

Aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. M. Grandoch

**Modulation verschiedener Fettgewebsdepots nach
Ischämie/Reperfusion im Modell des murinen
Prädiabetes**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lucie Jacquet

(2024)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Referentin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Korreferent: Prof. Dr. med. Timm J. Filler

In Liebe und Dankbarkeit an meine Familie

Zusammenfassung

Veränderungen im Fettgewebe werden seit Langem eine tragende Rolle in der Entwicklung metabolischer und kardiovaskulärer Erkrankungen zugesprochen. Das weiße Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) soll hierbei eine eher krankheitsfördernde Rolle kommen, zumal im Krankheitsverlauf das Inflammationsgeschehen und die Lipidspeicherung zunehmen. Die Rolle des braunen Fettgewebes (*brown adipose tissue*, BAT) im Rahmen des Diabetes mellitus und des Myokardinfarktes (MI) ist bislang wenig erforscht. Generell wird ihm durch die Steigerung des Energieumsatzes und die Sekretion von sogenannten Batokinen eine kardioprotektive Funktion beigemessen. Ein besseres Verständnis seiner genauen Rolle könnte zur Entdeckung neuer Therapieansätze in entsprechenden Krankheitsentitäten führen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich BAT und WAT im murinen Modell des Diät-induzierten Prädiabetes verhielten und welche Veränderungen nach einem MI zu beobachten waren.

In männlichen C57BL/6J-Wildtyp Mäusen wurden mittels einer hochkalorischen, diabetogenen Diät (DD) Adipositas und Insulinresistenz induziert, um eine Situation nachzuahmen, die der humanen Pathologie nahekommt. Die entsprechenden Kontrollgruppen erhielten eine Standarddiät (KDD). Im Anschluss an die 9-wöchige Fütterung erfuhren die Tiere eine kardiale Ischämie/Reperfusion (I/R). Untersucht wurden das BAT und WAT basal ohne Einfluss der I/R sowie im Verlauf nach I/R an Tag drei und 21.

Um die Vorgänge im Fettgewebe bezüglich Morphologie und Lipidspeicherung in dieser Situation zu charakterisieren, wurden Hämatoxylin & Eosin Färbungen angefertigt und dabei Fläche und Anzahl der Fettvakuolen ausgewertet. Darüber hinaus wurde mit der quantitativen *polymerase chain reaction* (qPCR)-Methode die Genexpression von Enzymen des Lipidmetabolismus bestimmt. Im Hinblick auf die Inflammation waren MAC2-Färbungen angefertigt worden. Mittels qPCR wurde außerdem die Genexpression von Entzündungsmediatoren detektiert.

Allein durch die Fütterung der DD wurden in beiden Fettgewebsdepots vermehrte Lipidspeicherung und eine verstärkte Expression inflammatorischer Marker beobachtet.

Nach kardialer I/R kam es zu deutlichen Veränderungen in den Fettgewebsdepots: Im BAT unterschied sich die vorher beobachtete Lipidspeicherung zwischen der KDD und DD Gruppe 3 Tage nach I/R nicht mehr, wohingegen es nach 21 Tage wieder zu den vorab beobachteten Unterschieden in der Lipidspeicherung mit erhöhter Lipideinlagerung in DD Tieren kam. Auch die in der basalen Gruppe festgestellte verstärkte Expression inflammatorischer Signale in der DD Gruppe war sowohl 3 Tage als auch 21 Tage nach I/R nicht mehr zu beobachten und es bestand also nach I/R kein signifikanter Unterschied in der Inflammation.

Innerhalb des WAT blieben dagegen die Trends bezüglich der Zunahme der Adipozytengröße bzw. der Lipidspeicherung in den Adipozyten auch nach I/R in der DD Gruppe bestehen. Jedoch ließ sich 3 Tage nach I/R bezüglich der Inflammation feststellen, dass bei den KDD und DD Gruppen ein vergleichbares Signal detektiert wurde, welches in einer Zunahme der Inflammation in beiden Gruppen begründet war. Nach 21 Tage waren wieder deutliche Unterschiede zwischen den zwei Gruppen detektierbar und die Inflammation in der DD Gruppe war deutlich erhöht verglichen mit KDD gefütterten Tieren.

Zusammenfassend ließ die Dynamik der metabolischen und inflammatorischen Vorgänge insbesondere im BAT aber auch im WAT eine systemische Beteiligung der beiden Gewebe im Kontext der I/R vermuten. Der Einfluss und die Veränderungen durch die I/R erschienen bei Fütterung mit einer diabetogenen Diät ausgeprägter als bei der Kontrolldiät.

Summary

Changes in adipose tissue have been thought to play a major role in the development of metabolic and cardiovascular diseases for a long time. White adipose tissue (WAT) is thought to play a more disease-promoting role, especially as inflammation and lipid storage increase in the course of disease. The role of brown adipose tissue (BAT) in diabetes mellitus and myocardial infarction (MI) is poorly understood. In general, it is thought to play a cardioprotective role by increasing energy expenditure and secreting so-called batokines. A better understanding of its precise role could lead to the discovery of new therapeutic approaches in corresponding disease entities.

The present work aimed to address the questions of how BAT and WAT behaved in the murine model of prediabetes and what changes were observed after MI.

In the murine model with male C57BL/6J wild-type mice, obesity and insulin resistance were induced using a high-calorie diet (DD) to mimic a situation close to human pathology. The corresponding control groups received a standard diet (KDD). Following several weeks of feeding, the animals underwent cardiac ischemia/reperfusion (I/R). BAT and WAT were examined basally, without influence of I/R and during the course after I/R at day three and 21.

To characterize the processes regarding morphology and lipid storage in this situation, hematoxylin & eosin staining was performed, evaluating the area and number of lipid vacuoles. In addition, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method was used to determine the gene expression of enzymes of lipid metabolism. Regarding inflammation, MAC2 staining had been done. By qPCR, gene expression of inflammatory mediators was also detected.

Increased lipid storage and increased expression of inflammatory markers were observed in both adipose tissue depots by DD diet alone.

Significant changes in adipose tissue depots occurred after cardiac I/R: In BAT, lipid storage no longer differed between the KDD and DD groups 3 days after I/R, whereas after 21 days, the previously observed differences in lipid storage with increased lipid storage in DD animals reappeared. Also, the increased expression of inflammatory signals in the DD group observed in the basal group was no longer observed both 3 and 21 days after I/R, and thus there was no significant difference in inflammation after I/R.

Within the WAT, on the other hand, the trends regarding the increase in adipocyte size and lipid storage in the adipocytes also remained in the DD group after I/R. However, 3 days after I/R, a comparable signal regarding inflammation was detected in the KDD and DD groups, which was due to an increase in inflammation in both groups. After 21 days, clear differences between the two groups were again detectable and the inflammation in the DD group was significantly increased compared to KDD-fed animals.

In summary, the dynamics of metabolic and inflammatory processes, especially in the BAT but also in the WAT, suggested a systemic involvement of both tissues in the context of I/R. The influence and changes caused by I/R appeared to be more pronounced when fed a diabetogenic diet than with the control diet.

Abkürzungsverzeichnis

A

abs. absolute Zahlen
ACE.....angiotensin-converting enzyme
AT1 Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
Atgl..... Adipozyten-Triglycerid-Lipase

B

BATbraunes Fettgewebe
BMI..... Body mass index

C

CLS crown-like-structures

D

d Tag
DAB..... 3,3'Diaminobenzidin
DALY.....Disability-adjusted life year
DD..... diabetogene Diät
DM2 Diabetes mellitus Typ 2

E

EKG Elektrokardiogramm

F

Fiji Fiji is just ImageJ

G

GLP-1..... Glucagon-like peptide-1

H

hStunde
H&E.....Hämatoxylin und Eosin
HbA1c Hämoglobin A1c
HDL-C high density lipoprotein-cholesterol
HMG-CoA 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-
Coenzym-A
Hsl.....hormonsensitive Lipase

I

I/R Ischämie/Reperfusion
Il1b Interleukin 1 beta
Il6Interleukin 6

K

KDD Kontrolldiät

L

LDL-Clow density lipoprotein-cholesterol

M

Mcp1..... monocyte chemoattractant protein-1
mM Millimolar
mRNA..... messenger ribonucleic acid
MIMyokardinfarkt

N

NSTEMI..... nicht-ST-Hebungsinfarkt

O

oGTToraler Glukosetoleranz Test

P

PCR..... polymerase chain reaction
PCSK9..... Proproteinkonvertase Subtilisin
..... Kexin Typ 9
PET/CT Positronen-Emissions-
Tomographie/ Computer-Tomographie
Plin1 Perilipin 1

Q

qPCR.....quantitative Polymerase
.....chain reaction

S

SGLT2 Sodium Glukose Co-transporter

T

TNF α Tumornekrosefaktor alpha

U

UCP1uncoupling protein 1

V

VLDL-C..... very low density
.....lipoprotein-cholesterol

W

wWoche
WATweißes Fettgewebe

μ

μm Mikrometer
 μm^2 Mikroquadratmeter

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das metabolische Syndrom | 1 |
| 1.1.1 | Adipositas | 1 |
| 1.1.2 | Dyslipidämien | 2 |
| 1.1.3 | Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 | 3 |
| 1.1.4 | Arterielle Hypertonie | 5 |
| 1.2 | Das Fettgewebe | 6 |
| 1.2.1 | Definition und Funktion verschiedener Fettgewebsdepots | 6 |
| 1.2.2 | Metabolische und inflammatorische Veränderungen im Fettgewebe bei Adipositas | 8 |
| 1.2.3 | Therapeutischer Nutzen des Fettgewebes | 10 |
| 1.3 | Kardiovaskuläre Komplikationen des metabolischen Syndroms | 11 |
| 1.3.1 | Grundlagen | 11 |
| 1.3.2 | Kardiale Genesung und <i>Remodeling</i> nach dem Myokardinfarkt | 12 |
| 1.3.2.1 | Metabolische Veränderungen | 13 |
| 1.3.2.2 | Inflammatorische Reaktion | 13 |
| 1.3.3 | Wechselwirkung zwischen Myokardinfarkt und Diabetes mellitus Typ 2 | 15 |
| 1.4 | Ziele der Arbeit | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Arbeitsmittel | 18 |
| 2.1.1 | Substanzen | 18 |
| 2.1.2 | Lösungen und Puffer | 18 |
| 2.1.3 | Geräte und Material | 19 |
| 2.2 | Aktenzeichen der ZETT | 20 |
| 2.3 | Fütterung und experimentelles Schema | 20 |
| 2.4 | Gewebeentnahme und Verarbeitung | 22 |
| 2.5 | Histologie | 22 |
| 2.5.1 | Anfertigung und Aufarbeitung von Paraffinschnitten | 22 |
| 2.5.2 | Hämatoxylin und Eosin Färbung | 23 |
| 2.5.3 | MAC2-Färbung | 23 |
| 2.5.4 | Mikroskopieren | 25 |
| 2.5.4.1 | Analyse der Adipozytengröße | 25 |
| 2.5.4.2 | Analyse der Entzündungsreaktion | 25 |
| 2.6 | Ribonukleinsäure Analyse | 26 |
| 2.6.1 | Ribonukleinsäure Isolation und <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> Synthese | 26 |
| 2.6.2 | Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction | 26 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.7 | Datenverarbeitung und Statistische Auswertung | 28 |
| 3 | Ergebnisse | 29 |
| 3.1 | Effekte der diabetogenen Diät auf das braune und weiße Fettgewebe | 29 |
| 3.1.1 | Einfluss auf die Morphologie und die Genexpression von Markern des Lipidmetabolismus..... | 29 |
| 3.1.2 | Einfluss auf die <i>crown-like-structures</i> und die Genexpression von Inflammations-Markern..... | 31 |
| 3.2 | Effekte der Ischämie/Reperfusion zu verschiedenen Zeitpunkten im Diabetesmodell im braunen und weißen Fettgewebe | 33 |
| 3.2.1 | Einfluss auf die Morphologie und die Genexpression von Markern des Lipidmetabolismus..... | 33 |
| 3.2.2 | Einfluss auf die <i>crown-like-structures</i> und die Genexpression von Inflammationsmarkern..... | 39 |
| 4 | Diskussion | 44 |
| 4.1 | Auswahl des Mausmodells und experimentelles Schema | 44 |
| 4.2 | Die diabetogene Diät als Auslöser der Dysfunktion des braunen und weißen Fettgewebes | 46 |
| 4.2.1 | Erhöhte Lipidspeicherung im braunen und weißen Fettgewebe durch die diabetogene Diät | 46 |
| 4.2.2 | Erhöhte Inflammation im braunen und weißen Fettgewebe durch die diabetogene Diät | 48 |
| 4.3 | Unterschiedliche Veränderungen der Fettgewebsdepots nach Ischämie/Reperfusion in Abhängigkeit von der Diät..... | 50 |
| 4.3.1 | Fortbestehen der Lipidakkumulation im braunen und weißen Fettgewebe bei diabetogener Diät nach Ischämie/Reperfusion sowie Lipidumsatz im braunen Fettgewebe 3 Tage nach Ischämie/Reperfusion..... | 50 |
| 4.3.2 | Aufgehobene Differenz der Inflammation im braunen Fettgewebe bei diabetogener Diät nach Ischämie/Reperfusion, Fortbestehen im weißen Fettgewebe..... | 52 |
| 4.4 | Fazit und Ausblick | 54 |
| 5 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 57 |
| 6 | Anhang | 61 |
| 6.1 | Makros | 61 |
| 6.1.1 | Makro zur Auswertung der Hämatoxilin & Eosin Färbung des braunen Fettgewebes | 61 |
| 6.1.2 | Makro zur Auswertung der Hämatoxylin & Eosin Färbung des weißen Fettgewebes | 62 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Veränderungen durch Adipositas in verschiedenen Fettdepots [34].... | 10 |
| Tabelle 2: Verwendete Substanzen | 18 |
| Tabelle 3: Verwendete Lösungen | 18 |
| Tabelle 4: Verwendete Puffer | 19 |
| Tabelle 5: Verwendete Geräte | 19 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung der Kontrolldiät und der diabetogenen Diät | 21 |
| Tabelle 7: Antikörper und Bindeproteine für die Mac 2 Färbung | 24 |
| Tabelle 8: Primer zur messenger Ribonucleic acid-Genexpression Analyse | 27 |
| Tabelle 9: Standardprotokoll zur Durchführung der <i>quantitative Polymerase chain reaction</i> | 28 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der weißen, beigen und braunen Adipozyten. | 7 |
| Abbildung 2: Leukozyten verbinden die lokale und systemische Inflammation bei ischämischen kardiovaskulären Erkrankungen: die integrative Pathophysiologie der Inflammation der ischämischen Herzerkrankung. | 15 |
| Abbildung 3: Schema der Behandlung der männlichen C57BL/6J-Wildtyp Mäuse. | 22 |
| Abbildung 4: Effekte der diabetogenen Diät auf den Lipidmetabolismus im braunen Fettgewebe. | 30 |
| Abbildung 5: Effekte der diabetogenen Diät auf den Lipidmetabolismus im weißen Fettgewebe. | 30 |
| Abbildung 6: Effekte der diabetogenen Diät auf die Inflammation im braunen Fettgewebe. | 32 |
| Abbildung 7: Effekte der diabetogenen Diät auf die Inflammation im weißen Fettgewebe. | 33 |
| Abbildung 8: Effekte der diabetogenen Diät und der Ischämie/Reperfusion auf den Lipidmetabolismus im braunen Fettgewebe. | 35 |
| Abbildung 9: Relative Größenverteilung der Fettvakuolen im braunen Fettgewebe basal, 3 und 21 Tage nach Ischämie/Reperfusion bei diabetogener Diät und Kontrolldiät. | 36 |
| Abbildung 10: Effekte der diabetogenen Diät und der Ischämie/Reperfusion auf den Lipidmetabolismus im weißen Fettgewebe. | 38 |
| Abbildung 11: Relative Größenverteilung der Adipozyten im weißen Fettgewebe basal, 3 und 21 Tage nach Ischämie/Reperfusion bei diabetogener Diät und Kontrolldiät. | 39 |
| Abbildung 12: Effekte der diabetogenen Diät und der Ischämie/Reperfusion auf die Inflammation im braunen Fett. | 41 |
| Abbildung 13: Effekte der diabetogenen Diät und der Ischämie/Reperfusion auf die Inflammation im weißen Fett. | 43 |

1 Einleitung

1.1 Das metabolische Syndrom

Das metabolische Syndrom umfasst laut den aktuellen Definitionen das gleichzeitige Vorkommen von stammbetonter Adipositas, Bluthochdruck, Hyperlipidämie, Insulinresistenz und Hyperglykämie [1]. Zwischen 1999 und 2010 litten hieran mit steigender Tendenz schätzungsweise ein Viertel bis ein Drittel der weltweiten Bevölkerung [2]. Die Gründe für die Entstehung des Krankheitsbildes des metabolischen Syndroms sind vielfältig. Beschriebene Risikofaktoren sind insbesondere eine kalorienreiche Ernährung mit niedriger Ballaststoffzufuhr und Bewegungsmangel [2]. Gegenwärtig steht eine Änderung des Lebensstils mit einer Gewichtsreduktion, sportlicher Betätigung, einer angepassten Diät sowie die Reduktion der Lipid-, Glucose- und Blutdruckwerte als Therapie im Vordergrund [2]. Es drohen ansonsten kardiovaskuläre Komplikationen wie Angiopathien, Myokardinfarkt (MI) oder Schlaganfall [3]. In Abhängigkeit der entsprechenden Gesamtrisikoabschätzung können Medikamente eingesetzt und unterstützende, bariatrische [4] oder psychotherapeutische Verfahren angeführt werden [5].

1.1.1 Adipositas

Von Übergewicht spricht man laut WHO bei einem *Body mass index* (BMI) zwischen 25 und 29,9 kg/m². Hingegen liegt Adipositas ab einem BMI von ≥ 30 kg/m² vor [6]. 2015 lag die Prävalenz der Adipositas weltweit bei 12 % der Erwachsenen und 5 % der Kinder [6]. Dies führte zu einer Mortalität von 7,1 %, während der *Disability-adjusted life year* (DALY) score mit 4,9 % angegeben wurde [6]. Als Hauptursache dafür gelten kardiovaskuläre Erkrankungen und der Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) [6]. Zugleich tragen aber auch muskuloskelettale oder onkologische Erkrankungen zu der Mortalität und den Einschränkungen der Lebensqualität bei [6]. Prädominierend mit circa 60-70 % sind Umweltfaktoren verantwortlich für die Ausbildung des adipösen Phänotyps [7]. Genetische Ursachen scheinen aber auch in 30-40 % der Fälle eine Rolle zu spielen [7]. In Verbindung damit soll ein niedriger Energieverbrauch bei erhöhtem Kalorienkonsum stehen. Die Fettverteilung unterscheidet sich häufig je nach Geschlecht: Bei Männern ist das abdominale Fett ausgeprägter, bei Frauen das subkutane gluteofemorale Fett [7]. Die Fettverteilung

ist zusammen mit der Funktion des Fettgewebes für die metabolische Gesundheit entscheidend. Die lipidspeichernde Funktion wird einerseits durch ein aufkommendes Entzündungsgeschehen angeregt [8]. Andererseits kann durch eine Überaktivierung der Entzündungsreaktion die Ausschüttung der Adipokine außer Gleichgewicht geraten und systemische Konsequenzen haben [8].

