachtet werden konnten (Frommer et al. 2010), (Orlando et al. 2019).

Aufgrund des proinflammatorischen Einflusses der Adipokine im lokalen Gelenk scheint eine selektive Beeinflussung der durch Adipokine vermittelten Signalkaskaden durchaus attraktiv. Jedoch sollten sich die Entwickler dieser Therapiestrategien der lokalisationsabhängigen Unterschiede in Bezug auf Wirkung und Regulation bewusst sein und möglichst lokal, aufgrund eines hohen zu erwartenden Nebenwirkungspotentials und nicht systemisch ihre Wirkung entfalten.

6. Summary

RA is a chronic systemic inflammatory autoimmune disease with increasing influence globally and especially in the Western world. Despite intensive research, therapies are not curative yet, due to the multifactorial pathogenesis of RA (Woolf et al. 2012), (Robert Koch Institut 2015). The objective of this work was to develop specific scores for characterisation and classification of arthritic processes in a murine CIA-model, to examine obesity induced changes on intensity and progression on the one hand and on the other hand to evaluate the role of adipokines like leptin, visfatin and adiponektin in an arthritic setting. Induction of obesity did not have a significant influence on arthritis severity, although obese animals showed earlier signs of disease compared to normal weight animals. Transferred to human beings, obesity might accelerate onset of RA and should be considered as a risk factor despite heterogeneous studies (George und Baker 2016). Additionally, there is increasing evidence that obesity reduces the effectiveness of medication treatment in RA (Schäfer et al. 2020) which emphasises the importance of obesity in RA even if it does not have an direct effect on disease severity. Interestingly, we could observe an elevated adipokine expression in the joints, especially in obese animals which might have, according to elevated systemic and local inflammation markers, a proinflammatory effect on joint arthritis. In contrast to that, systemic adipokine expression did not match and especially for adiponektin an inverse correlation could be observed. As a consequence, the effect and regulation of systemic and local adipokine expression should be considered differentially. Moreover, contrasting effects have already been described (Frommer et al. 2010), (Orlando et al. 2019). Due to the proinflammatory effects of adipokines in the local joint, a selective interference of adipokine mediated signalling cascades seems to be an attractive therapy target. However, attention should be paid to the various effects of adipokines depending on the localisation, as systemic intervention might have several side effects, which could be avoided by local application and impact of the medical treatment strategy.

7. Abbkürzungsverzeichnis

ACPAs	Antikörper gegen citrullinierte Peptide/Proteine (aus dem Engl. *anticitrullinated peptide/protein antibodies*)
BMI	aus dem engl. *Body-Mass-Index*
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Unterscheidungsgruppen (aus dem Engl. *Cluster of Differentiation*)
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans (aus dem Engl. *complete Freund's adjuvant*)
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis (aus dem Engl. *collagen induced arthritis*)
CLS	aus dem Engl. *Crown-like structures*
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	et alia (aus dem Lateinischen *und andere*)
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum (aus dem Engl. *fetal calf serum*)
HE	Hämalaun / Eosin
HFD	Hochfettdiät (aus dem Engl. *high-fat diet*)
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix-Metalloproteasen
ND	normale Diät (Standardfutter für Mäuse)
RA	rheumatoide Arthritis
RT	Raumtemperatur
SF	synoviale Fibroblasten
SNP	single nucleotide polymorphisms
STAT	aus dem Engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TNF-α	Tumornekrosefaktor α

8. Literaturverzeichnis

Abella, Vanessa; Scotece, Morena; Conde, Javier; Pino, Jesús; Gonzalez-Gay, Miguel Angel; Gómez-Reino, Juan J. et al. (2017): Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. In: *Nature reviews. Rheumatology* 13 (2), S. 100–109. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.209.

Arastéh, K.; Baenkler, H.; Bieber, C. et al. (2018): Innere Medizin. Hrsg. 4, überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Balsan, Guilherme Ardenghi; Vieira, José Luiz da Costa; Oliveira, Aline Marcadenti de; Portal, Vera Lúcia (2015): Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. In: *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)* 61 (1), S. 72–80. DOI: 10.1590/1806-9282.61.01.072.

Behnes, Michael; Brueckmann, Martina; Lang, Siegfried; Putensen, Christian; Saur, Joachim; Borggrefe, Martin; Hoffmann, Ursula (2012): Alterations of leptin in the course of inflammation and severe sepsis. In: *BMC infectious diseases* 12, S. 217. DOI: 10.1186/1471-2334-12-217.

Berg, Aloys; Bischoff, Stephan C.; Colombo-Benkmann, Mario; Ellrott, Thomas; Hauner, Hans; Heintze, Christoph et al. (2014): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Prävention und Therapie der Adipositas. Version 2.0. Deutsche Adipositas Gesellschaft; Deutsche Diabetes Gesellschaft; Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.; Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin e.V.

Bessis, Natacha; Decker, Patrice; Assier, Eric; Semerano, Luca; Boissier, Marie-Christophe (2017): Arthritis models: usefulness and interpretation. In: *Seminars in immunopathology* 39 (4), S. 469–486. DOI: 10.1007/s00281-017-0622-4.

Bokarewa, M.; Bokarew, D.; Hultgren, O.; Tarkowski, A. (2003): Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (10), S. 952–956. DOI: 10.1136/ard.62.10.952.

Brand, David D.; Latham, Kary A.; Rosloniec, Edward F. (2007): Collagen-induced arthritis. In: *Nature protocols* 2 (5), S. 1269–1275. DOI: 10.1038/nprot.2007.173.

Brentano, Fabia; Schorr, Olivier; Ospelt, Caroline; Stanczyk, Joanna; Gay, Renate E.; Gay, Steffen; Kyburz, Diego (2007): Pre-B cell colony-enhancing factor/visfatin, a new marker of inflammation in rheumatoid arthritis with proinflammatory and matrix-degrading activities. In: *Arthritis and rheumatism* 56 (9), S. 2829–2839. DOI: 10.1002/art.22833.

Burhans, Maggie S.; Hagman, Derek K.; Kuzma, Jessica N.; Schmidt, Kelsey A.; Kratz, Mario (2018): Contribution of adipose tissue inflammation to the development of type 2 diabetes mellitus. In: *Comprehensive Physiology* 9 (1), S. 1–58. DOI: 10.1002/cphy.c170040.

Busso, Nathalie; Karababa, Mahir; Nobile, Massimo; Rolaz, Aline; van Gool, Frédéric; Galli, Mara et al. (2008): Pharmacological Inhibition of Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin Enzymatic Activity Identifies a New Inflammatory Pathway Linked to NAD. In: *PloS one* 3 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0002267.

Busso, Nathalie; So, Alexander; Chobaz-Péclat, Véronique; Morard, Carole; Martinez-Soria, Eduardo; Talabot-Ayer, Dominique; Gabay, Cem (2002): Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 168 (2), S. 875–882. DOI: 10.4049/jimmunol.168.2.875.

Cao, Haiming (2014): Adipocytokines in Obesity and Metabolic Disease. In: *The Journal of endocrinology* 220 (2), T47-59. DOI: 10.1530/JOE-13-0339.

Carrión, Mar; Frommer, Klaus W.; Pérez-García, Selene; Müller-Ladner, Ulf; Gomariz, Rosa P.; Neumann, Elena (2019): The Adipokine Network in Rheumatic Joint Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 20 (17). DOI: 10.3390/ijms20174091.

Chang, Yu-Hung; Chang, Dao-Ming; Lin, Kun-Cheng; Shin, Shyi-Jang; Lee, Yau-Jiunn (2011): Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. In: *Diabetes/metabolism research and reviews* 27 (6), S. 515–527. DOI: 10.1002/dmrr.1201.

Choe, Sung Sik; Huh, Jin Young; Hwang, In Jae; Kim, Jong in; Kim, Jae Bum (2016): Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. In: *Frontiers in Endocrinology* 7. DOI: 10.3389/fendo.2016.00030.

Coelho, Marisa; Oliveira, Teresa; Fernandes, Ruben (2013): Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. In: *Archives of medical science: AMS* 9 (2), S. 191–200. DOI: 10.5114/aoms.2013.33181.

Crowson, Cynthia S.; Matteson, Eric L.; Davis, John M.; Gabriel, Sherine E. (2013): Contribution of Obesity to the Rise in Incidence of Rheumatoid Arthritis. In: *Arthritis care & research* 65 (1), S. 71–77. DOI: 10.1002/acr.21660.

Darrieutort-Laffite, Christelle; Boutet, Marie-Astrid; Chatelais, Mathias; Brion, Régis; Blanchard, Frédéric; Heymann, Dominique; Le Goff, Benoit (2014): IL-1β and TNFα Promote Monocyte Viability through the Induction of GM-CSF Expression by Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. In: *Mediators of Inflammation* 2014. DOI: 10.1155/2014/241840.

Del Prete, Annalisa; Salvi, Valentina; Sozzani, Silvano (2014): Adipokines as Potential Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. In: *Mediators of Inflammation* 2014. DOI: 10.1155/2014/425068.

Deng, Jun; Liu, Yang; Yang, Min; Wang, Shengjun; Zhang, Miaojia; Wang, Xiaohui et al. (2012): Leptin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancement of Th17 cell response. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (11), S. 3564–3573. DOI: 10.1002/art.34637.

Di Carlo, C.; Tommaselli, G. A.; Nappi, C. (2002): Effects of sex steroid hormones and menopause on serum leptin concentrations. In: *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 16 (6), S. 479–491.

Dos Anjos Cassado, Alexandra (2017): F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. In: *Results and problems in cell differentiation* 62, S. 161–179. DOI: 10.1007/978-3-319-54090-0_7.

Elgazar-Carmon, Vered; Rudich, Assaf; Hadad, Nurit; Levy, Rachel (2008): Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. In: *Journal of lipid research* 49 (9), S. 1894–1903. DOI: 10.1194/jlr.M800132-JLR200.

Fatel, Elis Carolina de Souza; Rosa, Flávia Troncon; Simão, Andréa Name Colado; Dichi, Isaias (2018): Adipokines in rheumatoid arthritis. In: *Advances in rheumatology (London, England)* 58 (1), S. 25. DOI: 10.1186/s42358-018-0026-8.