Ergänzend zu den in 1.1 genannten Therapieansätzen gibt es im Kontext der Adipositas weitere therapeutische Optionen. Insbesondere die *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) Rezeptor-Agonisten Semaglutid oder Liraglutid scheinen zur Gewichtsreduktion vielversprechend zu sein [9, 10]. Ursprünglich wurden die Medikamente beim DM2 erfolgreich verwendet. Der Wirkmechanismus dieser Wirkstoffklasse wurde vor allem bei Liraglutid erforscht [10]. Der Effekt erfolgt durch die Stimulierung der Insulinausschüttung, der Hemmung der Glucagonsekretion, der Verlangsamung der Magenentleerung sowie der Steigerung des Sättigungsgefühls nach dem Essen [9]. Durch die Medikamente zeigten sich Besserungen des Diabetes- und Gewichtsbefundes sowie eine Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse [10, 11]. Die Ergebnisse sind dabei besser als für die anderer bis jetzt etablierte Medikamente wie beispielsweise dem Lipasehemmer Orlistat [10, 12]. Dazu wurde gezeigt, dass der Gewichtsverlust hauptsächlich auf eine Abnahme der Fettmasse zurückzuführen ist [11].

1.1.2 Dyslipidämien

Die Dyslipidämie bezeichnet eine gestörte Konzentration der Blutfettwerte. Dabei sind die Gesamtcholesterinwerte erhöht, insbesondere Triglyzeride und das *low density lipoprotein-cholesterol* (LDL-C) [13]. Der Anteil des protektiven *high density lipoprotein-cholesterol* (HDL-C) ist erniedrigt [13]. Diese Lipidwerte sollten jedoch nicht allein, sondern im Zusammenhang mit anderen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes oder Adipositas betrachtet werden [13]. Entsprechend dieser kann eine Abschätzung für das kardiovaskuläre Risiko und die Therapiebedürftigkeit mithilfe von Scores getroffen werden [13].

Bei der Adipositas steigt die Lipolyserate und damit auch die Menge an freien Fettsäuren. Dies regt die Bildung von *very low density lipoprotein-cholesterol* (VLDL-C) sowie LDL-C an [7]. Dabei sinken die HDL-C Spiegel, beziehungsweise entsteht ein dysfunktionales HDL-C [14]. Insbesondere im Kontext der diabetischen Dyslipidämie regt die Insulinresistenz die Produktion des VLDL-C an, während die

Beseitigung dessen gleichzeitig beeinträchtigt wird [15]. Durch den Anstieg des VLDL-C steigt das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen [7]. VLDL-C kann die arteriellen Wände leichter permeieren und somit die Atherogenese fördern [7]. Dies führt langfristig zu dem Krankheitsbild der Atherosklerose.

Neben der Lebensstiländerung können Patienten von einer medikamentösen Therapie profitieren. Statine sind 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase-Hemmer, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinsynthese inhibieren [13]. Sie können sowohl bei Dyslipidämien als auch zur Sekundärprävention bei atherosklerotischen, kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden. Statine senken somit die LDL-C-Werte und nachfolgend das kardiovaskuläre Risiko [13]. Eine Kombination mit Ezetimib scheint durch synergistische Effekte einen weiteren Vorteil zu bringen [13]. Ezetimib erzielt dabei seine Wirkung durch die Hemmung der intestinalen Resorption von Cholesterin und Phytosterinen [13]. Bei bekannter heterozygoter, familiärer Hypercholesterinämie oder symptomatischen atherosklerotischen Erkrankungen können auch Proproteinconvertase Subtilisin Kexin Typ 9 (PCSK9) Inhibitoren zum Einsatz kommen [13]. Weitere pharmakologische Interventionen, welche jedoch nicht primär verwendet werden sollten, sind zum Beispiel Fibrate, Gallensäurebinder, Omega-3-Fettsäuren oder Nikotinsäurederivate [13].

1.1.3 Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2

Die Prävalenz des DM2 lag 2021 schätzungsweise bei 10,5 % der Weltbevölkerung im Alter zwischen 20 und 79 Jahren [16]. Die höchste Prävalenz wurde in der Altersgruppe zwischen 75 und 79 Jahren festgestellt [16]. Aktuell ist die Häufigkeit in Ländern mit hohem Einkommen am höchsten mit 11,1% [16]. Geschätzt wird jedoch, dass in den nächsten 25 Jahren die Prävalenz des DM2 vor allem in Ländern mittleren Einkommens zunehmen wird [16]. Hiernach würde in diesen Ländern bis 21,1 % der Bevölkerung betroffen sein [16]. Der DM2 allein, aber auch zusammen mit anderen Erkrankungen, stellt also ein globales Gesundheitsproblem dar, welches vor dem Hintergrund des demographischen Wandels verschärft wird. Der Glukosestoffwechsel wird durch Insulin und Glukagon gesteuert. Bei steigenden Blutzuckerwerten wird Insulin aus den Beta-Zellen des Pankreas sezerniert, da Insulin den Blutzucker durch Hemmung der Glykogenolyse und Glukoneogenese der Leber oder durch Stimulierung der Aufnahme der Glukose

durch Leber, Muskel und Fettgewebe senkt [17]. Als Gegenspieler zählt das Glukagon der Alpha-Zellen des Pankreas. Die Ausschüttung wird durch einen niedrigen Blutzucker gesteuert. Seine Effekte erzielt das Glukagon wiederum indem Glykogenolyse und Glykoneogenese der Leber gefördert werden [17]. Dabei steigern auch Kortisol und Katecholamine sekundär die Plasmaglukosekonzentration [17]. Schließlich unterliegt der Glukosestoffwechsel weiteren, speziellen Kontrollmechanismen, die insbesondere die Resorption im Darm und das Ausscheiden durch die Niere beeinflussen [17].

Bei der Insulinresistenz kommt es durch eine drastische Beeinträchtigung der Insulin-vermittelten Signaltransduktion zu einer stark reduzierten Glukoseaufnahme in periphere Gewebe [18]. Gleichzeitig kann es vorkommen, dass die Insulinsekretion beeinträchtigt wird. Diese Stoffwechsellagen, auch Prädiabetes genannt, führen langfristig zur Entwicklung eines DM2 [18]. Der Goldstandard zur Diagnosestellung besteht aus Glukose Serumbestimmungen. Die Grenze für den gelegentlichen Glukosewert liegt bei ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l), für den nüchternen Glukosewert bei ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l) oder im Rahmen eines zweistündigen oralen Glukosetoleranz Tests (oGTT) bei ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) [18]. Bei einem HbA1c von $\geq 6,5$ % (≥ 49 mmol/mol) kann die Diagnose eines Diabetes ebenso gestellt werden [18].

Der DM2 kann auf lange Sicht zu schweren Komplikationen wie Nephropathie, Retinopathie und kardiovaskulären Komplikationen führen [19]. Jedoch gibt es zur Einstellung eines normoglykämischen Zustandes ein breites medikamentöses Spektrum [17]. Dadurch kann diesen Komplikationen vorgebeugt werden [17].

In erster Linie werden keine Insuline verwendet, sondern erst bei fortgeschrittener Erkrankung [17]. Dafür aber insulinotrope Medikamente, wie Sulfonylharnstoffe und Mitiglinide. Das Biguanid Metformin war dabei Mittel der Wahl [17]. Es verbessert die Insulinsensitivität, senkt die Glukoseresorption des Darms und hemmt die Glukoseproduktion der Leber [17].

Weitere Medikamente, welche die Insulinsensitivität verbessern, sind die Glitazone. Diese wirken als Liganden-gesteuerte Transkriptionsfaktoren [17].

Alpha-Glukosidase Hemmer hemmen den Prozess der Kohlenhydratresorption im Dünndarm, sodass einer postprandialen Hyperglykämie entgegengewirkt wird [17].

Auf die Glukagonausschüttung wirken die Amylin-Analoga. Dabei wurde die Entleerung des Magens verlangsamt, sodass postprandial, aber auch langanhaltend, der Blutzucker reduziert wird [17].

Inkretin-Mimetika wie GLP-1 Agonisten (siehe 1.1.1) oder Gliptine fördern die Insulin- und hemmen die Glukagonausschüttung, wodurch der Blutzucker sinkt [17]. Schließlich sind die *Sodium Glucose Co-transporter 2* (SGLT2)-Inhibitoren, durch die Inhibition der Glukose-Reabsorption und Förderung der Ausscheidung dessen im Urin, zu nennen [17]. Zusätzlich zu den Effekten auf den Blutzucker gibt es Belege dafür, dass SGLT-2 Inhibitoren wie Empagliflozin auch für Herz und Niere Vorteile bergen [20]. Insbesondere bei Patienten mit DM2 und kardiovaskulärem Risiko konnte hierbei eine Reduktion der Mortalität und der Hospitalisation bei Herzinsuffizienz beobachtet werden [20]. Auch verlangsamt Empagliflozin bei dieser Konstellation den Progress der chronischen Niereninsuffizienz [20].

1.1.4 Arterielle Hypertonie

Auch die arterielle Hypertonie stellt einen Risikofaktor zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen dar, insbesondere für die Atherosklerose der zerebralen, koronaren und peripheren Gefäße, sowie zur Entwicklung einer chronischen Herz- und Niereninsuffizienz [21]. Die Grenzwerte des Bluthochdrucks liegen systolisch bei ≤ 140 mmHg und diastolisch ≥ 90 mmHg. Weltweit betraf die arterielle Hypertonie 2015 1,13 Milliarden Menschen [22]. Schätzungen nach soll die Prävalenz bis 2025 auf 1,56 Milliarden weiter angesteigen [23]. Es liegt überwiegend eine primäre, essenzielle Hypertonie vor. Dies ist insbesondere auch im Rahmen des metabolischen Syndroms der Fall [21]. Seltener kommt die sekundäre Hypertonie vor, etwa mit renalen und endokrinen Ursachen oder beim Schlafapnoe-Syndrom [21].

Pathophysiologisch kommt es bei der arteriellen Hypertonie zur Zunahme des peripheren Gefäßwiderstands [24]. Wichtige Mechanismen sind dabei die Vasokonstriktion, bzw. eine reduzierte Endothel-vermittelte Vasodilatation mittels Stickstoff-Monoxid [24]. Die Hypertrophie und das Remodeling der glatten Gefäßmuskulatur, insbesondere der kleinen Gefäße, verstärken dazu die Effekte [24]. Veränderungen kommen ebenfalls durch die Immunaktivierung zustande, welche durch die Sezernierung von Zytokinen und reaktive Sauerstoffspezies die vaskuläre Funktion weiterhin beeinflussen [24]. Letztlich führt die arterielle

Hypertonie also auch zur Endothelaktivierung und zur Aktivierung von Leukozyten, wodurch sich eine gefäßschädigende Wirkung nachvollziehen lässt.

Je nach Risikoprofil des Patienten können Lebensstiländerungen und/oder pharmakologische Therapien herangezogen werden, um eine Blutdruckreduktion und eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos zu erreichen [25]. Zusätzlich zu den bereits in 1.1 erwähnten nicht-pharmakologischen Maßnahmen können die Restriktion der Kochsalzzufuhr auf 5 bis 6 g pro Tag, die Beschränkung des Nikotin- und Alkoholkonsums sowie eine ballaststoffreiche Ernährung mit reduziertem Fettgehalt [25] zur Besserung führen.

Pharmakologisch steht die Therapie mit *angiotensin-converting enzyme* (ACE)-Hemmern, Angiotensin-II-Rezeptor (AT1)-Blocker, Betablocker, Thiaziddiuretika oder Kalziumantagonisten im Vordergrund [21]. Diesen Substanzen werden zusätzlich zur Blutdrucksenkung pleiotrope Wirkungen zugesprochen [21]. Dabei sollten jedoch unerwünschte Arzneimittelwirkungen, die durch einen zu niedrigen Blutdruck zustande kämen, beachtet werden. Dazu zählt die orthostatische Dysfunktion, eine renale Funktionsabnahme und verminderte kognitive Fähigkeiten [21].

1.2 Das Fettgewebe

1.2.1 Definition und Funktion verschiedener Fettgewebsdepots

Wenngleich bis jetzt nur pathologische Aspekte des Fettgewebes erwähnt wurden, besitzt das Organ vielfältige Funktionen für den Organismus. Bei Säugetieren wird hauptsächlich zwischen zwei Sorten des Fettgewebes unterschieden: das braune (*brown adipose tissue*, BAT) und das weiße Fett (*white adipose tissue*, WAT) [26]. Diese entwickeln sich ursprünglich aus dem Mesoderm [26]. Grundsätzlich sind die Adipozyten in einem vaskularisierten, innervierten bindegewebigen Gerüst integriert, wo sich ebenfalls Stammzellen und Immunzellen befinden [26]. Dazu unterscheidet sich zusätzlich das Knochenmarksfett, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt wurde, jedoch ebenfalls metabolische und sekretorische Funktionen einnehmen soll [27].

Das BAT ist multivakuolär und besitzt zahlreiche Mitochondrien. Beim Menschen ist es vor allem im Säuglingsalter interskapulär lokalisiert [28]. Mäuse besitzen ebenfalls BAT, welches sich ebenso in der interskapulären Region befindet [28]. Die

primäre Funktion des Gewebes besteht in der Thermogenese [29]. Diese erfolgt mit Hilfe des *Uncoupling-Protein-1* (UCP1), das den Protonengradienten unterbricht, welcher aus der oxidativen Phosphorylierung folgt [29].

Das WAT besteht hingegen aus einem einzigen Lipidtropfen pro Adipozyten und ist somit univakuolär [26]. Es besitzt weniger Mitochondrien als das BAT. Klassischerweise erfüllt dieses Fett Funktionen in Bezug auf das Energie-Gleichgewicht mit der Lipidspeicherung und der Lipolyse [26]. Entsprechend der Lokalisation unterscheidet man weitere, speziellere Funktionen. Erstens im Sinne des Lipidstoffwechsels mit besonderer Wirkung auf ein benachbartes Organ [28], wie es beispielsweise beim Herzen der Fall ist: Das epikardiale und perikardiale Fett dienten durch die Freisetzung freier Fettsäuren als Energiespender für das Myokard [28]. Zweitens wirken diese Fettdepots als Dämpfer für mechanische Reize, wie an Gelenken [28]. Zusätzlich nimmt es im Rahmen der angeborenen Immunantwort Einfluss auf die Haut und den Magen-Darm-Trakt [28].

Schließlich wird mit dem beigen Fett eine weitere Art beschrieben. Dieses Gewebe scheint Charakteristika der zwei oben beschriebenen Adipozytensorten zu vereinen [26]. Es ist in Depots des WAT zu finden und basal erscheint es ebenso unilokulär. Durch einen Kältestimulus wird das beige Fett jedoch aktiviert und nimmt die Morphologie des BAT mit kleinen Lipidvakuolen an [26]. Dieser Prozess wurde als *Browning* bezeichnet [26]. In diesem Zustand exprimiert das beige Fett analog zum BAT vermehrt Ucp1, wodurch es die Fähigkeit erlangt, zitterfreie Thermogenese durchzuführen [26].

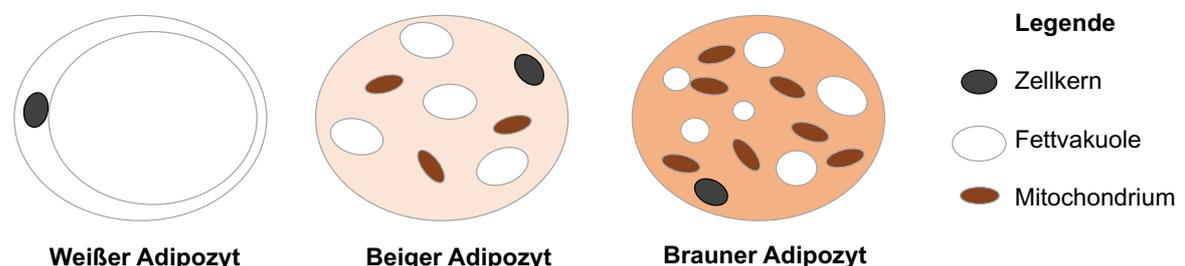


Abbildung 1: Schematische Darstellung der weißen, beigen und braunen Adipozyten.

Das Fettgewebe steht durch verschiedene Mechanismen in Verbindung mit dem restlichen Organismus. Diese Verbindung besteht durch die Innervation desselbigen mit folgender Lipolyse oder Lipidspeicherung, durch die immunologische Reaktion und zusätzlich durch seine endokrine Wirkung [30].

Dieser endokrine Effekt ist beim WAT mit der Sekretion von Adipokinen gut beschrieben. Beispielsweise nimmt das zentralwirkende Adipokin Leptin eine wichtige Rolle ein, indem es sich positiv auf die Nahrungsaufnahme und auf den Energieverbrauch auswirkt [30]. Hingegen offenbart Resistin einen negativen Effekt hinsichtlich der Insulinresistenz [30]. Auch für das BAT wurden sogenannte Batokine klassifiziert, wie zum Beispiel der *Fibroblast growth factor 21* (FGF21) oder das Myostatin, welche mit anderen Organen wie der Leber, das Herz oder Muskeln interagieren und in deren Stoffwechsel eingreifen [31].

1.2.2 Metabolische und inflammatorische Veränderungen im Fettgewebe bei Adipositas

Um sich an die Umstände der Überernährung anzupassen, sind insbesondere im WAT zwei Mechanismen bekannt. Zum einen die Hypertrophie der Adipozyten, zum anderen die Hyperplasie, wobei Progenitorzellen aktiviert werden und somit zur Ausbildung neuer Adipozyten führen [32]. Es bestehen Hinweise dafür, dass Hypertrophie, Hyperplasie, oder beide Prozesse, periodisch durchlaufen werden [32]. Gleichzeitig hängen diese Prozesse von der Lokalisation des Fetts ab. Grundsätzlich ist ein Zellumsatz im Fettgewebe gegeben, jedoch ist dieser Prozess bei der Adipositas beschleunigt [32]. Einer Hypertrophie folgt der Zelltod der Adipozyten, worauf neue Zellen gebildet werden [32]. Dabei nimmt die Fettmasse zu und die Adipositas schreitet voran. Problematisch wird es nun, wenn die Sauerstoffversorgung nicht adäquat gewährleistet ist und eine Hypoxie entsteht. Die Hypoxie im WAT führt zur metabolischen Dysfunktion, welche unter anderem für die Entstehung der Fibrose und Zunahme der Inflammation im Gewebe verantwortlich ist [32]. Dies bildet die Grundlage der Insulinresistenz bei Adipositas.

Sowohl eine systemische Inflammation als auch eine lokale Inflammation des Fettgewebes scheinen zur Insulinresistenzentwicklung beizutragen. Die Überexpression von dem Tumornekrosefaktor-alpha im WAT ist dabei ein wichtiger Mediator [31, 32]. Ebenso ist die Expression des Makrophagen-Chemokins *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP1) dort erhöht, welches die Insulinsensitivität im WAT beeinträchtigt. Auch wurde Interleukin 6 (IL6), welches in der akuten Inflammationsphase ausgeschüttet wird, bei Insulinresistenz stärker vorgefunden [31, 32]. Schließlich spielt Interleukin 1 beta (IL1b) eine Rolle, da es die Insulinsignalwege im peripheren Gewebe und in den Makrophagen

beeinträchtigt [32]. TNF α , IL6 und IL1 β wurden von den klassisch aktivierten M1-Makrophagen, welche proinflammatorisch wirken, ausgeschüttet [30]. Die alternativ aktivierten M2-Makrophagen, welche anti-inflammatorisch wirken, sind auch bei Adipositas weiterhin im Gewebe zu finden [30]. Das Verhältnis zwischen M1- und M2-Makrophagen verschiebt sich jedoch, sodass durch die Zunahme an M1 Makrophagen ein pro-inflammatorischer Phänotyp entsteht [30]. Histomorphologisch erkennt man die Makrophagen als *crown-like-structures* (CLS), die sich um sterbende Adipozyten gruppieren [30].