Folco, Eduardo J.; Rocha, Viviane Z.; López-Ilasaca, Marco; Libby, Peter (2009): Adiponectin inhibits pro-inflammatory signaling in human macrophages independent of interleukin-10. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (38), S. 25569–25575. DOI: 10.1074/jbc.M109.019786.

Francisco, Vera; Pérez, Tamara; Pino, Jesús; López, Verónica; Franco, Eloy; Alonso, Ana et al. (2018): Biomechanics, obesity, and osteoarthritis. The role of adipokines: When the levee breaks. In: *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 36 (2), S. 594–604. DOI: 10.1002/jor.23788.

Franco-Trepat, Eloi; Alonso-Pérez, Ana; Guillán-Fresco, María; Jorge-Mora, Alberto; Gualillo, Oreste; Gómez-Reino, Juan J.; Gómez Bahamonde, Rodolfo (2019): Visfatin as a therapeutic target for rheumatoid arthritis. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 23 (7), S. 607–618. DOI: 10.1080/14728222.2019.1617274.

Fried, S. K.; Ricci, M. R.; Russell, C. D.; Laferrère, B. (2000): Regulation of leptin production in humans. In: *The Journal of nutrition* 130 (12), 3127S-3131S. DOI: 10.1093/jn/130.12.3127S.

Frommer, Klaus W.; Zimmermann, Birgit; Meier, Florian M. P.; Schröder, Dirk; Heil, Matthias; Schäffler, Andreas et al. (2010): Adiponectin-mediated changes in effector cells involved in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (10), S. 2886–2899. DOI: 10.1002/art.27616.

Garaulet, Marta; Hernández-Morante, Juan J.; Heredia, Fátima Pérez de; Tébar, Francisco J. (2007): Adiponectin, the controversial hormone. In: *Public health nutrition* 10 (10A), S. 1145–1150. DOI: 10.1017/S1368980007000638.

Gariballa, Salah; Alkaabi, Juma; Yasin, Javed; Al Essa, Awad (2019): Total adiponectin in overweight and obese subjects and its response to visceral fat loss. In: *BMC Endocrine Disorders* 19. DOI: 10.1186/s12902-019-0386-z.

George, Michael D.; Baker, Joshua F. (2016): The Obesity Epidemic and Consequences for Rheumatoid Arthritis Care. In: *Current rheumatology reports* 18 (1), S. 6. DOI: 10.1007/s11926-015-0550-z.

Gilat, Tuvia; Leikin-Frenkel, Alicia; Goldiner, Ilana; Juhel, Christine; Lafont, Huguette; Gobbi, Diana; Konikoff, Fred M. (2003): Prevention of diet-induced fatty liver in experimental animals by the oral administration of a fatty acid bile acid conjugate (FABAC). In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 38 (2), S. 436–442. DOI: 10.1053/jhep.2003.50348.

Giles, Jon T.; Ferrante, Antony W.; Broderick, Rachel; Zartoshti, Afshin; Rose, Janine; Downer, Kendall et al. (2018): Adipose Tissue Macrophages in Rheumatoid Arthritis: Prevalence, Disease-Related Indicators, and Associations With Cardiometabolic Risk Factors. In: *Arthritis care & research* 70 (2), S. 175–184. DOI: 10.1002/acr.23253.

Gilles, C.; Polette, M.; Piette, J.; Delvigne, A. C.; Thompson, E. W.; Foidart, J. M.; Birembaut, P. (1996): Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. In: *The Journal of pathology* 180 (2), S. 175–180. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199610)180:2<175::AID-PATH630>3.0.CO;2-G.

Gonzalez-Gay, M. A.; Llorca, J.; Garcia-Unzueta, M. T.; Gonzalez-Juanatey, C.; Matias, J. M. de; Martin, J. et al. (2008): High-grade inflammation, circulating adiponectin concentrations and cardiovascular risk factors in severe rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 26 (4), S. 596–603.

Gremese, Elisa; Carletto, Antonio; Padovan, Melissa; Atzeni, Fabiola; Raffeiner, Bernd; Giardina, Anna Rita et al. (2013): Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: an approach to a personalized medicine. In: *Arthritis care & research* 65 (1), S. 94–100. DOI: 10.1002/acr.21768.

Guia, Roldan M. de; Hassing, Anna S.; Skov, Louise J.; Ratner, Cecilia; Plucińska, Kaja; Madsen, Søren et al. (2020): Fasting- and ghrelin-induced food intake is regulated by NAMPT in the hypothalamus. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 228 (4), e13437. DOI: 10.1111/apha.13437.

Hair, Maria J. H. de; Landewé, Robert B. M.; van de Sande, Marleen G. H.; van Schaardenburg, Dirkjan; van Baarsen, Lisa G. M.; Gerlag, Danielle M.; Tak, Paul P. (2012): Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid

arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 72 (10), S. 1654–1658. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202254.

Heideman, A. von; Berglund, A.; Larsson, R.; Nygren, P. (2010): Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (6). DOI: 10.1007/s00280-009-1125-3.

Hizmetli, Sami; Kisa, Mustafa; Gokalp, Nurdagül; Bakici, M. Zahir (2007): Are plasma and synovial fluid leptin levels correlated with disease activity in rheumatoid arthritis ? In: *Rheumatology international* 27 (4), S. 335–338. DOI: 10.1007/s00296-006-0264-7.

Hotta, K.; Funahashi, T.; Arita, Y.; Takahashi, M.; Matsuda, M.; Okamoto, Y. et al. (2000): Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20 (6), S. 1595–1599. DOI: 10.1161/01.atv.20.6.1595.

Hu, E.; Liang, P.; Spiegelman, B. M. (1996): AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (18), S. 10697–10703. DOI: 10.1074/jbc.271.18.10697.

Hülser, Marie-Lisa (2019): Adipozytokine als Bindeglied zwischen Metabolismus und arthritischen Veränderungen. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Ito, Hiromu; Moritoshi, Furu; Hashimoto, Motomu; Tanaka, Masao; Matsuda, Shuichi (2018): Control of articular synovitis for bone and cartilage regeneration in rheumatoid arthritis. In: *Inflammation and Regeneration* 38. DOI: 10.1186/s41232-018-0064-y.

Jéquier, Eric (2002): Leptin signaling, adiposity, and energy balance. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 967, S. 379–388. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04293.x.

Jhun, Joo-Yeon; Yoon, Bo-Young; Park, Mi-Kyung; Oh, Hye-Joa; Byun, Jae-Kyeong; Lee, Seon-Young et al. (2012): Obesity aggravates the joint inflammation in a collagen-induced arthritis model through deviation to Th17 differentiation. In: *Experimental & Molecular Medicine* 44 (7), S. 424–431. DOI: 10.3858/emm.2012.44.7.047.

Jiang, L.; Tian, W.; Wang, Y.; Rong, J.; Bao, C.; Liu, Y. et al. (2012): Body mass index and susceptibility to knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. In: *Joint bone spine* 79 (3). DOI: 10.1016/j.jbspin.2011.05.015.

Jung, Un Ju; Choi, Myung-Sook (2014): Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. In: *International journal of molecular sciences* 15 (4), S. 6184–6223. DOI: 10.3390/ijms15046184.

Kaufmann, Jörg; Kielstein, Volker; Kilian, Susann; Stein, Günter; Hein, Gert (2003): Relation between body mass index and radiological progression in patients with rheumatoid arthritis. In: *The Journal of rheumatology* 30 (11), S. 2350–2355.

Kim, Seung-Jae; Chen, Zhenlong; Essani, Abdul B.; Elshabrawy, Hatem A.; Volin, Michael V.; Fantuzzi, Giamila et al. (2017): Differential impact of obesity on the pathogenesis of RA or preclinical models is contingent on the disease status. In: *Annals of the rheumatic diseases* 76 (4), S. 731–739. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-209206.

Klein-Wieringa, I. R.; van, der Linden MP; Knevel, R.; Kwekkeboom, J. C.; van, Beelen E.; Huizinga, T. W. et al. (2011): Baseline serum adipokine levels predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (9). DOI: 10.1002/art.30449.

Kontny, E.; Janicka, I.; Skalska, U.; Maśliński, W. (2015): The effect of multimeric adiponectin isoforms and leptin on the function of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. In: *Scandinavian journal of rheumatology* 44 (5), S. 363–368. DOI: 10.3109/03009742.2015.1025833.

Krenn, V.; Morawietz, L.; Häupl, T.; Neidel, J.; Petersen, I.; König, A. (2002): Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. In: *Pathology, research and practice* 198 (5), S. 317–325. DOI: 10.1078/0344-0338-5710261.

Lafontan, M.; Girard, J. (2008): Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. In: *Diabetes & metabolism* 34 (4 Pt 1), S. 317–327. DOI: 10.1016/j.diabet.2008.04.001.

Lee, Sang-Won; Park, Min-Chan; Park, Yong-Beom; Lee, Soo-Kon (2007): Measurement of the serum leptin level could assist disease activity monitoring in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology international* 27 (6), S. 537–540. DOI: 10.1007/s00296-006-0253-x.

Lee, Yeon-Ah; Hahm, Dae-Hyun; Kim, Jung Yeon; Sur, Bonjun; Lee, Hyun Min; Ryu, Chun Jeih et al. (2018): Potential therapeutic antibodies targeting specific adiponectin isoforms in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 20. DOI: 10.1186/s13075-018-1736-3.

Lee, Young Ho; Bae, Sang-Cheol (2018): Circulating adiponectin and visfatin levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: A meta-analysis. In: *International journal of rheumatic diseases* 21 (3), S. 664–672. DOI: 10.1111/1756-185X.13038.

Li, Xuanan; Islam, Shamima; Xiong, Min; Nsumu, Ndona N.; Lee, Mark W.; Zhang, Li Qin et al. (2019): Epigenetic regulation of NfatC1 transcription and osteoclastogenesis

by nicotinamide phosphoribosyl transferase in the pathogenesis of arthritis. In: *Cell Death Discovery* 5. DOI: 10.1038/s41420-018-0134-6.