Diese Entzündungsreaktion ruft eine Nekrose, einen fibrotischen Umbau des Fetts und eine systemische Insulinresistenz hervor [32]. Daraufhin steigt die Lipolyse und es werden vermehrt freie Fettsäuren freigesetzt [32]. Hierbei können laborchemische Enzyme hinsichtlich der Charakterisierung der Lipolyse, wie die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (Atgl), die hormonsensitive Lipase (Hsl) und das Protein Perilipin-1 (Plin1), genutzt werden [33]. Die Oxidation dieser freien Fettsäuren in der Peripherie, wie zum Beispiel im Muskel oder in der Leber, führt zu einer verminderten Glukosenutzung sowie zu einer Steigerung der Glukoneogenese, welche Hyperglykämien als Folge haben [7, 34]. Somit entsteht durch Veränderungen des Lipidstoffwechsels also eine weitere Verstärkung der Insulinresistenz [7, 34].

Am meisten erforscht sind die Veränderungen bei Adipositas im WAT. Jedoch gibt es auch im BAT und im beigen Fettgewebe Veränderungen, welche zur Entstehung des metabolischen Syndroms führen können. Es besteht eine negative Korrelation zwischen der Aktivität und Menge des BAT und beigen Fettgewebes bei fortschreitender Adipositas und Insulinresistenz [35]. Auch wenn die Inflammation in diesen Depots akut durch eine fettreiche Diät nicht signifikant zunimmt, scheint die Entzündung im Verlauf trotzdem eine tragende Rolle zu spielen [35]. Beim Fortführen einer fettreichen Diät wird diese sich auch im BAT ausbreiten. Dadurch entsteht im BAT eine Insulinresistenz und die geminderte Glukoseaufnahme beeinträchtigt die Thermogenese durch fehlende Substrate [35]. Zudem wird die thermogene Funktion direkt beeinträchtigt [35]. Darüber hinaus wirken die Makrophagen auf die sympathische Aktivität und sanken die Noradrenalin Konzentration [35]. Somit entsteht eine Einschränkung der Aktivität des protektiven

Fettgewebes durch die Adipositas [35]. Diese Erkenntnisse sind in der Tabelle 1 rekapituliert.

Tabelle 1: Veränderungen durch Adipositas in verschiedenen Fettdepots [35]

| | BAT | Beige | WAT |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Lipidspeicherung | ↑ | N/A | ↑ |
| Inflammation | Anfangs niedrig, im Verlauf ↑ | Anfangs niedrig, im Verlauf ↑ | ↑ |
| Insulinresistenz | ↑ | ↑ | ↑ |
| Lipolyse | N/A | N/A | ↑ |
| Adipositas/Insulinresistenz | Negative Korrelation | Negative Korrelation | Positive Korrelation |

1.2.3 Therapeutischer Nutzen des Fettgewebes

Anfangs wurden bereits erprobte Medikamente gegen die Fettleibigkeit, zum Beispiel Liraglutid, erwähnt [12]. Dieses Medikament führt zur Abnahme der weißen Fettmasse, welches Adipositas, Insulinresistenz und die anderen Erkrankungen des metabolischen Syndroms mit verursacht [11]. Das BAT und das beige Fett besitzen hingegen die intrinsische Eigenschaft, den Energiehaushalt positiv zu beeinflussen [26]. Eine Quantifizierung der BAT-Aktivität ist durch eine Positronen-Emissions-Tomographie/Computer-Tomographie (PET/CT) möglich [36]. Neue Daten konnten dabei zeigen, dass das BAT-Volumen umgekehrt mit dem Nüchtern-Serumglukose korreliert [36]. Andersherum ist ein höheres BAT-Volumen mit niedrigerem Nüchtern-Serumglukose assoziiert, was auf einen protektiven Nutzen des BAT hinweist [36]. Gleichzeitig geht die BAT-Aktivierung umgekehrt mit zentralbetonter Adipositas und metabolischen Parametern, wie den Triglyzeriden, einher [37]. Aus diesem Grund kommt die Regulierung der BAT-Aktivität als therapeutischen Ansatz im Rahmen des metabolischen Syndroms in Frage.

Der klassische Reiz sowohl für die Aktivierung des BAT als auch die des beigen Fetts, ist Kälte. Diese führt zu einer sympathischen Aktivierung, welche die Lipolyse stimuliert [29]. Die Thermogenese wird im Anschluss aus der Nutzung freier

Fettsäuren und Glukose erzeugt. Diese intrinsische Nutzung freier Fettsäuren durch den menschlichen Körper könnte eine neue Stellschraube bei der Behandlung der Adipositas und des DM2 darstellen.

Der Effekt des *Brownings* konnte durch β -adrenerge Rezeptoragonisten wie beispielsweise Mirabegron [38], aber auch Glitazonen (Verweis 1.1.3), induziert werden. Durch indirekte Modulation der sympathischen Aktivierung mittels FGF21 und kardialen Peptiden, wie das *brain natriuretic peptide* oder *atrial natriuretic peptide*, kann eine Wirkung auf das BAT zusätzlich zum *Browning* erzielt werden [38]. Durch eine sportliche Betätigung wird Irisin aus den Muskeln sezerniert [38]. Dieser hormonelle Faktor führt ebenfalls zur Ausbildung von beigen Adipozyten aus dem WAT [38].

Demnach existieren bereits mehrere Substanzen, welche die Aktivierung des BAT und das *Browning* hervorbringen. Letztlich kann ein besseres Verständnis der einzelnen Fettdepots, inklusive ihrer pathologischen Veränderungen beim metabolischen Syndrom und dem Herzinfarkt die Ausschöpfung dieses therapeutischen Potentials ermöglichen.

1.3 Kardiovaskuläre Komplikationen des metabolischen Syndroms

1.3.1 Grundlagen

Wie eingangs schon erwähnt, stellt der MI eine der häufigsten Komplikationen des metabolischen Syndroms dar. Dem zugrunde liegt häufig eine koronare Herzkrankheit. Durch die Plaquesablagerungen, welche bei dieser Erkrankung vorzufinden sind, kann die Durchblutung des Myokardgewebes nicht mehr ausreichend gelingen und der Sauerstoffbedarf nicht mehr adäquat gedeckt werden [39, 40]. Dabei können ebenfalls eine Plaqueruptur und die Ausbildung eines Thrombus zum Verschluss des Gefäßes führen und den MI hervorrufen [39, 40].

Die Erkrankung konnte sich durch akute Brustschmerzen mit Ausstrahlung in die linke Schulter oder den linken Arm manifestieren. Dabei können Patienten ebenso an anderen Stellen Schmerzen verspüren, wie zwischen den Schulterblättern und am Hals, oder Atemnot, Schwäche, Übelkeit und Erbrechen [40]. Manche MI können aber auch ohne Symptome geschehen [40].

Die diagnostischen Schritte bei Beschwerden bestehen aus einem Elektrokardiogramm (EKG) [40]. Zusätzlich werden die Herzenzyme so wie das Troponin bestimmt, welches dann die Unterscheidung zwischen einem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) und einem nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) ermöglicht [40]. Entsprechend war eine Koronarangiographie unmittelbar notwendig oder kann innerhalb der nächsten 72 Stunden durchgeführt werden [40]. Diese ermöglicht dann die Darstellung und Behebung der Stenose. Unverzüglich sind beim MI Schmerzmedikamente, Acetylsalicylsäure, bei Hypoxie Sauerstoff, Nitrate, Betablocker und antikoagulatorische Medikamente zu verabreichen [40]. Nach Behebung der Stenose gibt es weitere Medikamente, die der Patient erhalten sollte. Diese zielen im Grunde darauf ab, die Risikofaktoren des Patienten zu minimieren und das *Outcome* zu verbessern, wie beispielsweise Betablocker, Statine oder ACE-Hemmer [40].

Eine gefürchtete Komplikation nach einem MI bleibt jedoch bestehen: die Herzinsuffizienz [41]. Die Herzinsuffizienz kann dabei akut während des Geschehens, kurz danach während des klinischen Aufenthalts und auch im langfristigen klinischen Verlauf entstehen [41]. Dies ist problematisch, da die Herzinsuffizienz die Mortalitätsrate auf das Dreifache und die kardiovaskuläre Mortalität auf das Vierfache erhöht [41].

1.3.2 Kardiale Genesung und *Remodeling* nach dem Myokardinfarkt

Der MI ist durch die Nekrose von Herzmuskelzellen charakterisiert [42]. Dieses Gewebe besitzt jedoch nur eine eingeschränkte regenerative Fähigkeit, sodass sich an der Stelle der gestorbenen Kardiomyozyten eine Narbe herausbildet [42]. Größe, Form, Funktion und Zusammensetzung der Ventrikel können sich im zeitlichen Verlauf dadurch verändern [42]. In welchem Ausmaß dies mit einem Funktionsverlust des Herzens einhergeht, hängt maßgeblich von der Größe des Infarktes und der regenerativen Fähigkeit des Herzmuskelgewebes ab [42]. Diese Fähigkeit wird sowohl durch den Stoffwechsel als auch durch das lokale Entzündungsgeschehen beeinflusst [42]. Ein *Remodeling* entsteht, wenn sich eine Dysregulation dieser regenerativen Prozesse einstellt. Dies kann langfristig zur Entstehung der Herzinsuffizienz beitragen [42].

1.3.2.1 Metabolische Veränderungen

Wie oben beschrieben entwickelt sich trotz der verbesserten Diagnostik und Therapie des MI nicht selten eine Herzinsuffizienz [41]. Insbesondere Veränderungen der metabolischen Anpassungsfähigkeit des Herzens gehen mit negativen Effekten auf das Myokard einher [43]. Dem insuffizienten Herzen fehlt es dabei immer mehr an Nährstoffen. Aus diesem Grund wird die Oxidation von freien Fettsäuren zur Energieversorgung durch den Glucosestoffwechsel abgelöst [43]. Dies ist jedoch bedingt durch die zunehmende Insulinresistenz des kranken Herzens problematisch, da der Energiegebrauch des Organs nicht adäquat gedeckt werden kann [43]. In Folge des MI ergeben sich also metabolische Veränderungen im Herzen.

Es bestehen Hinweise, dass das Depot des weißen, epikardialen Fetts nach dem MI durch vermehrte Lipolyse negative Effekte auf die Genesung ausübt [44]. Ob und welche Funktionen das BAT und andere Depots des WAT ausüben, ist nicht vollständig geklärt. In einer ersten Arbeit konnten Hinweise einer Verbesserung der Glukose-Toleranz und Herzfunktion nach MI durch das BAT gewonnen werden [45]. Dabei könnte durch die Sympathikusaktivierung eine mögliche Schnittstelle des Fettgewebes mit dem Herzinfarkt bestehen. Diese Aktivierung entsteht durch die Schmerzen und den Stress [46]. Gleichzeitig gilt der Sympathikus auch als Trigger des Fettgewebes, der im BAT beispielsweise zur Thermogenese und im WAT zur Lipolyse führt [47].

1.3.2.2 Inflammatorische Reaktion

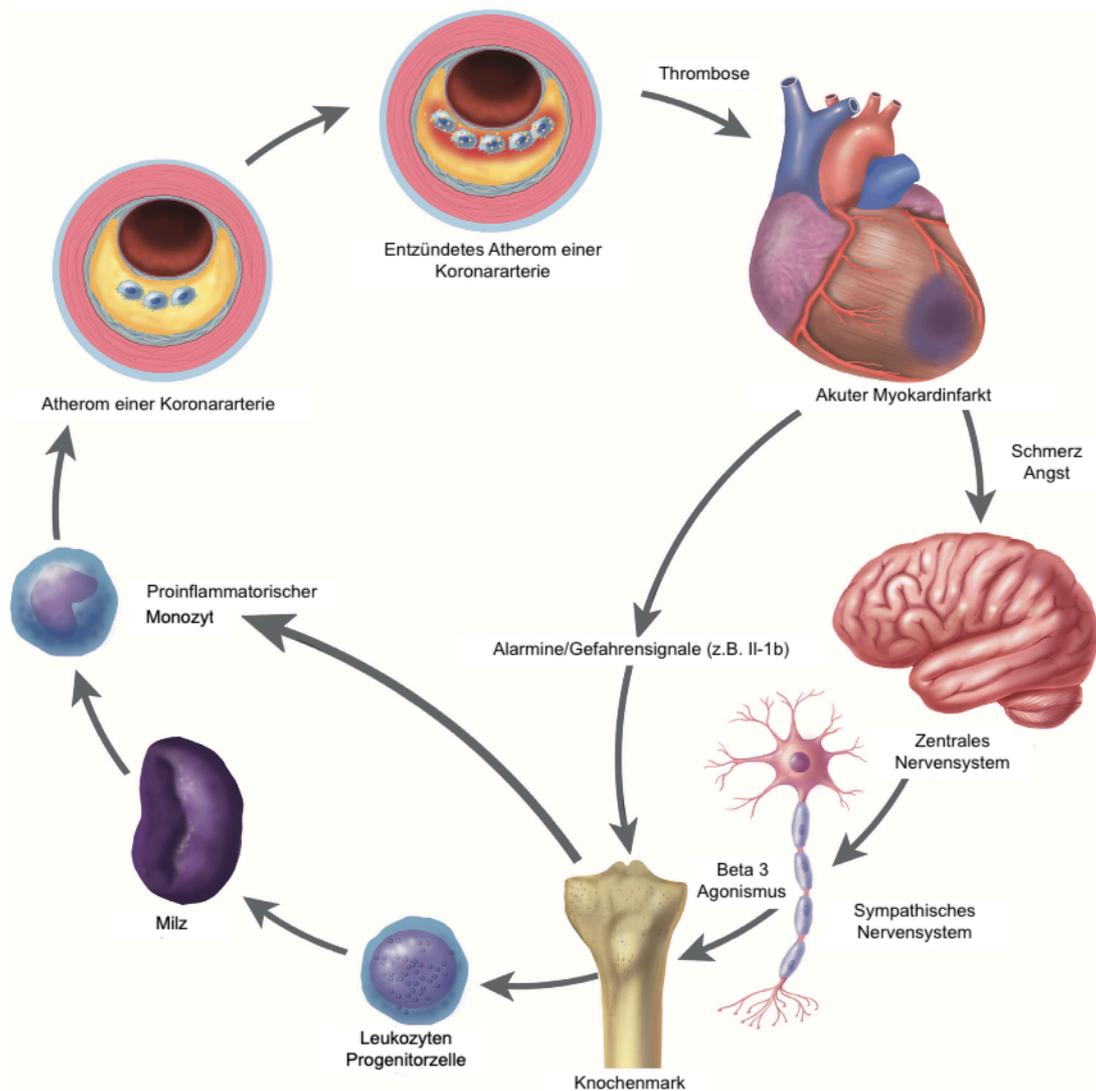
Bei der Entstehung des MI spielt die Entzündungsreaktion insoweit eine Rolle, dass sie zum einen bei der Ausbildung und Destabilisierung atherosklerotischer Plaques beiträgt [48]. Zum anderen führt sie zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade, welches zur Ausbildung eines Thrombus führt [48]. Apoptotische Makrophagen setzen zum Beispiel Gerinnungsfaktoren frei, aber auch proinflammatorische Zytokine, wodurch sie für Mikrokalzifizierungen in der Gefäßwand mitverantwortlich ist [46].

Die Funktion der Leukozyten im Laufe eines MI lässt sich in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase wandern innerhalb kürzester Zeit mononukleäre Phagozyten beziehungsweise Granulozyten aus dem Knochenmark und der Milz in das

infarzierte Gebiet ein, mit dem Ziel verstorbene Zellen zu phagozytieren [46]. Dies geschieht insbesondere aufgrund der sympathischen Aktivierung des Knochenmarks (Abb. 2) [46]. Inwiefern sich dieser Reiz auf die Rekrutierung von Leukozyten aus anderen Organen auswirkt, bleibt bis heute unvollständig geklärt. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass das epikardiale Fett beim MI einen proinflammatorischen Charakter aufweist [44]. Wie sich das BAT und das WAT im Kontext des MI verhalten ist nicht vollständig geklärt.

In der zweiten Phase kommt es zu einer Umprogrammierung der Monozyten. Diese nehmen nun eine reparative Funktion durch Sezernierung von Faktoren ein, welche den fibrotischen Umbau und die Ausbildung von Granulationsgewebe unterstützen [46]. Es ergibt sich also durch die Inflammation der Abbau des zerstörten Myokardgewebes sowie die darauffolgende Heilung des Gewebes [46].

Experimente konnten zeigen, dass unmittelbar, aber auch langfristig nach einer kardialen Ischämie/Reperfusion (I/R), gesteigerte Inflammationssignale vorlagen [49]. Die Autophagie und Apoptose sind Prozesse, welche durch diese Signale kontrolliert wurden [49]. Versuche, die Inflammation nach der I/R mit Immunmodulatoren, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) -Inhibitoren, zu hemmen, resultierten in einer schlechteren Herzfunktion [49]. Dem erhöhten Entzündungsprozess nach I/R im Herzen könnte also eine protektive Funktion zugeschrieben werden [49]. Gleichzeitig führt eine anhaltende Inflammation im Herzen zu Gewebeschäden. Insbesondere die lokalen Effekte der Inflammation auf die Gefäßwand verschlechtern die vorbestehende Arteriosklerose (Abb. 2) [46]. Das Gleichgewicht zwischen den zwei entzündlichen Phasen nach einem MI war deshalb für die Heilung essenziell [42].



Libby, P. et al. J Am Coll Cardiol. 2016; 67(9):1091-103.

Abbildung 2: Leukozyten verbinden die lokale und systemische Inflammation bei ischämischen kardiovaskulären Erkrankungen: die integrative Pathophysiologie der Inflammation der ischämischen Herzerkrankung.

Abbildung modifiziert nach Libby P. et al. Lizenznummer: 5370771253709.

Der Stress eines akuten Myokardinfarkts (MI) erzeugt ein "Echo" in atherosklerotischen Plaques. Ein akuter MI verursacht Schmerzen und Angstzustände, die eine sympathische Aktivierung aus dem zentralen Nervensystem auslöst. Die beta-3-adrenerge Stimulation mobilisiert Vorläuferzellen der Leukozyten aus dem Knochenmark. Diese Vorläuferzellen können in die Milz wandern, wo sie sich als Reaktion auf hämatopoetische Wachstumsfaktoren vermehren können. Die proinflammatorischen Monozyten verlassen dann die Milz und dringen in die atherosklerotische Plaque ein, wo sie eine Entzündung fördern, die die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Plaque eine Thrombose und damit einen akuten MI verursacht.

1.3.3 Wechselwirkung zwischen Myokardinfarkt und Diabetes mellitus Typ 2

Dass Patienten mit DM2 ein erhöhtes Vorkommen von Herzinsuffizienz und kardiovaskulären Ereignissen aufweisen, ist schon seit mehr als 50 Jahren durch die Framingham Studien bekannt [50]. Mittlerweile ist ebenfalls bekannt, dass schon

prädiabetische Zustände mit erhöhter Morbidität und Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen [51]. Dies gilt auch unabhängig von anderen Risikofaktoren. Ursächlich dafür gelten die koronaren Herzkrankheiten und die prothrombotische Lage, welche durch Insulinresistenz und Hyperglykämien begünstigt werden [51].