Liu, Rui; Zhao, Pengfei; Zhang, Qian; Che, Nan; Xu, Lingxiao; Qian, Jie et al. (2020): Adiponectin promotes fibroblast-like synoviocytes producing IL-6 to enhance T follicular helper cells response in rheumatoid arthritis. In: *Clinical and experimental rheumatology* 38 (1), S. 11–18.

Ljung, Lotta; Rantapää-Dahlqvist, Solbritt (2016): Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis – a nested case–control study. In: *Arthritis research & therapy* 18. DOI: 10.1186/s13075-016-1171-2.

Lohmander, L. S.; Gerhardsson de Verdier, M.; Rollof, J.; Nilsson, P. M.; Engström, G. (2009): Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study. In: *Annals of the rheumatic diseases* 68 (4), S. 490–496. DOI: 10.1136/ard.2008.089748.

Ludwig, T.; Worsch, S.; Heikenwalder, M.; Daniel, H.; Hauner, H.; Bader, B. L. (2013): Metabolic and immunomodulatory effects of n-3 fatty acids are different in mesenteric and epididymal adipose tissue of diet-induced obese mice. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 304 (11). DOI: 10.1152/ajpendo.00171.2012.

M^{ac}Donald, Iona J.; Liu, Shan-Chi; Huang, Chien-Chung; Kuo, Shu-Jui; Tsai, Chun-Hao; Tang, Chih-Hsin (2019): Associations between Adipokines in Arthritic Disease and Implications for Obesity. In: *International journal of molecular sciences* 20 (6). DOI: 10.3390/ijms20061505.

Madanagobalane, Shraddha; Anandan, Sankarasubramanian (2012): The increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in psoriatic patients: a study from South India. In: *The Australasian journal of dermatology* 53 (3), S. 190–197. DOI: 10.1111/j.1440-0960.2012.00905.x.

Maeda, Kazuhisa; Okubo, Kousaku; Shimomura, Iichiro; Funahashi, Tohru; Matsuzawa, Yuji; Matsubara, Kenichi (2012): cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). 1996. In: *Biochemical and biophysical research communications* 425 (3), S. 556–559. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.023.

Martinez-Santibañez, Gabriel; Cho, Kae Won; Lumeng, Carey N. (2014): Imaging white adipose tissue with confocal microscopy. In: *Methods in enzymology* 537, S. 17–30. DOI: 10.1016/B978-0-12-411619-1.00002-1.

McInnes, I. B.; Schett, G. (2007): Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (6). DOI: 10.1038/nri2094.

McInnes, Iain B.; Schett, Georg (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *The New England journal of medicine* 365 (23), S. 2205–2219. DOI: 10.1056/NEJMra1004965.

Menezes, Ana Maria Baptista; Oliveira, Paula Duarte; Wehrmeister, Fernando César; Assunção, Maria Cecilia F.; Oliveira, Isabel O.; Tovo-Rodrigues, Luciana et al. (2019): Association of modifiable risk factors and IL-6, CRP, and adiponectin: Findings from the 1993 Birth Cohort, Southern Brazil. In: *PloS one* 14 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0216202.

Messaggio, Fanuel; Mendonsa, Alisha M.; Castellanos, Jason; Nagathihalli, Nagaraj S.; Gorden, Lee; Merchant, Nipun B.; VanSaun, Michael N. (2017): Adiponectin receptor agonists inhibit leptin induced pSTAT3 and in vivo pancreatic tumor growth. In: *Oncotarget* 8 (49), S. 85378–85391. DOI: 10.18632/oncotarget.19905.

Moschen, Alexander R.; Kaser, Arthur; Enrich, Barbara; Mosheimer, Birgit; Theurl, Milan; Niederegger, Harald; Tilg, Herbert (2007): Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (3), S. 1748–1758. DOI: 10.4049/jimmunol.178.3.1748.

Myers, L. K.; Rosloniec, E. F.; Cremer, M. A.; Kang, A. H. (1997): Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. In: *Life sciences* 61 (19), S. 1861–1878. DOI: 10.1016/s0024-3205(97)00480-3.

Na, Hyun Sik; Kwon, Jeong-Eun; Lee, Seung Hoon; Jhun, JooYeon; Kim, Sung-Min; Kim, Se-Young et al. (2017): Th17 and IL-17 Cause Acceleration of Inflammation and Fat Loss by Inducing α2-Glycoprotein 1 (AZGP1) in Rheumatoid Arthritis with High-Fat Diet. In: *The American journal of pathology* 187 (5), S. 1049–1058. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.12.023.

Nakano, Y.; Tobe, T.; Choi-Miura, N. H.; Mazda, T.; Tomita, M. (1996): Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. In: *Journal of biochemistry* 120 (4), S. 803–812. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021483.

Neumann, E.; Frommer, K. W.; Vasile, M.; Müller-Ladner, U. (2011): Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? In: *Arthritis and rheumatism* 63 (5), S. 1159–1169. DOI: 10.1002/art.30291.

Neumann, Elena; Junker, Susann; Schett, Georg; Frommer, Klaus; Müller-Ladner, Ulf (2016): Adipokines in bone disease. In: *Nature reviews. Rheumatology* 12 (5), S. 296–302. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.49.