Der MI bei Patienten mit DM2 ist von einigen Besonderheiten gekennzeichnet. Bezüglich der Symptomatik tendieren diese Patienten zu mildereren Symptomen, bis hin zu einem asymptomatischen, stillen Infarkt. Stattdessen können atypische Beschwerden, wie Verwirrtheit, Dyspnoe, Fatigue, Übelkeit und Erbrechen auftreten [52]. Das Fehlen der typischen Brustschmerzen hat zur Folge, dass der Infarkt verzögert detektiert wird oder gar komplett unentdeckt bleibt, welches für den weiteren Verlauf prognostisch ungünstig ist [52].

Es treten vermehrt Komplikationen, wie beispielsweise der kardiogene Schock, auf [52]. Das Herz kann aus verschiedenen Gründen beim Diabetiker vorbelastet sein. Insbesondere führten eine arterielle Hypertension und eine autonome Dysfunktion zu einer eingeschränkten Leistung des Herzens beim Auftreten eines MI [52].

Auf metabolischer Ebene ist die Insulinresistenz mit dem ungünstigen kardialen *Remodeling* vergesellschaftet. Wenn grundsätzlich schon eine Insulinresistenz vorliegt, ist die Verwertung von Glucose durch das Herz erschwert. Daraus entsteht ein Energiemangel im Myokard [43]. Zugleich liegen Daten vor, dass ein MI wiederum die Entwicklung der Glukoseintoleranz fördert [45].

Der MI beim diabetischen Patienten stellt deshalb eine besonders komplexe Erkrankung dar, welche in Bezug auf Diagnostik und Therapie Verbesserungspotential besitzt.

1.4 Ziele der Arbeit

Die mögliche – auch unterschiedliche - Rolle von BAT und WAT bei und nach einer kardialen I/R ist noch nicht vollständig geklärt und insbesondere der Einfluss beider Depots bei einer prädiabetischen Stoffwechsellage ist bisher nicht untersucht. Dies ist von großem Interesse, da metabolische und inflammatorische Veränderungen für den Verlauf und das *Remodeling* nach MI eine wichtige Rolle spielen. Ziel der durchgeführten Experimente war es daher, metabolische und inflammatorische Veränderungen im BAT und WAT vor und nach einer kardialen I/R unter dem Einfluss eines Prädiabetes vergleichend zu charakterisieren.

Um die dargestellte Situation des metabolischen Syndroms und des MI im experimentellen Tiermodell adäquat nachzubilden, wurde ein etabliertes Mausmodell mit hochkalorischen, diabetogenen Diät zur Erzeugung einer prädiabetischen Stoffwechsellage mit Übergewicht und peripherer Insulinresistenz verwendet [53]. Dieses Modell wurde kombiniert mit dem murinen Modell der Ischämie/Reperfusion, um so in der prädiabetischen Stoffwechsellage den MI zu induzieren und nachfolgend die Prozesse in BAT und WAT untersuchen zu können. Auf Basis dieser Arbeiten soll ein besseres Verständnis der Veränderungen des Fettstoffwechsels und der Inflammation im Fettgewebe in Folge einer I/R dazu führen, neue therapeutische Ansätze für ein günstigeres kardiovaskuläres und metabolisches Outcome zu identifizieren.

2 Material und Methoden

Die Schritte von der Fütterung der Mäuse bis zur Gewebeentnahme und Konservierung wurden von Dr. Zhaoping Ding, Katja Heller, Tamara Straub und Kerstin Freidel durchgeführt. Ich habe die Proben anschließend weiterverarbeitet und die Daten ausgewertet. Unterstützung bei der qPCR habe ich von Peggy Mara Mann erhalten.

2.1 Arbeitsmittel

2.1.1 Substanzen

Tabelle 2: Verwendete Substanzen

| Substanzen | Katalognummer | Firma |
|------------------------|----------------------|---|
| Eosin | 3137.2 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Ethanol absolut | 27693 | Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken |
| Hämalaun | 1.09249.0500 | Merck KGaA, Darmstadt |
| Roticlear® | A538.5 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Roti®-Mount | HP68.1 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |

2.1.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 3: Verwendete Lösungen

| Substanzen | Katalognummer | Firma |
|----------------------|----------------------|---|
| Chloroform | 22715.293P | VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, Frankreich |
| DAB Chromogen | DAB-530 | Reagenz, Zytomed Systems GmbH, Berlin |
| Ethanol 70% | 27660 | Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken |

| | | |
|---------------------------------------|--------|--|
| Ethanol 96% | 27687 | Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken |
| HCl 10% | 0710.1 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| H₂O₂ 30% | 9681.1 | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe |
| Isopropanol 70% | 27431 | Otto Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken |

Tabelle 4: Verwendete Puffer

| Puffer | Ansatz |
|---------------|---|
| 1 xPBS | 137 Millimolar (mM) NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 |
| 10 xTB | 60,57 g Trispuffer (MW 121,14 g/mol) auf 1 L <i>Aqua dest</i> mit pH 7,6 |

2.1.3 Geräte und Material

Tabelle 5: Verwendete Geräte

| Bezeichnung | Modell | Firma |
|--------------------------|---------------------------------|---|
| Deckgläschen | 24 x 60 mm | Engelbrecht, Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland |
| Dissoziator | gentleMACS™ Dissociator | Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach |
| Eppendorfröhrchen | Eppendorf Tubes® 1,5 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Eppendorfröhrchen | Eppendorf Safe-Lock Tubes® 2 ml | Eppendorf AG, Hamburg |
| Mikroskop | Mikroskop Axio Imager.M2 | Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen |
| Objektträger | SuperFrost®Plus Objektträger | R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland |
| Paraffinstreckbad | MEDAX 25900 | MEDAX, Neumünster |

| | | |
|----------------------------------|--|--|
| Reverse Transkriptionskit | QuantiTect® <i>Reverse Transcription Kit</i> | Qiagen, Hilde |
| Röhren | gentleMACS™ | Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch Gladbach |
| Rotationsmikrotom | Leica RM2255 | Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch |
| Spectrophotometer | <i>Nano Drop</i> 1000 Spectrophotometer | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Thermomixer | <i>Mixing Block</i> MB-102 | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Thermal Cycler | <i>Mastercycler personal</i> | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge | <i>Centrifuge</i> 5418 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge | <i>Centrifuge</i> 5424 R | Eppendorf AG, Hamburg |
| Zentrifuge | <i>Centrifuge</i> 5810 R | Eppendorf AG, Hamburg |

2.2 Aktenzeichen der ZETT

Alle beschriebenen Versuche unterlagen den genehmigten Versuchsvorhaben mit den Aktenzeichen 81-02.04.2018.A079 und 81-02.04.2017.A458.

2.3 Fütterung und experimentelles Schema

Mittels der eingesetzten Diät wurde ein Modell der diätinduzierten Adipositas und Insulinresistenz bei der Maus eingesetzt. Hierzu wurden männliche C57BL/6J-Wildtyp Mäuse verwendet, welche *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter erhielten.

Eine Gruppe ohne I/R bekam über sechs bis neun Wochen hochkalorisches Futter (diabetogene Diät, DD, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Zur Kontrolle wurde eine

Standarddiät mit niedrigem Zucker und Fettgehalt (Kontrolldiät, KDD, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) einer zweiten Tiergruppe verabreicht.

Die Mäuse der Gruppe mit I/R wurden ebenfalls mit DD oder KDD gefüttert, bevor nachfolgend nach 9-10 Wochen Fütterung eine I/R induziert wurde.

Auch nach der Induktion der I/R wurden die Mäuse weiterhin mit DD und KDD gefüttert und nach drei Tagen (d) oder nach drei Wochen schmerzfrei in tiefer Narkose getötet.

Die ausführliche Zusammensetzung der Diäten ist in der Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kontrolldiät (KDD) und der diabetogenen Diät (DD)

| Inhaltsstoffe | KDD (%) | DD (%) |
|----------------------|----------------|---------------|
| Rohprotein | 18,2 | 20,5 |
| Rohfett | 4,1 | 36,0 |
| Rohfaser | 5,0 | - |
| Rohasche | 5,3 | 3,5 |
| Stärke | 43,5 | - |
| Zucker | 6,8 | 24,0 |

Um den MI zu induzieren, wurde eine Ischämie/Reperfusion-Operation [54] durchgeführt. Unter Anästhesie wurde bei den Mäusen eine Thorakotomie durchgeführt und das Perikard eröffnet. Die linke Koronararterie wurde ligiert und nach 45-minütiger Okklusion wieder gelöst. Dieser Schritt wurde durch Dr. Zhaoping Ding durchgeführt

Eine Zusammenfassung des experimentellen Schemas wurde in der Abb. 3 aufgeführt.

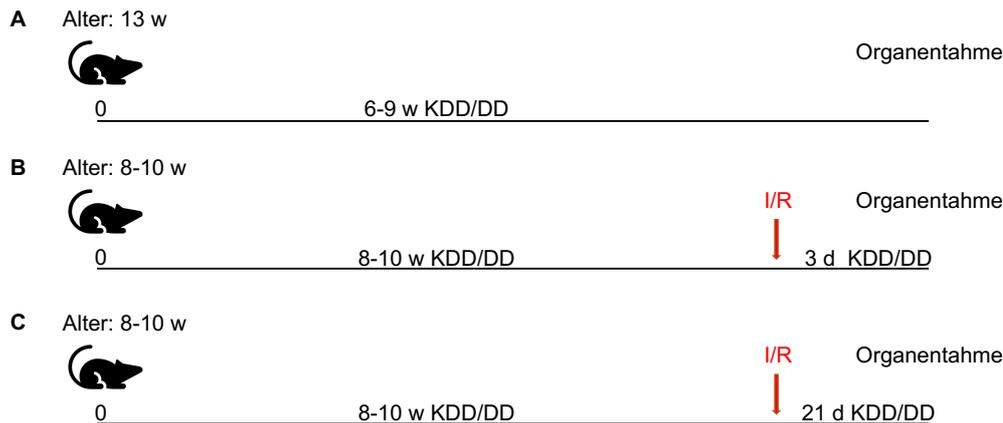


Abbildung 3: Schema der Behandlung der männlichen C57BL/6J-Wildtyp Mäuse.

A, 13 Wochen (w) alte Mäuse mit Fütterung über 6-9 w mit jeweils Kontrolldiät (KDD) oder diabetogene Diät (DD) und Organentnahme im Anschluss. **B**, 8-10 w alte Mäuse mit Fütterung über 8-10 w mit jeweils KDD oder DD, kardialer Ischämie/Reperfusion (I/R) und Organentnahme nach 3 Tagen (d). **C**, 8-10 w alte Mäuse mit Fütterung über 8-10 w mit jeweils KDD oder DD, I/R und Organentnahme nach 21 d.

2.4 Gewebeentnahme und Verarbeitung

Vor der Tötung und der Organentnahme wurde den Tieren die Nahrung für sechs Stunden (h) entzogen, um eine Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten. Das BAT wurde aus dem interskapulären Bereich entnommen und das WAT aus dem epididymalen Bereich.

Ein Drittel des jeweiligen Gewebes wurde für die Paraffinschnitte aufbereitet. Dafür wurde es in 4 % Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Ein weiteres Drittel wurde für die RNA-Analysen in Flüssigstickstoff und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung konserviert. Das letzte Drittel war für Proteinanalysen angedacht, welche jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden.

Blut wurde aus dem Herzen entnommen und durch Zentrifugieren nach Ethylendiamin-tetraessigsäure Zugabe das Blutplasma gewonnen und eingefroren.

2.5 Histologie

2.5.1 Anfertigung und Aufarbeitung von Paraffinschnitten

Am Rotationsmikrotom wurden Paraffinschnitte von 5 Mikrometer (μm) angefertigt. Im Durchschnitt wurden die ersten 5000 – 10 000 μm eines Paraffinblockes verworfen, um auf eine repräsentative Stelle des Gewebes zu kommen. Anschließend wurden 150 μm des Blockes konsekutiv geschnitten und 10 Objektträger mit je zwei Schnitten erstellt. Diese wurden mithilfe eines

Paraffinstreckbads angefertigt. Nachdem die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur gelagert wurden, fand die Hitzefixierung bei 60° C für eine Stunde statt.

Das Entparaffinieren des Gewebes wurde durch die dreimalige Anwendung von Roticlear® für 15 Minuten (min) und darauffolgend jeweils für 2 min von Ethanol absolut, Ethanol 96 % (V/V) und Ethanol 70 % (V/V) vorgenommen.

Anschließend wurde die Hämatoxylin und Eosin- (H&E) sowie die MAC2-Färbung durchgeführt (siehe 2.4.2. und 2.4.3).

Zum Schluss wurden die gefärbten Präparate mit dem Ethanol 70 % (V/V), Ethanol 96 % (V/V), Ethanol absolut für jeweils 2 min und Roticlear® für 5 min zur Entwässerung behandelt. Mit dem Roti®-Mount wurden die Objektträger eingedeckt.

2.5.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Vorbereitend wurde das Präparat mit PBS zwei Mal für 5 min und anschließend mit destilliertem Wasser für 1 min gewaschen. Darauf folgte die Kernfärbung mit der Hämalaun-Lösung für 1 min, sowie das Waschen mit Leitungswasser und 1-prozentiger HCl Lösung. Die Präparate wurden dann für 10 min mit Leitungswasser gebläut. Schließlich erfolgte für 1 min die Färbung mit 1 % (m/V) Eosin.

2.5.3 MAC2-Färbung

Als erstes wurde das Gewebe drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurde es für 1 h mit einer wässrigen Lösung, bestehend aus 10% FCS und 1% BSA in 1xTBS (hergestellt aus 10xTBS mit 24,2 g Trispuffer, 80g NaCl ad 1 L *Aqua dest*), bei Raumtemperatur blockiert, um Signale anderer Immunglobuline auszuschalten. BSA wurde auf den ersten Schnitt, die Negativkontrolle, pipettiert. Auf den Zweiten kam der anti-Maus-Mac2-Antikörper (siehe Tabelle 7). Die Inkubation fand über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C statt.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Um vorhandene Peroxidasen zu inaktivieren, wurde es mit einer 3 % verdünnten H₂O₂-Lösung für 5 min behandelt. Das Gewebe wurde erneut drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Ziegen Anti-Ratte IgG2a Sekundärantikörper auf die Schnitte pipettiert und inkubierte 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten

Kammer. Nochmals fand ein dreimaliges Waschen für 5 min mit PBS statt, sowie mit 1:10 TB für 10 min. Für die Detektion selbst wurde den Schnitten für 1 min 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt. Nach der erneuten Behandlung mit TB für 5 min wurde die Kernfärbung mit Hämalaun, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 7: Antikörper und Bindeproteine für die Mac 2 Färbung

| Gewebe | Antikörper | Katalognummer | Firma | Eingesetzte Konzentration |
|------------------------------------|---|----------------------|---|----------------------------------|
| BAT und WAT ohne I/R | <i>Anti-Mouse Mac-2 Monoclonal Antibody</i> | CL8942AP | Cedarlane, Burlington Ontario Kanada | 1:400 |
| BAT und WAT ohne I/R | <i>Goat anti-Rat IgG2a (HRP)</i> | NB7126 | Novus Biologicals, Littleton CO USA | 1:600 |
| BAT und WAT mit I/R nach 3d | <i>Anti-Mouse Mac-2 Monoclonal Antibody</i> | CL8942AP | Cedarlane, Burlington Ontario Kanada | 1:500 |
| BAT und WAT mit I/R nach 3d | <i>Goat anti-Rat IgG2a (HRP)</i> | NB7126 | Novus Biologicals, Littleton CO USA | 1:1000 |
| BAT und WAT mit I/R nach 21d | <i>Anti-Mouse Mac-2 Monoclonal Antibody</i> | CL8942AP | Cedarlane, Burlington Ontario Kanada | 1:400 |
| BAT und WAT mit I/R nach 21d | <i>Goat anti-Rat IgG2a (HRP)</i> | NB7126 | Novus Biologicals, Littleton CO USA | 1:600 |

2.5.4 Mikroskopieren

2.5.4.1 Analyse der Adipozytengröße

Die H&E Färbung diente der besseren Darstellung des Gewebes und ermöglichte somit eine Aussage über die Struktur. Insbesondere die Größe der Adipozyten konnte dadurch beurteilt werden.

Am Mikroskop Axio Imager.M2 wurde das Präparat, bei dem die H&E Färbung am besten gelungen war, fotografiert. Im Uhrzeigersinn wurde das Gewebe durchgemustert und es wurden jeweils fünf repräsentative Fotos angefertigt. Dabei war die ausgewählte Vergrößerung um die Gewebe jeweils am treffendsten darzustellen für das WAT x20 und für das BAT x40. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Fiji is just Image J* (FIJI) [55] und einem entsprechenden Makro (siehe Anhang), welches ursprünglich von Dr. Birte Valentin geschrieben wurde. Das Makro berechnete die Anzahl und Fläche der Adipozyten. Für das BAT wurde das Makro (siehe Anhang) angepasst. Dabei ist zu beachten, dass die Fettvakuolen in diesen Bildern analysiert wurden und nicht die einzelnen braunen Fettzellen, welche plurivakuolär sind. Die Quantifizierung der Fläche und Anzahl der Lipidtropfen ermöglichte entsprechend eine Aussage bezüglich der Veränderungen des Gewebes.

Sofern Artefakte, wie Blutgefäße, Bindegewebsstränge oder nicht geschlossene Fettzellen mitgezählt wurden, wurde eine manuelle Anpassung vorgenommen.

2.5.4.2 Analyse der Entzündungsreaktion

Um Aussagen über die Inflammation zu machen, wurde von dem MAC2 gefärbten Gewebe auf die gleiche Art und Weise wie für die H&E Färbung Aufnahmen angefertigt. Die Fotos wurden darauf einzeln im Programm ZEN 3.1 (blue edition) (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) untersucht. Das Signal, welches durch die Färbung hervorgebracht wurde, nennt sich *crown-like-structures*. Es besteht aus Makrophagen, welche sich an sterbenden Fettzellen sammeln. Bei der Auswertung wurden diese kronenartigen Strukturen, aber auch unvollständige positive Signale, gezählt, da sich die kronenartigen Strukturen auch über mehrere Ebenen erstrecken konnten.

2.6 Ribonukleinsäure Analyse

2.6.1 Ribonukleinsäure Isolation und *complementary desoxyribonucleic acid* Synthese

Die Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) -Isolation aus dem WAT und BAT erfolgte durch die Phenol-Chloroform Extraktionsmethode [56]. Als erstes wurde das eingefrorene Gewebe mit 1 ml peqGOLD TriFast™ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) in die gentleMACS™ Röhren überführt. Im gentleMACS™ Dissociator wurde das Gewebe dissoziiert. Darauf folgte das Zentrifugieren für 2 min bei 3000 Umdrehungen pro min in der *Centrifuge 5810 R*. Nun wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt und für 15 min bei 15000 rpm und Raumtemperatur in der *Centrifuge 5418 R* zentrifugiert. Dadurch entstand eine Trennung in drei Phasen, wovon die oberste, wässrige Phase abpipettiert wurde. Als nächstes wurde der wässrigen Phase 500 µl Isopropanol 70 % V/V hinzugefügt, um die RNA auszufällen. Dies erfolgte in der *Centrifuge 5424 R* für 30 min bei 4°C und 15000 rpm. Die überschüssige Flüssigkeit wurde abgesaugt, sodass nur noch ein RNA-Pellet überblieb. Dieses wurde mit 1 ml Ethanol 70 % (V/V) für 10 min unter denselben Bedingungen mit der *Centrifuge 5424 R* gewaschen und erneut abgesaugt. Um Reste des Ethanols zu entfernen, wurden die Proben bei 65° C im *Mixing Block MB-102* eingesetzt. Anschließend wurde 50 µl RNase freies Wasser (Merck Millipore, Darmstadt) hinzugefügt und für fünf min bei 65° C schüttelnd inkubiert.

Am *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* wurde dann die mRNA-Konzentration gemessen, um die entsprechenden Mengen für die cDNA-Synthese einsetzen zu können. Für die cDNA-Synthese wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurden 2 µl *gDNA Wipeout* zu 1 µg RNA eingesetzt und anschließend mit 4 µl *Reverse transcriptase Buffer*, 1 µl *Primer Mix* und 1 µl *Reverse transcriptase* vermischt. Die Proben inkubierten dann für 2 min bei 42 °C *Mastercycler personal* (Eppendorf AG, Hamburg). Zum Schluss wurde 100 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Die cDNA wurde bei 4° C zwischengelagert.

2.6.2 *Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*

Die verwendeten Primer wurden in der Tabelle 8 zusammengefasst. Die mit Hilfe dieser Primer amplifizierten Gene dienen als Marker für die Inflammation und die

Lipolyse. Die Analyse erfolgte am StepOnePlus™ Real-Time *polymerase chain reaction* (PCR)-System (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Singapur). Es wurden jeweils 2,5 µl *Primer* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA USA oder für Perilipin Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die Konzentration des *Forward* und *Reverse Primer* betrug dabei 0,625 µM. 2,5 µl cDNA und 5 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies™, Carlsbad, CA USA) wurden dem hinzugefügt. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

Prinzipiell durchliefen die Proben mehrmals die Schritte der Denaturierung, des *Annealing*, der Elongation und wurden somit exponentiell amplifiziert. Anschließend fand eine Dissoziation statt. Diese Schritte wurden entsprechend des etablierten Protokolls des Labors (siehe Tabelle 9) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der StepOnePlus™ Software v2.3. Darauf erfolgte eine relative Quantifizierung mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode, wobei eine Korrektur der Expression der Zielgene mit der Expression von 18s durchgeführt wurde.

Tabelle 8: Primer zur messenger Ribonucleic acid (mRNA)-Genexpression Analyse

| Gen | Forward-Primer 5'-3' | Reverse-Primer 5'-3' |
|--------------|--|--|
| 18s | GCAATTATTCCCCATGAACG | GGCCTCACTAAACCATCCAA |
| Tnfa | TCGAGTGACAAGCCTGTAGC | AAGGTACAACCCATCGGCTG |
| Il1b | GGATGAGGACATGAGCACCT | CGTCACACACCAGCAGGTTA |
| Il6 | GATGGATGCTACCAAACCTGGA | GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA |
| Mcp1 | CCCAATGAGTAGGCTGGAGA | TCTGGACCCATTCCTTCTTG |
| Hsl | GGGCTTCCAGTTCACACCTG | GAATCGGCCACCGGTAAAGA |
| Atgl | CTCCAAGGGGTGCGCTATG | GAGGCGGTAGAGATTGCGAA |
| Plin1 | Angaben des Herstellers QuantiTect® Primer Assay Mm_Plin1_SG Cat. No. QT00150360 (Qiagen, Hilden) | Angaben des Herstellers QuantiTect® Primer Assay Mm_Plin1_SG Cat. No. QT00150360 (Qiagen, Hilden) |
| Ucp1 | TCAGGATTGGCCTCTACGAC | TGCCACACCTCCAGTCATTA |

Tabelle 9: Standardprotokoll zur Durchführung der *quantitative Polymerase chain reaction* (qPCR)

| | <i>Holding Stage</i> | | <i>Cycling Stage x40</i> | | <i>Melt curve Stage</i> | | |
|------------|-----------------------------|------|---------------------------------|------|--------------------------------|---------------------------|------|
| Temperatur | 50° C | 95°C | 95°C | 60°C | 95°C | 60°C | 95°C |
| Dauer | 2 min | 2min | 15 s | 30 s | 15 s | + 0,3°C Schritte 1 min | 15 s |

2.7 Datenverarbeitung und Statistische Auswertung

Sowohl die Daten, welche mit den Makros gewonnen wurden, wie auch die manuell ausgezählten Daten, wurden zunächst in Excel (© 2020 Microsoft Corporation, Microsoft Excel 16.40, Redmond WA 98052-6399 USA) zusammengetragen. Um eine zusätzliche Aussage zu der Adipozyten- und Fettvakuolengröße treffen zu können, wurden definierte Größenbereiche festgelegt.

Bei dem WAT wurden die Ergebnisse zur Adipozytenfläche und zu den kronenähnlichen Strukturen in absoluten Werten und bezogen auf 100 Adipozyten angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (GraphPad Software, GraphPad Prism Macintosh Version by Software MacKiev © 8.4.3 (471), La Jolla CA, USA).

Vorweg wurde die Normalverteilung der Datensätze geprüft und Ausreißer mit der *ROUT* Methode (Q=1%) ausgeschlossen. Unter dieser Voraussetzung wurde dann bei zwei Datensätzen der ungepaarte, zweiseitige *Student's t-test* durchgeführt. Bei multiplen Datensätzen wurde eine *Sidak multiple comparisons test One-way ANOVA* durchgeführt. Sofern die Ergebnisse nicht einer Normalverteilung entsprachen, wurde der Mann-Whitney-U Test ausgeführt.

Um die Daten der RNA-Analyse statistisch zu bewerten, wurde diese im Vorfeld logarithmiert. Bei P-Werten $\leq 0,05$ wurden die Ergebnisse als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der diabetogenen Diät auf das braune und weiße Fettgewebe

Um den Einfluss hochkalorischer Fütterung auf die Morphologie der Fettdepots zu beobachten, wurde zuerst die Fläche der Fettvakuolen bzw. der Adipozyten und ihre Anzahl quantifiziert. Danach wurde die Genexpression von Lipolyse und Thermogenese Marker gemessen.

Schließlich sollten ebenfalls die durch die Diät herbeigeführten Veränderungen bezüglich der Inflammation charakterisiert werden. Hierzu dienten die CLS und die Quantifizierung der Genexpression inflammatorischer Mediatoren.

3.1.1 Einfluss auf die Morphologie und die Genexpression von Markern des Lipidmetabolismus

Im BAT zeigten sich bezüglich der Fläche der Fettvakuolen und ihre Anzahl signifikante Unterschiede (Abb. 4A). Die Fläche war unter der diabetogenen Diät im Durchschnitt $21\,700 \pm 6\,967$ Mikroquadratmeter (μm^2), wobei sie für die Kontrollgruppe bei $7\,392 \pm 1\,186$ μm^2 lag. Somit war die Fläche der Fettvakuolen durch die DD-Diät um circa das dreifache erhöht. Entsprechend lag die Anzahl an Fettvakuolen für DD bei $11\,008 \pm 2\,500$ und für KDD bei $20\,119 \pm 1\,874$. Darüber hinaus wurde im BAT die Genexpression von *Atgl*, *Hsl* und *Plin1* für die Lipolyse-Aktivität sowie von *Ucp1* für die Thermogenese-Aktivität bestimmt, welche sich nach der diabetogenen Diät nicht signifikant unterschieden (Abb. 4C).

Im WAT zeigten sich ebenso signifikante Unterschiede im Hinblick auf Fläche und Anzahl der Fettvakuolen (Abb. 5A). Durch die DD-Diät stieg die Fläche der Adipozyten auf $5\,367\,182 \pm 1\,123\,148$ μm^2 , wobei sie bei den KDD gefütterten Mäusen bei $1\,527\,142 \pm 250\,836$ μm^2 lag. Dementsprechend befand sich die Anzahl an Adipozyten für DD bei $173,6 \pm 27,44$ und für KDD bei $607,2 \pm 100,7$.

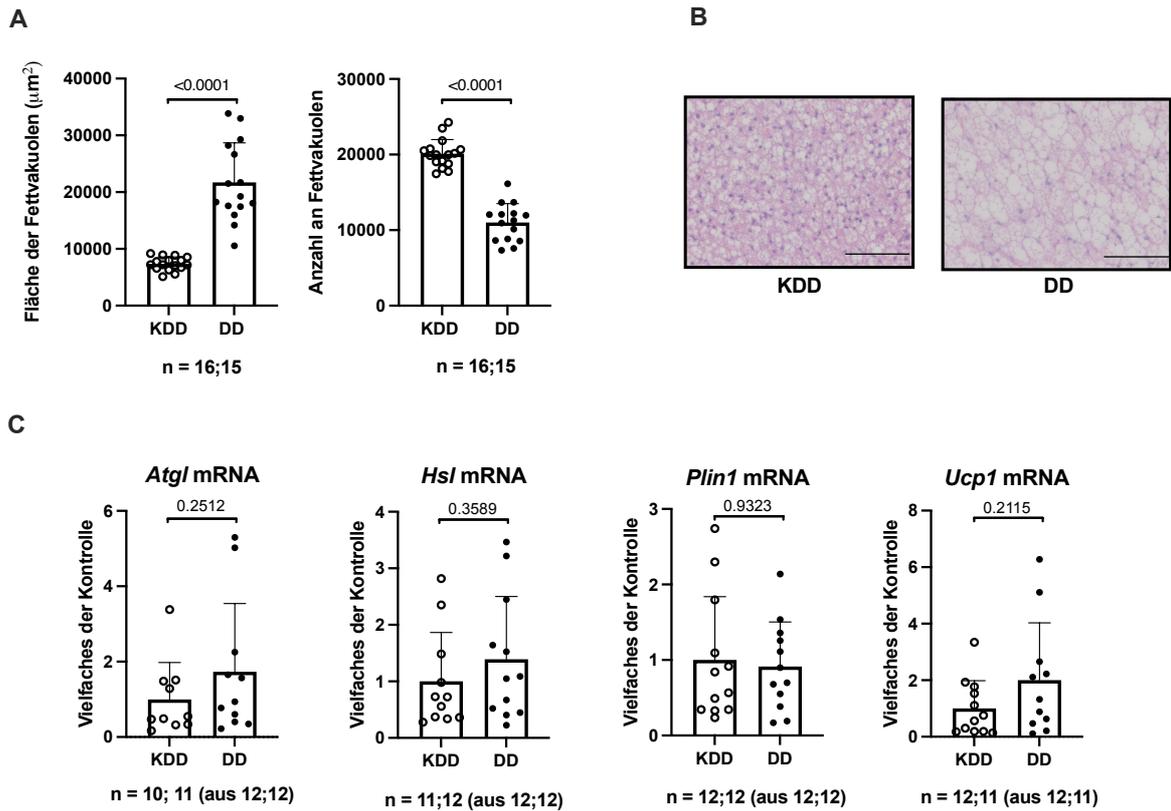


Abbildung 4: Effekte der diabetogenen Diät auf den Lipidmetabolismus im braunen Fettgewebe.

A, Fläche und Anzahl der Fettvakuolen. **B**, Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin & Eosin Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm , 40x Vergrößerung. **C**, Messenger ribonucleic acid (mRNA) Expression der Gene Adipozyten-Triglycerid-Lipase (*Atgl*), Hormon-sensitive Lipase (*Hsl*), Perilipin 1 (*Plin1*) und Uncoupling-protein 1 (*Ucp1*).

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* (verwendet für Fläche der Fettvakuolen, Anzahl der Fettvakuolen, *Hsl* und *Ucp1*) oder Mann-Whitney-U Test (verwendet für *Atgl* und *Plin1*) berechnet für $p \leq 0,05$.

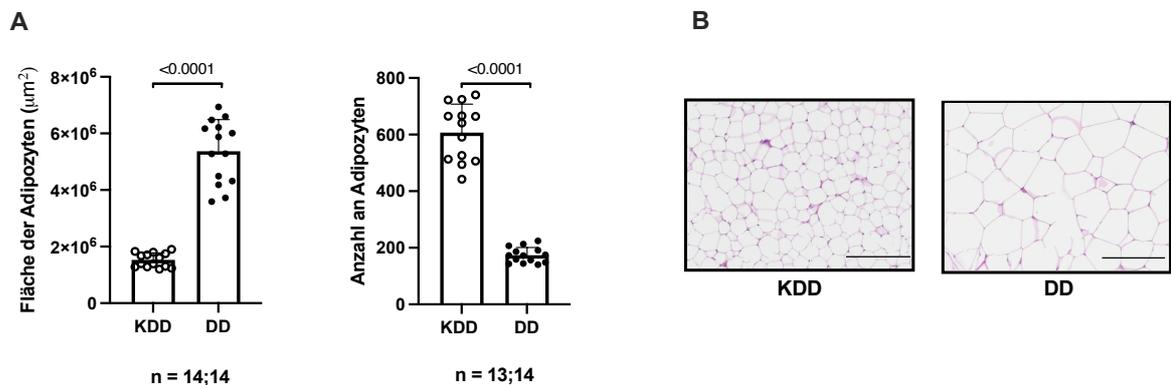


Abbildung 5: Effekte der diabetogenen Diät auf den Lipidmetabolismus im weißen Fettgewebe.

A, Fläche und Anzahl der Adipozyten. **B**, Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin & Eosin Färbung. Maßstabsbalken: 200 μm , 20x Vergrößerung.

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$.

3.1.2 Einfluss auf die *crown-like-structures* und die Genexpression von Inflammations-Markern

Die Entzündungsreaktion konnte anhand der Quantifizierung der CLS bei der histologischen Aufarbeitung nachgewiesen werden. Diese waren signifikant durch die diabetesfördernde Diät erhöht.

Im BAT lag die Anzahl an CLS abs. im Durchschnitt für die DD-Gruppe bei $10,54 \pm 7,92$ und für die KDD-Gruppe bei $0,73 \pm 0,88$ (Abb. 6A). Somit erhöhte sich durch die diabetogene Diät die Anzahl an CLS im Durchschnitt um das 10-fache.

Dazu stieg die Expression von *Mcp1* im BAT durch die DD-Diät signifikant an mit $9,73 \pm 8,89$ im Vergleich zu $1 \pm 0,96$ bei der Kontrolle (Abb. 6B). *I11b* und *Tnfa* waren nicht signifikant verändert (Abb. 6B). *I16* wurde für das braune Fettdepot ebenfalls bestimmt, doch waren die Ergebnisse nicht interpretierbar, da die Schwankungen der Einzelwerte zu groß waren.

Im WAT erhöhte sich die Anzahl an CLS signifikant mit $4,27 \pm 3,42$ für die DD-Gruppe, im Vergleich zu $0,34 \pm 0,37$ in der KDD-Gruppe (Abb. 7A).

Im WAT unterschieden sich die Expression von *Tnfa* und *Mcp1* zwischen Kontrollen und DD-Diät nicht signifikant (Abb. 7B).

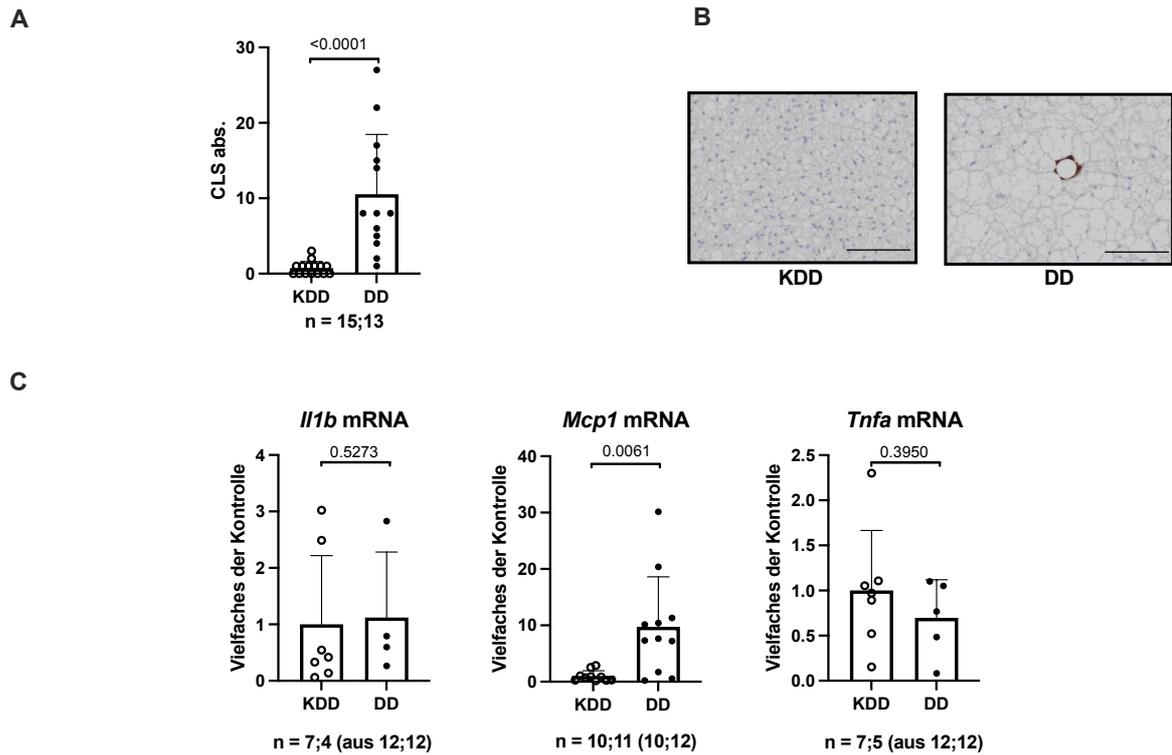


Abbildung 6: Effekte der diabetogenen Diät auf die Inflammation im braunen Fettgewebe.

A, Anzahl an *crowd-like-structures* (CLS) in absoluten Zahlen (abs.) **B**, Repräsentative Aufnahmen der MAC2-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m, 40x Vergrößerung. **C**, Messenger ribonucleic acid (mRNA) Expression der Gene Interleukin 1 beta (*Il1b*), monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp1*) und Tumornekrosefaktor alpha (*Tnfa*).

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$.

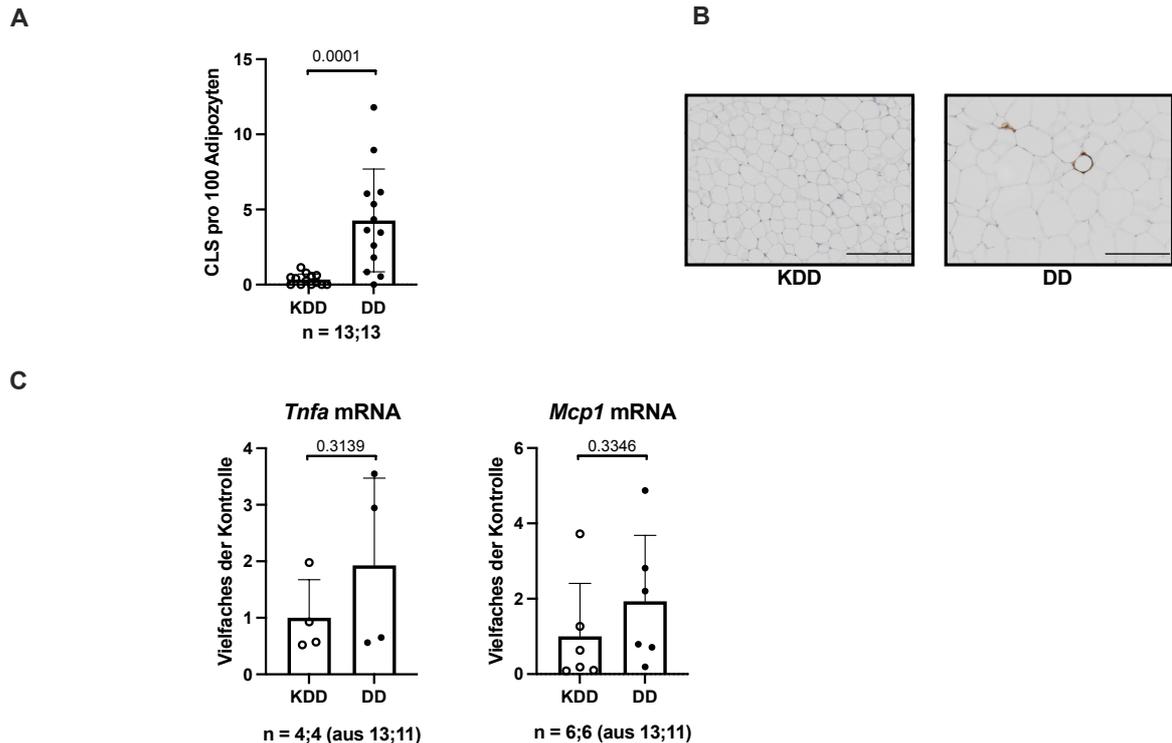


Abbildung 7: Effekte der diabetogenen Diät auf die Inflammation im weißen Fettgewebe.