Nguyen, Khoa D.; Qiu, Yifu; Cui, Xiaojin; Goh, Y. SharonP.; Mwangi, Julia; David, Tovo et al. (2011): Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis. In: *Nature* 480 (7375), S. 104–108. DOI: 10.1038/nature10653.

Nielsen, Karen Nørgaard; Peics, Julia; Ma, Tao; Karavaeva, Iuliia; Dall, Morten; Chubanava, Sabina et al. (2018): NAMPT-mediated NAD+ biosynthesis is indispensable for adipose tissue plasticity and development of obesity. In: *Molecular metabolism* 11, S. 178–188. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.02.014.

Nigro, Ersilia; Scudiero, Olga; Monaco, Maria Ludovica; Palmieri, Alessia; Mazzarella, Gennaro; Costagliola, Ciro et al. (2014): New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. In: *BioMed Research International* 2014. DOI: 10.1155/2014/658913.

Noureddin, Mazen; Sanyal, Arun J. (2018): Pathogenesis of NASH: The Impact of Multiple Pathways. In: *Current hepatology reports* 17 (4), S. 350–360. DOI: 10.1007/s11901-018-0425-7.

Okada-Iwabu, M.; Yamauchi, T.; Iwabu, M.; Honma, T.; Hamagami, K.; Matsuda, K. et al. (2013): A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. In: *Nature* 503 (7477). DOI: 10.1038/nature12656.

Orlando, Antonina; Nava, Elisa; Giussani, Marco; Genovesi, Simonetta (2019): Adiponectin and Cardiovascular Risk. From Pathophysiology to Clinic: Focus on Children and Adolescents. In: *International journal of molecular sciences* 20 (13). DOI: 10.3390/ijms20133228.

Otero, M.; Lago, R.; Gomez, R.; Lago, F.; Dieguez, C.; Gómez-Reino, J. J.; Gualillo, O. (2006): Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 65 (9), S. 1198–1201. DOI: 10.1136/ard.2005.046540.

Palmer, G.; Gabay, C. (2003): A role for leptin in rheumatic diseases? In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (10), S. 913–915. DOI: 10.1136/ard.62.10.913.

Popa, C.; Netea, M.; Radstake, T.; van Riel, P. L.; Barrera, P.; van der Meer, J. W. M. (2005): Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 64 (8), S. 1195–1198. DOI: 10.1136/ard.2004.032243.

Présumey, Jessy; Courties, Gabriel; Louis-Plence, Pascale; Escriou, Virginie; Scherman, Daniel; Pers, Yves-Marie et al. (2013): Nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin expression by inflammatory monocytes mediates arthritis pathogenesis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 72 (10), S. 1717–1724. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202403.

Proença, A. R. G.; Sertié, R. A. L.; Oliveira, A. C.; Campaña, A. B.; Caminhotto, R. O.; Chimin, P.; Lima, F. B. (2014): New concepts in white adipose tissue physiology. In: *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* 47 (3), S. 192–205.

Qin, Baodong; Yang, Min; Fu, Haitao; Ma, Ning; Wei, Tingting; Tang, Qingqin et al. (2015): Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. In: *Arthritis research & therapy* 17 (1). DOI: 10.1186/s13075-015-0601-x.

Rheinländer, Andreas; Schraven, Burkhart; Bommhardt, Ursula (2018): CD45 in human physiology and clinical medicine. In: *Immunology letters* 196, S. 22–32. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.009.

Rho, Young Hee; Solus, Joseph; Sokka, Tuulikki; Oeser, Annette; Chung, Cecilia P.; Gebretsadik, Tebeb et al. (2009): Adipocytokines Are Associated with Radiographic Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 60 (7), S. 1906–1914. DOI: 10.1002/art.24626.

Robert Koch Institut (2015): Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS. RKI, Berlin. Unter Mitarbeit von Anke-Christine Saß, Thomas Lampert, Thomas Ziese und Bärbel-Maria Kurth.

Roeb, E.; Steffen, H. M.; Bantel, H.; Baumann, U.; Canbay, A.; Demir, M. et al. (2015): S2k-Leitlinie nicht alkoholische Fettlebererkrankungen. In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 53 (7), S. 668–723. DOI: 10.1055/s-0035-1553193.

Russolillo, Anna; Iervolino, Salvatore; Peluso, Rosario; Lupoli, Roberta; Di Minno, Alessandro; Pappone, Nicola; Di Minno, Matteo Nicola Dario (2013): Obesity and psoriatic arthritis: from pathogenesis to clinical outcome and management. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 52 (1), S. 62–67. DOI: 10.1093/rheumatology/kes242.

Sandberg, Maria E. C.; Bengtsson, Camilla; Källberg, Henrik; Wesley, Annmarie; Klareskog, Lars; Alfredsson, Lars; Saevarsdottir, Saedis (2014): Overweight decreases the chance of achieving good response and low disease activity in early rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 73 (11), S. 2029–2033. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-205094.

Schäfer, Martin; Meißner, Yvette; Kekow, Jörn; Berger, Sylvia; Remstedt, Sven; Manger, Bernhard et al. (2020): Obesity reduces the real-world effectiveness of cytokine-targeted but not cell-targeted disease-modifying agents in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology (Oxford, England)*. DOI: 10.1093/rheumatology/keaa049.

Scherer, P. E.; Williams, S.; Fogliano, M.; Baldini, G.; Lodish, H. F. (1995): A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (45), S. 26746–26749. DOI: 10.1074/jbc.270.45.26746.

Schienkiewitz, A.; Mensink, G. B.M.; Kuhnert, R.; et al. (2017): Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland. Journal of Health Monitoring (2(2):21–28).

Segawa, Katsumori; Fukuhara, Atsunori; Hosogai, Naomi; Morita, Kentaro; Okuno, Yosuke; Tanaka, Masaki et al. (2006): Visfatin in adipocytes is upregulated by hypoxia through HIF1alpha-dependent mechanism. In: *Biochemical and biophysical research communications* 349 (3), S. 875–882. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.07.083.

Sime, Katie; Choy, Ernest H.; Williams, Anwen S. (2017): Alterations to adipose tissue morphology during inflammatory arthritis is indicative of vasculopathology in DBA/1 mice. In: *Adipocyte* 6 (2), S. 87–101. DOI: 10.1080/21623945.2017.1295174.

Smith, M. D.; Barg, E.; Weedon, H.; Papengelis, V.; Smeets, T.; Tak, P. P. et al. (2003): Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (4), S. 303–307. DOI: 10.1136/ard.62.4.303.

Sokoła-Wysoczańska, Ewa; Wysoczański, Tomasz; Wagner, Jolanta; Czyż, Katarzyna; Bodkowski, Robert; Lochyński, Stanisław; Patkowska-Sokoła, Bożena (2018): Polyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders-A Review. In: *Nutrients* 10 (10). DOI: 10.3390/nu10101561.

Stavropoulos-Kalinoglou, Antonios; Metsios, Giorgos S.; Koutedakis, Yiannis; Kitas, George D. (2011): Obesity in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 50 (3), S. 450–462. DOI: 10.1093/rheumatology/keq266.

Sun, Xiaoxuan; Feng, Xiaoke; Tan, Wenfeng; Lin, Na; Hua, Minhui; Wei, Yu et al. (2015): Adiponectin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancing Th17 response and prompting RANKL expression. In: *Scientific reports* 5. DOI: 10.1038/srep11296.

Tang, Chih-Hsin; Chiu, Yung-Cheng; Tan, Tzu-Wei; Yang, Rong-Sen; Fu, Wen-Mei (2007): Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (8), S. 5483–5492. DOI: 10.4049/jimmunol.179.8.5483.

Tartaglia, L. A. (1997): The leptin receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (10), S. 6093–6096. DOI: 10.1074/jbc.272.10.6093.

Terra, Ximena; Auguet, Teresa; Quesada, Isabel; Aguilar, Carmen; Luna, Anna Maria; Hernández, Mercé et al. (2012): Increased levels and adipose tissue expression of visfatin in morbidly obese women: the relationship with pro-inflammatory cytokines. In: *Clinical endocrinology* 77 (5), S. 691–698. DOI: 10.1111/j.1365-2265.2011.04327.x.

Tian, G.; Liang, J-N; Wang, Z-Y; Zhou, D. (2014): Emerging role of leptin in rheumatoid arthritis. In: *Clinical and Experimental Immunology* 177 (3), S. 557–570. DOI: 10.1111/cei.12372.

Toussirot, É.; Michel, F.; Binda, D.; Dumoulin, G. (2015): The role of leptin in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. In: *Life sciences* 140. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.05.001.

Trujillo, M. E.; Scherer, P. E. (2005): Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. In: *Journal of internal medicine* 257 (2), S. 167–175. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2004.01426.x.

Turesson, Carl; Bergström, Ulf; Pikwer, Mitra; Nilsson, Jan-Åke; Jacobsson, Lennart T. H. (2016): A high body mass index is associated with reduced risk of rheumatoid arthritis in men, but not in women. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 55 (2), S. 307–314. DOI: 10.1093/rheumatology/kev313.

Turner, J. D.; Filer, A. (2015): The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. In: *Current opinion in rheumatology* 27 (2). DOI: 10.1097/BOR.0000000000000148.

van der Helm-van Mil, A. H. M.; van der Kooij, S. M.; Allaart, C. F.; Toes, R. E. M.; Huizinga, T. W. J. (2008): A high body mass index has a protective effect on the amount of joint destruction in small joints in early rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 67 (6), S. 769–774. DOI: 10.1136/ard.2007.078832.

Versini, Mathilde; Jeandel, Pierre-Yves; Rosenthal, Eric; Shoenfeld, Yehuda (2014): Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. In: *Autoimmunity reviews* 13 (9), S. 981–1000. DOI: 10.1016/j.autrev.2014.07.001.

Wagan, Abrar Ahmed; Bhutoo, Abdul Qadir; Khan, Daim; Raheem, Abdul (2020): Fatty liver in Pakistani cohort with rheumatoid arthritis. In: *Pakistan Journal of Medical Sciences* 36 (4), S. 723–728. DOI: 10.12669/pjms.36.4.1984.