A, Anzahl an CLS pro 100 Adipozyten im weißen Fettgewebe. **B**, Repräsentative Aufnahmen der MAC2-Färbung. Maßstabsbalken: 200 μ m, 20x Vergrößerung. **C**, Messenger ribonucleic acid (mRNA) Expression der Inflammation assoziierten Gene Tumornekrosefaktor alpha (*Tnfa*) und monocyte chemoattractant protein-1 (*Mcp1*).

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$.

3.2 Effekte der Ischämie/Reperfusion zu verschiedenen Zeitpunkten im Diabetesmodell im braunen und weißen Fettgewebe

Im Folgenden sollten die oben aufgeführten histologischen und Genexpressionsuntersuchungen an Proben durchgeführt werden, welche 3 Tage und 21 Tage nach der kardialen I/R gewonnen wurden.

3.2.1 Einfluss auf die Morphologie und die Genexpression von Markern des Lipidmetabolismus

Im Hinblick auf die Morphologie ließ sich im BAT der DD-Fütterung im Vergleich zur Kontrolle festhalten, dass die Fläche der Vakuolen basal und 21 Tage nach I/R signifikant größer und die Anzahl geringer waren (Abb.8A). 3 Tage nach der I/R war dies nicht mehr der Fall (Abb.8A). Zudem unterschieden sich Fläche und Anzahl der Adipozyten der mit DD-gefütterten Tiere zwischen 3 und 21 Tage signifikant (Abb.8A). So waren die Fettvakuolen nach 21 Tage größer und die Anzahl geringer

als unmittelbar nach der kardialen I/R nach 3 Tage (Abb.8A). Bei den mit KDD-gefütterten Mäusen war die Anzahl der Fettvakuolen bei den Kontrollen ebenfalls signifikant niedriger nach 21 Tage (Abb. 8A).

Zusätzlich wurden *mRNA*-Analysen zu *Atgl*, *Hsl*, *Plin1* und *Ucp1* durchgeführt, welche keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen Kontrollen und DD-Fütterungen 3 Tage (Abb.8B) und 21 Tage (Abb.8C) nach I/R zeigten.

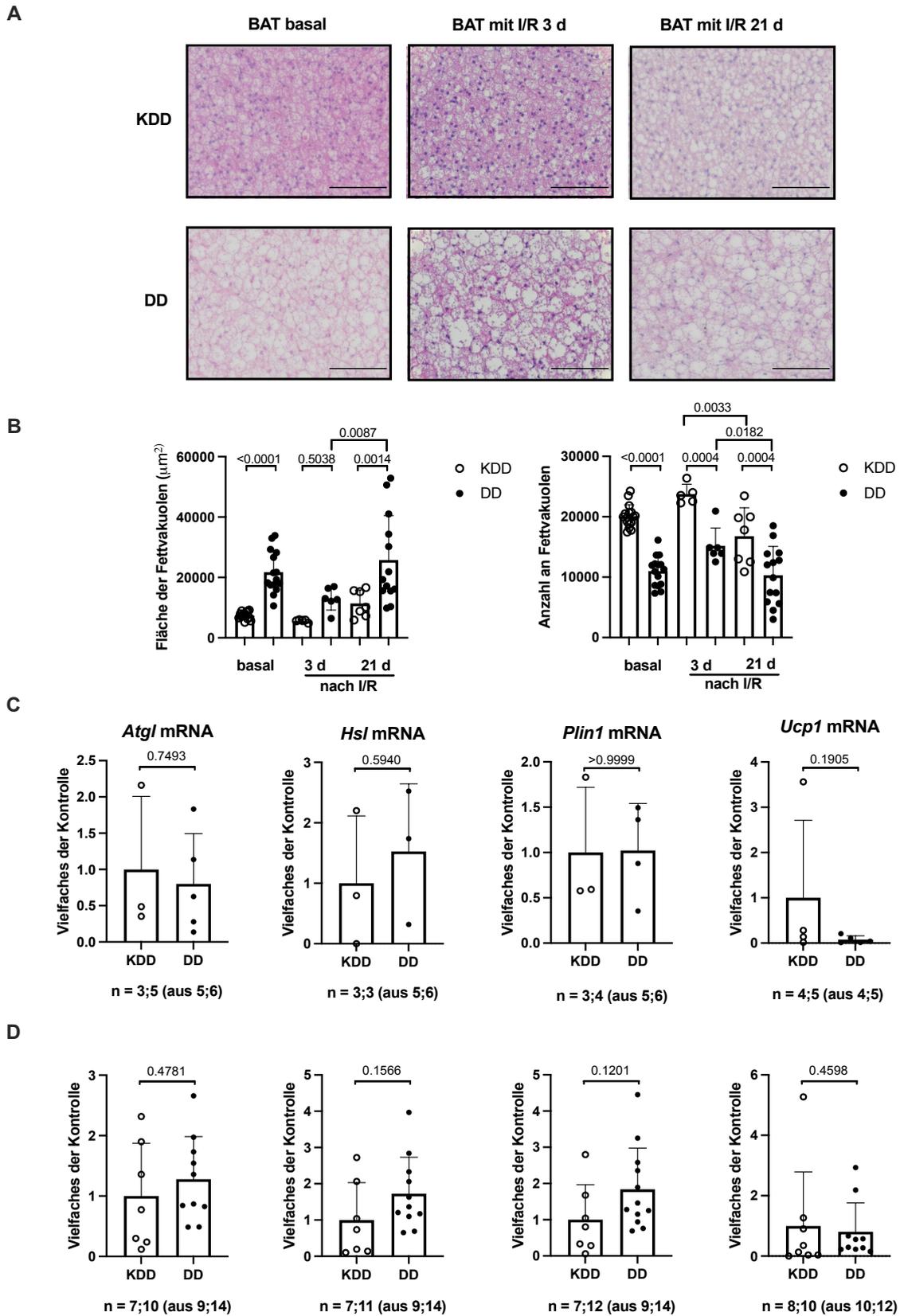


Abbildung 8: Effekte der diabetogenen Diät (DD) und der Ischämie/Reperfusion (I/R) auf den Lipidmetabolismus im braunen Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT).

A, Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin & Eosin Färbung. Maßstabsbalken: 100 μm , 40x Vergrößerung. **B**, Fläche und Anzahl der Fettvakuolen im BAT basal ($n = 16;15$), 3 ($n = 5;6$) und 21 ($n = 7;14$) Tage (d, *days*) nach I/R. **C**, *messenger ribonucleic acid* (mRNA) Expression der Gene

Adipozyten-Triglycerid-Lipase (*Atgl*), Hormon-sensitive Lipase (*Hsl*), Perilipin 1 (*Plin1*) und *Uncoupling-protein 1* (*Ucp1*) im BAT nach 3 d. **D**, mRNA-Expression der Gene *Atgl*, *Hsl*, *Plin1* und *Ucp1* im BAT 21 d nach I/R.

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden für **B** mit der *one way* ANOVA berechnet für $p \leq 0,05$. Signifikanzen wurden für **C** *Atgl*, *Hsl* und **D** *Atgl*, *Hsl*, *Plin1* mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p < 0,05$. Signifikanzen wurden für **C** *Plin1*, *Ucp1* und **D** *Ucp1* mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet für $p \leq 0,05$.

Außerdem wurde die Größenverteilung der Adipozyten je nach Fütterung und Zeitpunkt im Bezug zum I/R dargestellt. Es wurde deutlich, dass eine DD-Fütterung zu einer signifikant erniedrigten Anzahl an Fettvakuolen $< 10\ 000\ \mu\text{m}^2$ und einer signifikant vermehrten Anzahl an Fettvakuolen $> 20\ 000\ \mu\text{m}^2$ im BAT basal, nach 3 und 21 Tage nach I/R, führte (Abb. 9A, 9B und 9C).

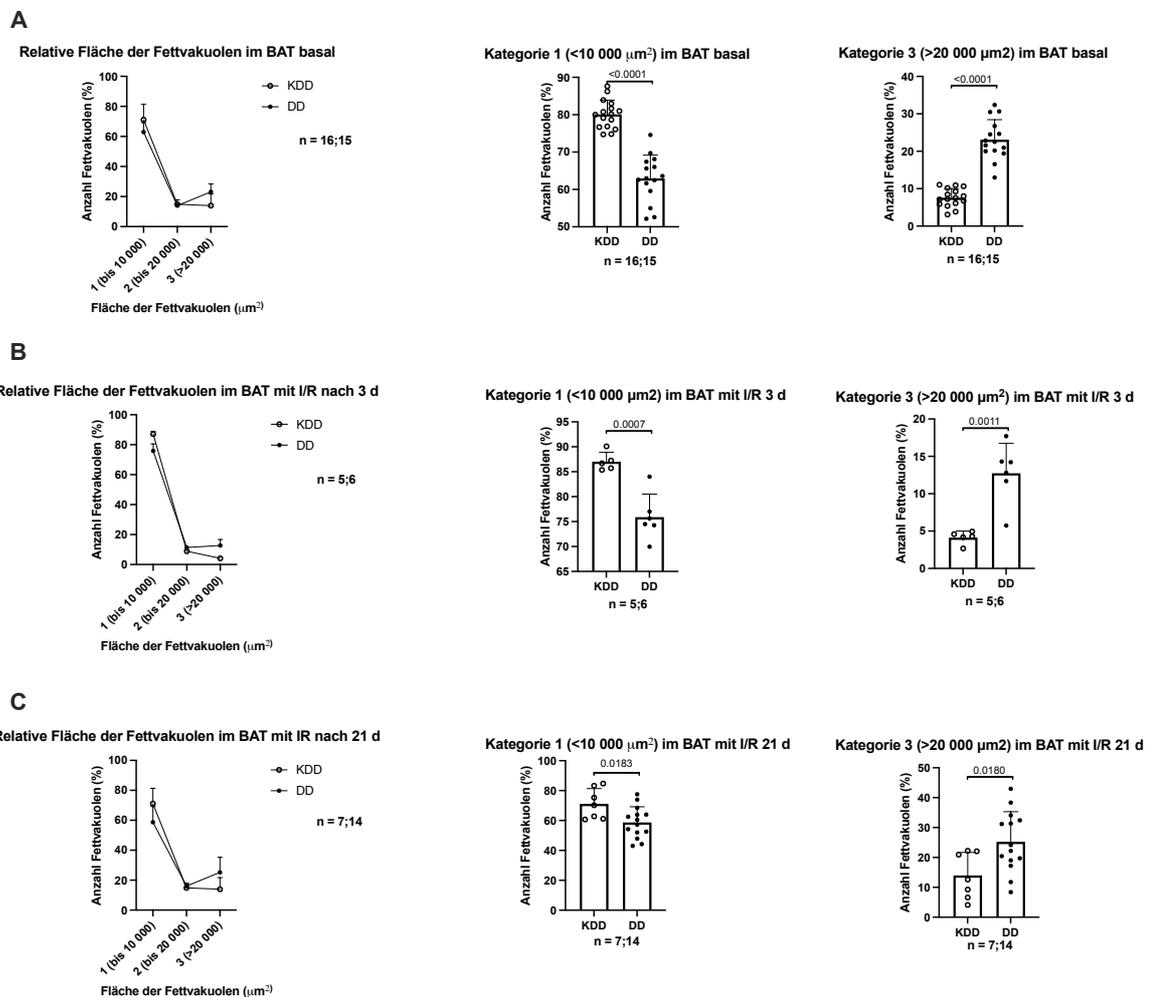


Abbildung 9: Relative Größenverteilung der Fettvakuolen im braunen Fettgewebe (*brown*

adipose tissue, BAT) basal, 3 und 21 Tage (d, days) nach Ischämie/Reperfusion (I/R) bei diabetogener Diät (DD) und Kontrolldiät (KDD).

A, Größenverteilung im BAT basal n = 16;15. **B**, Größenverteilung im BAT 3 d nach I/R n = 5; 6.

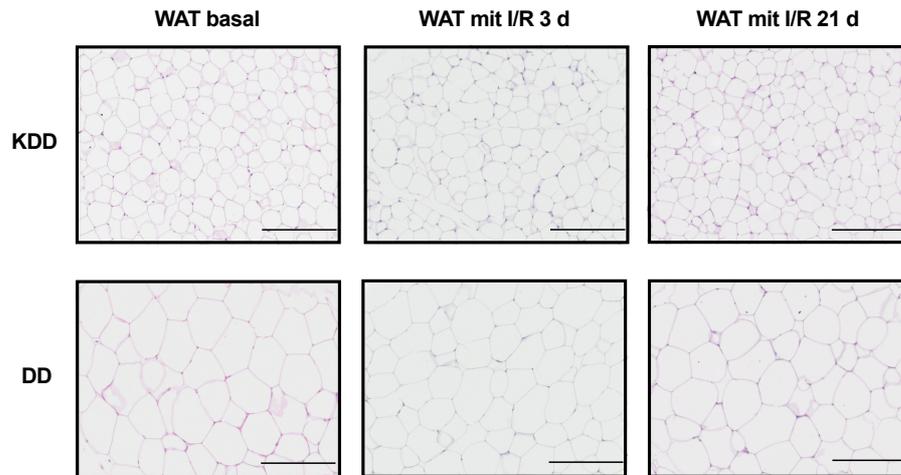
C, Größenverteilung im BAT 21 d nach I/R n = 7;14. Bestimmung der Größenverteilung mittels Ausbildung von drei Kategorien an Fettvakuolen: Kategorie 1 mit bis zu 10 000 μm^2 , Kategorie 2 mit 10 000 μm^2 bis 20 000 μm^2 , Kategorie 3 über 20 000 μm^2 .

Gezeigt wurde die relative Verteilung der Flächenkategorien in %.

Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

Die Experimente wurden analog zum BAT im WAT durchgeführt, um auch hier den Einfluss der Diät und der kardialen der I/R zu untersuchen. Hierbei wurde ein signifikanter Anstieg der Fläche der Adipozyten bei den DD gefütterten Mäusen im WAT basal, 3 und 21 Tage nach I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich (Abb.10). Entsprechend ließ sich eine signifikant geringere Anzahl an Adipozyten detektieren (Abb.10). Zwischen den drei Zeitpunkten zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede (Abb.10).

A



B

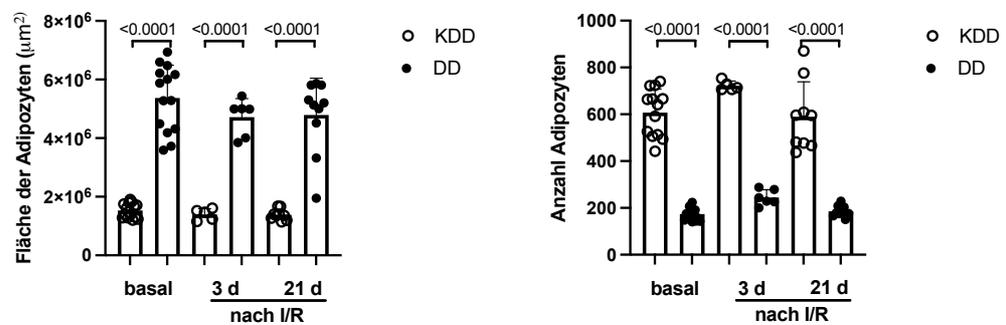


Abbildung 10: Effekte der diabetogenen Diät (DD) und der Ischämie/Reperfusion (I/R) auf den Lipidmetabolismus im weißen Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT).

A, Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin & Eosin Färbung. Maßstabsbalken: 200 μm , 20x Vergrößerung. **B**, Fläche und Anzahl der Adipozyten im WAT basal, 3 d und 21 d nach I/R, basal $n = 14;14$, 3 d nach I/R $n = 5;6$, 21 d nach I/R $n = 8;11$. Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden mit der *one way ANOVA* berechnet für $p \leq 0,05$.

Zudem ließ sich zur Verteilung der Adipozytengröße ein vergleichbarer Effekt wie beim BAT beobachten. Die diabetogene Fütterung führte zu einer Zunahme der großen und einer Abnahme der kleinen Adipozyten im WAT. Es gab eine signifikant erniedrigte Anzahl an Adipozyten mit einer Größe zwischen 500 000 – 1 000 000 μm^2 und eine signifikant vermehrte Anzahl an Adipozyten mit einer Größe über 5 000 000 μm^2 bei DD-gefütterten Tieren im WAT sowohl basal, als auch 3 und 21 Tage nach I/R (Abb.11).

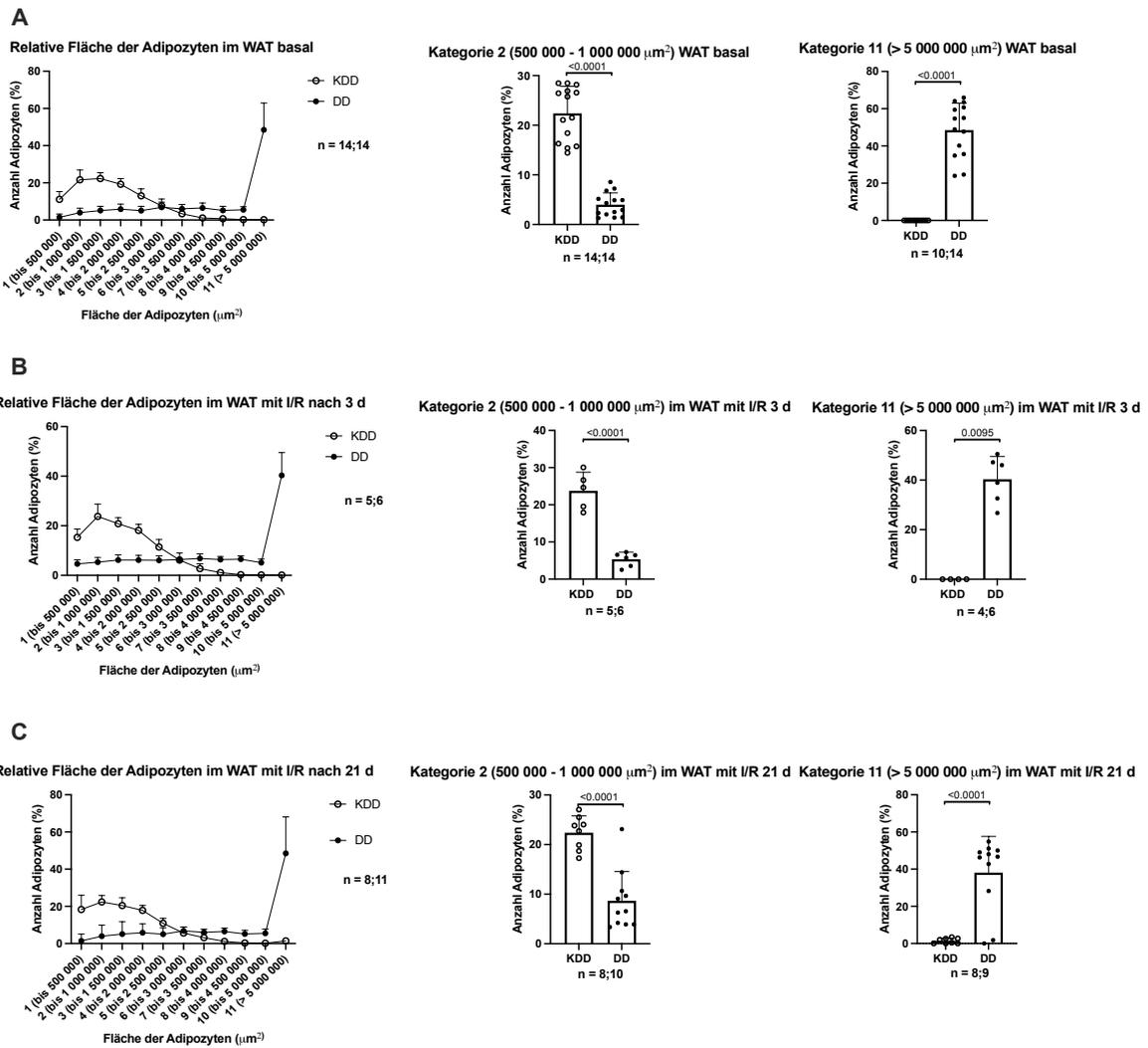


Abbildung 11: Relative Größenverteilung der Adipozyten im weißen Fettgewebe (*white adipose tissue*, WAT) basal, 3 und 21 Tage (d, days) nach Ischämie/Reperfusion (I/R) bei diabetogener Diät (DD) und Kontrolldiät (KDD).

A, Größenverteilung im WAT basal für Kategorie 2 $n = 14;14$ und Kategorie 11 $n = 10;14$.

B, Größenverteilung im WAT 3 d nach I/R für Kategorie 2 $n = 5;6$ und Kategorie 11 $n = 4;6$.

C, Größenverteilung im WAT 21 d nach I/R für Kategorie 2 $n = 8;10$ und Kategorie 11 $n = 8;9$.

Bestimmung der Größenverteilung mittels Ausbildung von 11 Kategorien an Adipozyten:

Kategorie 1 mit bis zu 500 000 μm^2 , Kategorie 2 mit 500 000 μm^2 bis 1 000 000 μm^2 ,

Kategorie 3 mit 1 000 000 μm^2 bis 1 500 000 μm^2 , Kategorie 4 mit 1 500 000 μm^2 bis 2 000 000 μm^2 ,

Kategorie 5 mit 2 000 000 μm^2 bis 2 500 000 μm^2 , Kategorie 6 mit 2 500 000 μm^2 bis 3 000 000 μm^2 ,

Kategorie 7 mit 3 000 000 μm^2 bis 3 500 000 μm^2 , Kategorie 8 mit 3 500 000 μm^2 bis 4 000 000 μm^2 ,

Kategorie 9 mit 4 000 000 μm^2 bis 4 500 000 μm^2 , Kategorie 10 mit 4 500 000 μm^2 bis 5 000 000 μm^2 ,

Kategorie 11 mit über 5 000 000 μm^2 .

Gezeigt wurde die relative Verteilung der Flächenkategorien in %.

Signifikanzen wurden mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

3.2.2 Einfluss auf die *crown-like-structures* und die Genexpression von Inflammationsmarkern

Schließlich wurden die gleichen Proben im Hinblick auf die Entzündungsreaktion untersucht. In der MAC2-Färbung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der absoluten

Anzahl an CLS durch die DD-Fütterung im BAT ohne I/R. Dieser Unterschied relativierte sich nach kardialer I/R und es konnte kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der jeweiligen Diät mehr festgestellt werden (Abb.12A).

Die mRNA-Expression im BAT von *Il1b* und *Mcp1* war je nach Diät nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Vergleichsgruppen (Abb.12B und C). Dies galt auch für *Tnfa* und *Il6*, wobei die Ergebnisse im BAT drei Tage nach I/R nicht interpretierbar waren, da einige Messwerte außerhalb des Detektionsbereichs lagen und deshalb nicht aufgeführt sind (Abb.12B und C).

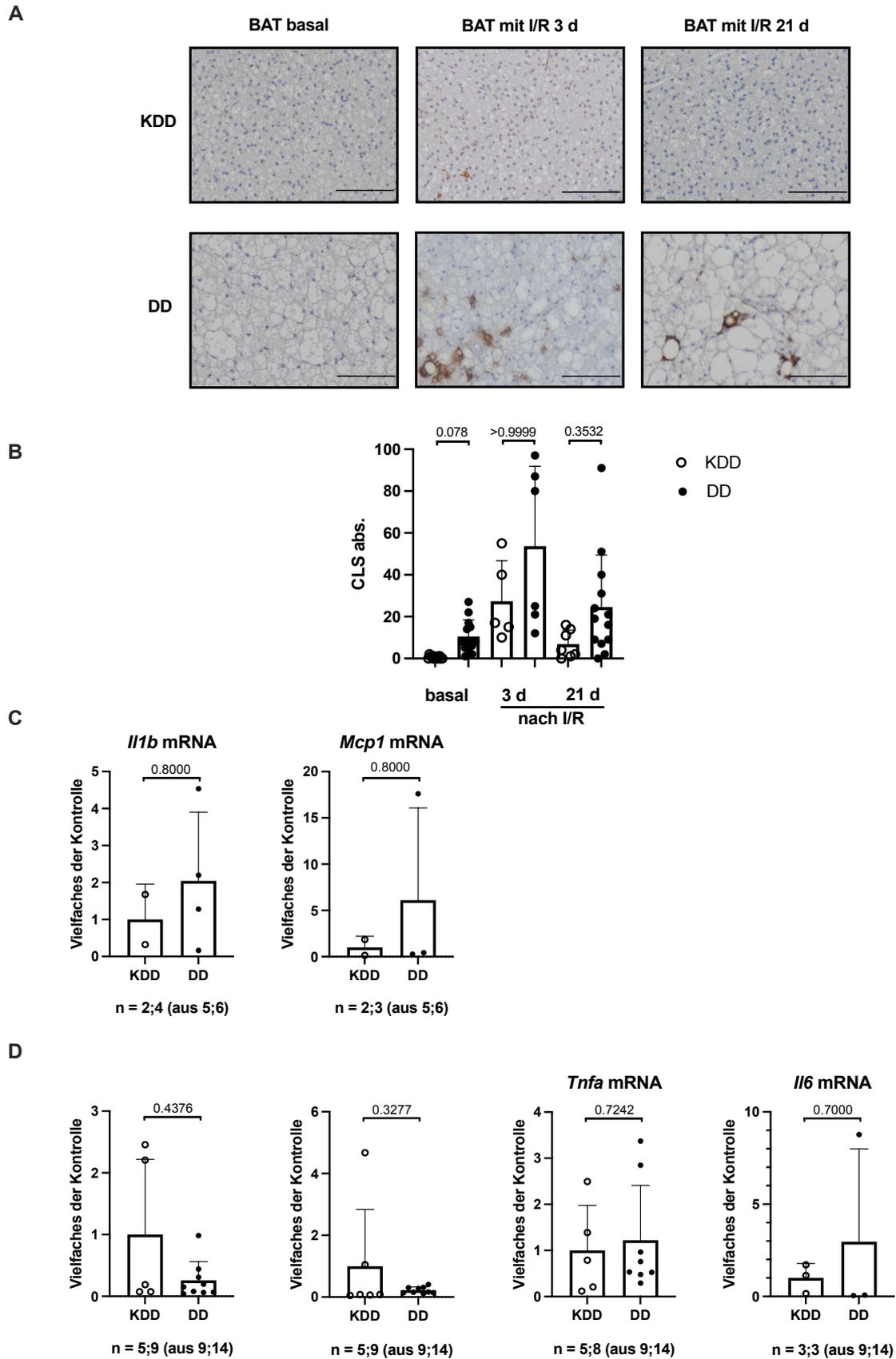


Abbildung 12: Effekte der diabetogenen Diät (DD) und der Ischämie/Reperfusion (I/R) auf die Inflammation im braunen Fett (*brown adipose tissue*, BAT).

A, Repräsentative Aufnahmen der MAC2-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m, 40x Vergrößerung.
B, Anzahl an *crown-like-structures* (CLS) pro 100 Fettvakuolen im BAT basal ($n = 13;13$), 3 Tage (d, *days*) ($n = 5;6$) und 21 d ($n = 7;13$) nach I/R. **C**, *messenger ribonucleic acid* (mRNA)-Expression der

Inflammation assoziierten Gene Interleukin 1 beta (*Il1b*) und *monocyte chemoattractant protein-1* (*Mcp1*) im BAT nach 3 d. **D**, mRNA-Expression der Gene *Il1*, *Mcp1*, Tumornekrosefaktor alpha (*Tnfa*) und Interleukin 6 (*Il6*) im BAT 21 d nach I/R.

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD.

Signifikanzen wurden für **B** mit dem Kruskal-Wallis Test berechnet für $p \leq 0,05$.

Signifikanzen wurden für **C** und **D** mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet für $p \leq 0,05$.

Es wurden für das WAT ebenso MAC2-Färbungen angefertigt. Dabei gab es einen signifikanten Anstieg der Anzahl an CLS pro 100 Adipozyten bei DD-Fütterung basal und 21 Tage nach I/R (Abb. 13A). Für die Proben 3 Tage nach I/R galt dies nicht (Abb. 13A). Der Entzündungsmarker *Mcp1* wurde im WAT 21 Tage nach I/R bei DD-Fütterung mehr als doppelt so häufig detektiert als bei der Kontrolle (Abb. 13C). Für *Tnfa* waren die Ergebnisse im WAT 21 Tage nach I/R je nach Diät nicht statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 13C). Bei der *Mcp1* und *Tnfa*-mRNA Expression drei Tage nach dem I/R gab es in diesen Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 13B).

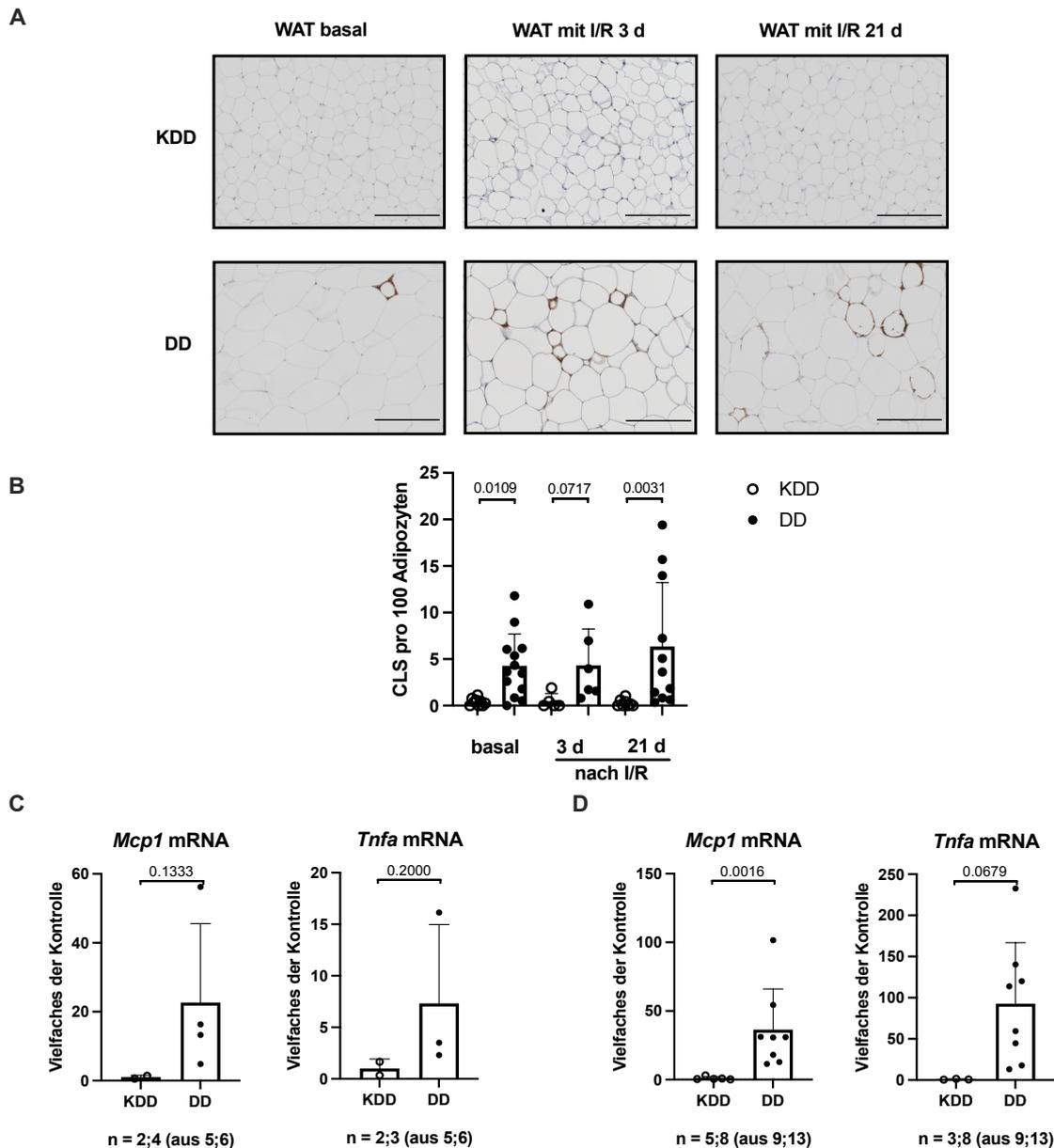


Abbildung 13: Effekte der diabetogenen Diät (DD) und der Ischämie/Reperfusion (I/R) auf die Inflammation im weißen Fett (*white adipose tissue*, WAT).

A, Repräsentative Aufnahmen der MAC2-Färbung. Maßstabsbalken: 200 μ m, 20x Vergrößerung.

B, Anzahl an *crown-like-structures* (CLS) pro 100 Adipozyten im WAT basal (n = 9;13), 3 Tage (d, days) (n = 5;6) und 21 d (n = 8;11) nach I/R. **C**, messenger ribonucleic acid (mRNA)-Expression der Gene *monocyte chemoattractant protein-1* (*Mcp1*) und Tumornekrosefaktor alpha (*Tnfa*) im WAT nach 3 d.

D, mRNA-Expression der Gene *Mcp1* und *Tnfa* im WAT 21 d nach I/R.

Vergleich von Kontrolldiät (KDD) mit diabetogener Diät (DD). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen wurden für **A** mit dem Kruskal-Wallis Test berechnet für $p \leq 0,05$.

Signifikanzen wurden für **B** *Mcp1*, *Tnfa* und **C** *Mcp1* mit dem Mann-Whitney-U Test berechnet für $p \leq 0,05$. Signifikanzen wurden für **C** *Tnfa* mit dem *unpaired t-test* berechnet für $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Auswahl des Mausmodells und experimentelles Schema

Die Experimente wurden im murinen Modell des Diät-induzierten Prädiabetes durchgeführt, wobei eine pathologische Stoffwechsellage mittels hochkalorischer Diät induziert wurde. Dabei war die Diät sowohl fett- als auch zuckerreich und Ballaststoffarm, entsprechend einer sogenannten westlichen Ernährung.

Verwendet wurden männliche C57BL/6J Mäuse. Die Auswahl von männlichen Mäusen bot in der hiesigen Fragestellung viele Vorteile. Zum einen sind männliche Mäuse im Kontext der diabetogenen Diät anfälliger für Hyperglykämien als weibliche Mäuse [57]. Ebenso sind sie gegenüber chronischer Inflammation prädisponierter [57]. Sie unterliegen demzufolge auch nicht den hormonellen Veränderungen des Zyklus. Die beschriebenen metabolischen Unterschiede zwischen den Geschlechtern begründeten also die Auswahl der männlichen Mäuse. Zukünftig sollten weitere Untersuchungen vergleichend mit weiblichen Mäusen angestrebt werden.

Die verwendeten C57BL/6J Mäuse waren dazu besonders Adipositas anfällig [57]. Sie zeigten in Untersuchungen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer diätinduzierten Adipositas und eine gesteigerte relative Fettmasse als für die Kontrollmäuse [57]. Ursächlich für die Prädisposition der C57BL/6J Mäuse gegenüber Fettleibigkeit hat sich eine Mutation im Bereich der Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase gezeigt, welche wesentliche Funktionen der Atmungskette einnimmt [58]. Bereits kurze Zeit nach Verabreichung einer hochkalorischen Diät zeigten sich bei den C57BL/6J Mäusen Umstellungen im Stoffwechsel, weshalb es sich für die Experimente dieser Arbeit besonders gut eignete. In einer Untersuchung mit C57BL/6J männlichen Mäusen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die metabolischen Veränderungen der hochkalorischen Diät erforscht [59]. Dabei wurde gezeigt, dass bereits nach drei Tagen eine Steigerung der Proliferation der Beta-Zellen im Pankreas stattfand [59]. Zudem wurde nach einer Woche eine erhöhte Glukosetoleranz beschrieben [59]. Eine tatsächliche Einschränkung der Insulintoleranz bestand dann ab einem Zeitraum von 11 Wochen hochkalorische Diät [59].

Nach der diabetogenen Fütterung war das Ziel, die Effekte der kardialen I/R auf das BAT und WAT zu bewerten. Der direkte Vergleich zwischen den Tieren im basalen Zustand nur unter Fütterung und nachfolgend mit I/R sollte jedoch mit Vorsicht

geschehen. Durch den operativen Eingriff zur Induktion der I/R gehörte auch eine Thorakotomie, wodurch idealerweise eine *sham*-operierte Vergleichsgruppe als zusätzliche Kontrolle dienen sollte.

Die Nutzung des Diät-induzierten Prädiabetes bei männlichen C57BL/6J Mäusen stellte zusammenfassend den Vorteil dar, dass die Entstehung der Erkrankung somit realistisch und analog zu den pathologischen Prozessen im Menschen erzeugt wurde.

Mensch und Maus teilen viele physiologische und genetische Gemeinsamkeiten, wodurch ein wissenschaftlicher Nutzen zu ziehen war [57]. Dass die im murinen Modell gewonnenen Ergebnisse jedoch nicht automatisch auf den Menschen übertragen werden konnten, ist selbstverständlich. Dennoch gaben die Versuche Hinweise bezüglich der Rolle des BAT und WAT im Kontext des metabolischen Syndroms und des MI. Eine Fortführung der Arbeit mit Untersuchungen an Großtieren wäre der nächste Schritt.