Wan, P.; Moat, S.; Anstey, A. (2011): Pellagra: a review with emphasis on photosensitivity. In: *The British journal of dermatology* 164 (6), S. 1188–1200. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2010.10163.x.

Wang, Li; Zhao, Rui-Peng; Song, Xiao-Yu; Wu, Wan-Fu (2019): Targeting ERβ in Macrophage Reduces Crown-like Structures in Adipose Tissue by Inhibiting Osteopontin and HIF-1α. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 15762. DOI: 10.1038/s41598-019-52265-8.

Williams, R. O. (1998): Rodent models of arthritis: relevance for human disease. In: *Clinical and Experimental Immunology* 114 (3), S. 330–332. DOI: 10.1046/j.1365-2249.1998.00785.x.

Woolf, Anthony D.; Erwin, Jo; March, Lyn (2012): The need to address the burden of musculoskeletal conditions. In: *Best practice & research. Clinical rheumatology* 26 (2), S. 183–224. DOI: 10.1016/j.berh.2012.03.005.

World Health Organization (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. In: *World Health Organization technical report series* 894, i-xii, 1-253.

Yammani, Raghunatha R.; Loeser, Richard F. (2012): Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/visfatin) inhibits insulin-like growth factor-1 signaling and proteoglycan synthesis in human articular chondrocytes. In: *Arthritis research & therapy* 14 (1), R23. DOI: 10.1186/ar3705.

Ye, Risheng; Scherer, Philipp E. (2013): Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? In: *Molecular metabolism* 2 (3), S. 133–141. DOI: 10.1016/j.molmet.2013.04.001.

Yoshino, Jun; Mills, Kathryn F.; Yoon, Myeong Jin; Imai, Shin-ichiro (2011a): Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. In: *Cell metabolism* 14 (4), S. 528–536. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.014.

Yoshino, Takumi; Kusunoki, Natsuko; Tanaka, Nahoko; Kaneko, Kaichi; Kusunoki, Yoshie; Endo, Hirahito et al. (2011b): Elevated serum levels of resistin, leptin, and adiponectin are associated with C-reactive protein and also other clinical conditions in rheumatoid arthritis. In: *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 50 (4), S. 269–275. DOI: 10.2169/internalmedicine.50.4306.

Zhang, Y.; Proenca, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J. M. (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In: *Nature* 372 (6505), S. 425–432. DOI: 10.1038/372425a0.

9. Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen:

Hani Manfred Sauermilch, Marie-Lisa Hülser, Carina Schreiyäck, Yubin Luo, Aline Bozec, Georg Schett, Ulf Müller-Ladner, Elena Neumann: Comparison of metabolic changes in osteoarthritis and rheumatoid arthritis mouse models, American College of Rheumatology, Annual Meeting 19.10.- 24.10.2018, Chicago, IL, USA

Hani Manfred Sauermilch, Marie-Lisa Hülser, Carina Schreiyäck, Yubin Luo, Aline Bozec, Georg Schett, Ulf Müller-Ladner, Elena Neumann: Effect of high fat diet on systemic and local inflammation in the context of osteoarthritis and rheumatoid arthritis mouse models, European Workshop for Rheumatology Research 28.02.- 02.03.2019, Lyon, Frankreich

Hani Manfred Sauermilch, Marie-Lisa Hülser, Carina Schreiyäck, Yubin Luo, Aline Bozec, Georg Schett, Ulf Müller-Ladner, Elena Neumann: Übergewicht als Einflussparameter der rheumatoiden Arthritis und Arthrose im Mausmodell, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 04.05.- 07.05.2019, Wiesbaden

Hani Manfred Sauermilch, Marie-Lisa Hülser, Carina Schreiyäck, Yubin Luo, Aline Bozec, Georg Schett, Ulf Müller-Ladner, Elena Neumann: Effect of adipokines and obesity in the context of rheumatoid and osteoarthritis mouse models, Deutscher Kongress für Endokrinologie 04.03.- 06.03.2020, Gießen

10. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehendspezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.
Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Die Betreuung durch Sie war jederzeit sehr unterstützend und fördernd.
Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau PD. Dr. rer. nat. Elena Neumann für die exzellente Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Sie standen mir jederzeit für Fragen, Diskussionen und Anregungen zur Verfügung. Ich möchte Ihnen beiden auch für die Möglichkeit an Kongressen, vor allem auch im Ausland, teilzunehmen und dort wertvolle Erfahrungen zu sammeln, herzlich danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Marie-Lisa Hülser für die gute und sehr hilfreiche Einarbeitung danken. Die vielen Tipps und Tricks waren für mich sehr wertvoll.
Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Carina Schreiyäck für die Erstellung der histologischen Bilder richten und für die wirklich gute Zusammenarbeit. Vielen Dank auch an das gesamte Team im Labor für die Tipps und die schöne Zeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken: Ihr habt mich erzogen, geprägt und unterstützt. Dank euch war es mir überhaupt möglich das Medizinstudium zu beginnen und eine Promotion anzustreben. Meiner Lebenspartnerin Emmelie Pilger möchte ich ebenfalls besonders für die vielfältige und liebevolle Unterstützung und Denkanstöße danken.