Zusätzliche bildgebende Methoden könnten ergänzend hinzugezogen werden. Insbesondere durch Computertomographie oder magnetische Resonanzverfahren lässt sich das Fettgewebe bzw. seine Verteilung präzise quantifizieren [53]. Diese nicht invasive Maßnahmen bieten des Weiteren den Vorteil, dass die Untersuchungen zu jedem Zeitpunkt durchgeführt und wiederholt werden könnten. Es wäre insbesondere interessant diese während der kardialen I/R oder in kurzen Abständen unmittelbar danach auszuführen. Dadurch könnte die dynamische Veränderung im Fettgewebe besser dargestellt werden. Grundsätzlich lässt sich auch beim Menschen durch bildgebende Verfahren Fettgewebe und insbesondere das BAT detektieren [60]. Aus diesem Grund würden auch weitere Untersuchungen an Probanden als möglich erscheinen.

4.2 Die diabetogene Diät als Auslöser der Dysfunktion des braunen und weißen Fettgewebes

4.2.1 Erhöhte Lipidspeicherung im braunen und weißen Fettgewebe durch die diabetogene Diät

Im ersten Schritt ging es darum, den Effekt der diabetogenen Diät auf das BAT und WAT zu bemessen. Die Größe der Fettvakuolen im BAT nahm um das Zweifache zu. Entsprechend reduzierte sich die Anzahl an dargestellten Fettvakuolen proportional. Ergänzend waren Genexpressionsanalysen von *Atgl*, *Hsl*, *Plin1* und *Ucp1* im BAT bei KDD und DD untersucht worden, wobei sich je nach Diät keine signifikante Differenz in der Expression zeigte. Im BAT wurden histologisch also andere Ergebnisse als auf der Genexpressionsebene erwartet worden wären gefunden. Durch eine hochkalorische Diät wäre vorstellbar gewesen, dass die Funktion des BAT eingeschränkt würde und somit die Expression von *Ucp1* reduziert wäre. Untersuchungen von *Ucp1* im BAT von C57BL/6J Mäusen zeigten sich bei anderen Arbeitsgruppen durch eine hochkalorische Diät signifikant erniedrigt [61]. Es bestanden bei diesen Experimenten jedoch zwei wesentliche Unterschiede im Vergleich zur aktuellen Arbeit. Zum einen erfolgte die Fütterung mit der Spezialdiät über einen circa doppelt so langen Zeitraum, nämlich von 16 Wochen [61]. Zum anderen wurden die Tiere bzw. das BAT vor Gewebeentnahme für 24h durch 4°C Kälte stimuliert [61]. Dadurch bestanden sicherlich bessere Bedingungen, um die Expression von *Ucp1* zu analysieren.

Gleichzeitig hätten Veränderungen im Lipolyse-Stoffwechsel erwartet werden können, wie bereits im Abschnitt 1.3.2. beschrieben. Die bisherige wissenschaftliche Annahme war, dass bei der hochkalorischen Diät und daraus folgenden Adipositas der Zellumsatz, und somit die Prozesse der Hypertrophie und Hyperplasie, im Fettgewebe beschleunigt waren [30]. Gleichzeitig wurde die überschüssige Energie im Fett gespeichert. Hypoxie, Inflammation und zelluläre Dysfunktion gingen mit erhöhter Lipolyse im WAT einher [35]. Zum Beispiel wäre also durch den Umbau und Untergang der Adipozyten durch die hochkalorische Diät eine Zunahme der Lipolyse und der Expression von *Atgl*, *Hsl* und *Plin1* vorstellbar gewesen. Experimente mit einer hochkalorischen Diät und der Untersuchung der eben genannten Enzyme im BAT wurden zum bisherigen Zeitpunkt nicht durchgeführt.

Zusammenfassend konnte die Zunahme der Größe der Fettvakuolen im BAT und der Adipozyten im Fettgewebe durch die Zunahme der Lipidspeicherung aufgrund der hochkalorischen Diät erklärt werden. Auf Veränderungen im Hinblick auf die Genexpression von *Atgl*, *Hsl*, *Plin1* und *Ucp1* im BAT bei hochkalorischer Diät konnte in den aktuellen Experimenten nicht geschlossen werden, entgegen der vorhandenen Datenlage.

Die Resultate der Färbungen und der qPCR schienen auf den ersten Blick also nicht komplett übereinstimmend zu sein. Zusätzlich zu berücksichtigen, blieb der Aspekt, dass es zwei unterschiedliche Messverfahren bzw. Untersuchungsansätze waren. Durch die qPCR wurde die Transkription der Gene gemessen, mit den histologischen Färbungen das Resultat verschiedener Einflüsse in der Proteinexpression dargestellt. Es sollte dazu in Betracht gezogen werden, dass die Halbwertszeit der Gene, welche für die Enzyme kodierten, eingeschränkt war. Dies bedeutet, dass die Gene zum Zeitpunkt der Gewebsentnahme nicht zwingend mehr reguliert und somit auch nicht detektierbar waren.

Die Größe der Adipozyten im WAT nahm um das Dreifache zu, mit entsprechend einer proportional reduzierten Anzahl an Adipozyten.

Diese Veränderungen wurden für das WAT bereits durch mehrere Forschergruppen nachgewiesen. In einer Untersuchung erhielten Kunming, C57BL/6, BALB/c und ICR Mäuse eine hochkalorische Diät für 10 Wochen [62]. Darauf zeigte sich in den histologischen Färbungen eine signifikante Zunahme der Adipozytengröße im Vergleich zur Kontrollgruppe [62]. In einem weiteren Experiment wurden bereits nach zwei Wochen der hochkalorischen Fütterung eine Zunahme des Gewichts, der Fettmasse und der Leptin Expression festgestellt [63]. Beim Abschluss der Fütterung nach zehn Wochen konnten mit dieser Zunahme einhergehend vermehrte Seneszenz Marker gefunden werden [63]. Somit bestand ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Lipidspeicherung und der Beschleunigung des biologischen Alterungsprozess der Fettzellen.

Abschließend standen die Veränderungen im WAT durch die hochkalorische Diät im Einklang mit der aktuellen Datenlage. Die Zunahme der Größe der Adipozyten im WAT konnte durch die Zunahme der Lipidspeicherung, welche durch die hochkalorische Diät erzeugt wurde, erklärt werden.

Im Vergleich erschienen die Veränderungen im BAT und WAT im Hinblick auf die Lipidspeicherung in beiden Depots ähnlich.

4.2.2 Erhöhte Inflammation im braunen und weißen Fettgewebe durch die diabetogene Diät

Das Inflammationsgeschehen im Fettgewebe selbst wurde ebenfalls durch die hochkalorische Diät verändert.

In den MAC2-Färbungen wurden im BAT signifikant vermehrt CLS detektiert. In der qPCR wurden im BAT *Ii1b*, *Mcp1* und *Tnfa* untersucht, wobei sich die Expression bei DD-Fütterung von *Mcp1* signifikant erhöht zeigte.

Die Zunahme an CLS im BAT wurde bereits von mehreren wissenschaftlichen Gruppen in einem vergleichbaren Kontext nachgewiesen [35]. In einer Arbeit wurden beispielsweise vermehrte CLS im Rahmen der Transformation des BAT beim *Whitening* in einem Modell von Atgl-defizienten Mäusen dargestellt [64].

Die Rolle von *Mcp1* wurde in dem Kontext der hochkalorischen Ernährung und dem BAT noch nicht untersucht. Dass die *Mcp1* Expression in den vorliegenden Ergebnissen im BAT allein durch die Diät um das 10-fache der Kontrolle erhöht war, blieb im Kontext der geschilderten Untersuchungen [35, 64] nachvollziehbar und lag damit im Einklang.

Die *Ucp1* Expression unterschied sich im BAT je nach Diät nicht. Das Ausmaß und die Konsequenz der Inflammation im BAT stimmten mit den bisherigen wissenschaftlichen Kenntnissen also nicht komplett überein. Im bereits in 4.3.1 erwähnten Experiment, wo eine hochkalorische Fütterung mit Kontrollgruppe von C57BL/6J Mäusen erfolgte, zeigten sich im Zusammenhang mit der zunehmenden Infiltration durch Makrophagen eine Abnahme der UCP1-Expression, bei der hochkalorischen Diät [61]. In den vorliegenden Ergebnissen unterschied sich die *UCP1* Expression nicht je nach Diät und somit möglicherweise auch nicht die Funktionsfähigkeit des BAT im Hinblick auf Thermogenese. Eventuell könnte eine zeitliche Verzögerung in Betracht gezogen werden, sodass zu späteren Zeitpunkten Veränderungen hinsichtlich der Thermogenese evident werden würden.

Im WAT wurden in den MAC2-Färbungen ebenso signifikant vermehrt CLS detektiert. Mittels qPCR wurden im WAT *Tnfa* und *Mcp1* untersucht, wobei sich entsprechend der Diät keine signifikanten Unterschiede in der Expression zeigten.

Die Zunahme an CLS im WAT wurde bereits von mehreren wissenschaftlichen Gruppen in einem vergleichbaren Kontext nachgewiesen [35].

Beispielsweise wurden in Untersuchungen in einem *Hsl*-defizientem Mausmodell eine Zunahme der CLS Anzahl und zusätzlich der Genexpression von *Tnfa* im WAT detektiert [65]. In einem weiteren Experiment untergingen Mäuse, welche eine genetischinduzierte fettgewebsspezifische Insulinresistenz besaßen, eine 10-wöchige hochkalorische Diät [66]. Dabei zeigte sich bereits nach sechs Wochen eine Zunahme der proinflammatorischen Makrophage im WAT [66]. Zudem korrelierte die Zunahme der Insulinresistenz mit der Produktion von *Mcp1* [66]. Aus diesem Grund schienen die Aktivität von *Tnfa* und *Mcp1* mit Adipositas zu korrelieren. Sowohl für *Tnfa* als auch *Mcp1* zeigten sich im WAT Unterschiede und eine Zunahme durch die Diät in der vorliegenden Arbeit, jedoch erreichten diese nicht die Signifikanz. Möglicherweise könnte ein signifikanter Unterschied durch Hinzunahme von weiteren Proben erreicht werden.

Die Entzündung ist die physiologische Antwort, welche für die Zellexpansion des Gewebes sorgt [35, 65]. Diese könnte bei der Adipositas deshalb zum einen als Ursache für die Dysfunktion des Fetts gelten. Zum anderen könnte sie aber auch als Folge angesehen werden. Die metabolischen Stressoren dieser Erkrankung führen nämlich zum Zelluntergang und das nekrotische Gewebe wird dabei durch Makrophagen umgeben und abgebaut [35, 65]. Die Makrophagen können aus diesem Grund anhand von CLS in der histologischen Bildgebung detektiert werden [35, 65]. Zusammenfassend schienen durch die hochkalorische Diät sowohl BAT als auch WAT ähnliche Veränderungen im Hinblick auf die Inflammation durchzugehen.

4.3 Unterschiedliche Veränderungen der Fettgewebsdepots nach Ischämie/Reperfusion in Abhängigkeit von der Diät

4.3.1 Fortbestehen der Lipidakkumulation im braunen und weißen Fettgewebe bei diabetogener Diät nach Ischämie/Reperfusion sowie Lipidumsatz im braunen Fettgewebe 3 Tage nach Ischämie/Reperfusion

Im BAT sprachen die histologischen Ergebnisse auch nach I/R für eine vermehrte Lipidspeicherung und einen erhöhten Stoffwechsel durch die Diät. Ein wichtiger Anhaltspunkt war die Zunahme der Größe der Fettvakuolen in dem Gewebe. Zusätzlich unterschieden sich die DD-Gruppen nach 3 und nach 21 Tage diesbezüglich signifikant. Bei den Kontrollen gingen die Ergebnisse auch in diese Richtung, waren aber nicht gleichermaßen ausgeprägt. Bei der Kohorte mit hochkalorischer Diät waren 3 Tage nach einer I/R also weniger Lipide im BAT gespeichert als nach 21 Tage. Dazu wurden in den RNA-Analysen die Enzyme der Lipolyse im Durchschnitt 3 Tage nach I/R mehr detektiert als nach 21 Tage. Dies deutete darauf hin, dass Lipide akut nach I/R im BAT umgesetzt wurden. Im Verlauf war dieses Phänomen dann nicht mehr zu beobachten.

Was bedeutete dies für die Rolle des BAT im Rahmen der I/R und des MI?

Bereits erwähnt wurde, dass der Sympathikus, welcher beim MI aktiviert wurde, das Potential barg, das Fettgewebe zu stimulieren. Das WAT reagierte auf den Reiz mit Lipolyse. Das BAT reagierte mit Thermogenese [47]. Ob dies im BAT bei der I/R in den jetzigen Experimenten geschah, blieb jedoch ungewiss.

Einerseits könnte diese These dadurch unterstützt werden, dass akut nach I/R vermindert Lipide gespeichert wurden. Wenn auch nicht signifikant, wurde zusätzlich *Ucp1* bei den Kontrollen akut nach I/R vermehrt detektiert. Es wäre also vorstellbar, dass bei Gesunden im gegebenen Kontext Thermogenese stattfand. Inwiefern dies sich auf das Herz und die Genesung nach MI auswirken könnte, blieb jedoch schwer zu sagen. Bezüglich der Oxidation freier Fettsäuren in diesem Kontext wurden sowohl protektive als auch lipotoxische Effekte in Erwägung gezogen [69].

In der Realität ging der MI meistens mit Risikofaktoren und dem metabolischen Syndrom einher. Deshalb sollte eher angenommen werden, dass durch das *Whitening* des BAT auch bezüglich der Lipolyse, Eigenschaften des WAT

angeeignet wurden. Mit den vorliegenden Daten schien dies bei Prädiabetes umso ausgeprägter zu sein. Es könnte also vermehrte Lipolyse bei I/R im BAT stattfinden.

Zu dem WAT ließ sich festhalten, dass durch die Diät und trotz I/R weiterhin vermehrte Lipidspeicherung in dem epididymalen Depot stattfand. Hierzu muss ergänzt werden, dass die untersuchten Gewebe ausschließlich das viszerale Fettgewebe repräsentierten. Prinzipiell ließ sich das WAT zusätzlich unterteilen und je nach Lokalisation ließ sich eine differenzierte Funktion zuordnen. In einem Experiment wurde dies bei zwölf Wochen alten C57BL/6J Mäusen nach kardialer I/R untersucht [70]. Die I/R rief im epididymalen WAT Depot keine signifikanten Veränderungen im Hinblick auf Adipozytengröße oder Lipolyse hervor [70]. Im subkutanen WAT Depot waren hingegen eine Abnahme der Adipozytengröße markant, sowie eine Zunahme der Expression von *Ucp1* [70]. Es wurde in diesem Experiment keine hochkalorische Diät verwendet, wodurch sich die Ergebnisse vor allem auf die Kontrollgruppe vergleichen ließen. Dass die kardiale I/R also die Fettspeicherung und den Fettstoffwechsel im epididymalen WAT nicht beeinflussten war im Vergleich zu den vorliegenden wissenschaftlichen Daten übereinstimmend. Bezüglich der Veränderungen entsprechend der Diät konnte die vorausgegangene Annahme welche im Abschnitt 4.3.1, bei Adipositas nehme die Fettspeicherung im viszeralen Fett zu, auch mit den vorliegenden Daten für die I/R beim Mausmodell bestätigt werden.

Zusammenfassend gab es im WAT nicht die beobachteten Veränderungen wie im BAT, bezüglich einer Dynamik in der Lipidverteilung 3 Tage nach I/R.

Da die Fettspeicherfunktion und die Ausgangsgröße der Adipozyten im WAT ausgeprägter als im BAT waren, könnte man annehmen, dass die Unterschiede nicht gleichermaßen hervorstachen. Vielleicht war die Lipolyse im WAT 3 Tage nach I/R aber auch schon abgeschlossen und die Lipidspeicherung wurde wieder in Gang gesetzt. Im BAT lief dieser Prozess verzögert und es wäre noch nicht der Fall.

Aus den vorliegenden Ergebnissen ließen sich unterschiedliche Wirkungen der kardialen I/R auf das BAT und das WAT feststellen. Um eine finale Aussage über die Rolle und die Wirkungsweise des BAT in diesem Kontext treffen zu können, müssten jedoch noch grundlegende Bausteine erforscht werden.

4.3.2 Aufgehobene Differenz der Inflammation im braunen Fettgewebe bei diabetogener Diät nach Ischämie/Reperfusion, Fortbestehen im weißen Fettgewebe

Im basalen Zustand waren im BAT bei DD signifikant mehr CLS zu beobachten. Es wurde nach I/R jedoch festgestellt, dass das Entzündungssignal im BAT nicht mehr offensichtlich und signifikant durch die Diät beeinflusst wurde. Ergo unterschied sich die Inflammation des BAT bei einer I/R nicht mehr signifikant zwischen gesunden Mäusen und Mäusen mit Prädiabetes und Übergewicht. Dies galt sowohl auf kurzer als auch auf langer Sicht nach dem Infarkt.

Es kann vermutet werden, dass eine Überlagerung der Signale durch die starke Inflammation, welche beim MI vorkam [46], stattfand. Diese beinhaltete verstärkte systemische inflammatorische Signale, welche einen Zusammenhang zwischen dem zentralen Nervensystem, Knochenmark, weiteren Organen wie Milz oder den atherosklerotischen Plaques und dem Areal des MI herstellten (Abb. 3) [46]. Somit wäre der Unterschied nicht mehr in dem Ausmaß bemerkbar, wobei sich eine Tendenz dennoch aus den vorliegenden Daten entnehmen ließ. Die Differenz ließe sich ansonsten dadurch erklären, dass entweder bei KDD eine Zunahme der Makrophagen oder bei DD eine Abnahme der Makrophagen bei einer I/R stattfände. In Anlehnung an der Abb. 3 und der systemischen Inflammation beim MI könnte eine Mobilisation und Wirkung von Makrophagen in oder aus dem Fettgewebe stattfinden [46].

In jedem Fall würde dies dafürsprechen, dass auch das BAT an die systemische inflammatorische Reaktion nach dem MI beteiligt wäre. Welchen Ursprung und welche Rolle diese Makrophagen hätten, könnte in weiteren Experimenten durch Differenzierung der Zellen gezeigt werden. Sowohl günstige als auch negative metabolische Auswirkungen wären in dieser Hinsicht vorstellbar. Durch manche Makrophagen Subpopulationen könnte beispielsweise die sympathische Innervierung und der energetische Metabolismus des BAT verbessert werden, wie in einem Experiment im Mausmodell mit Mutationen im Makrophagen-regulierendem Gen *Mecp2* gezeigt wurde [71]. Die Inflammation im BAT bei Adipositas führte hingegen bekannterweise zur langfristigen Einschränkung der thermogenetischen Funktion und zur Verschlechterung des metabolischen Syndroms [35]. Im Hinblick darauf dürfte der Unterschied zwischen gesunden und kranken Tieren hinsichtlich der Inflammation des BAT beim MI also nicht komplett

vernachlässigt werden. Wenn das Gewebe schon vorbeschädigt wäre, wie beim metabolischen Syndrom, könnte man sich vorstellen, dass dessen Funktion durch den MI nochmals verschlechtert werden würde.

Auch wäre beim metabolischen Syndrom die Auswanderung der Makrophagen aus dem BAT in das infarzierte Gebiet vorstellbar.

Jedoch konnten diese Aussagen allein durch die vorliegenden Daten nicht bewiesen werden. Es blieb festzuhalten, dass nach I/R der Kontrast, der durch die Diät bezüglich der Inflammation im BAT erzeugt wurde, wieder nivelliert wurde.

Zum Vergleich hatte eine wissenschaftliche Gruppe in einem ähnlichen Kontext mit C57BL/6J Mäusen, hochkalorischer Fütterung und chirurgischer Induktion eines MI eine BAT-Transplantation prä-MI durchgeführt [45]. Dabei stellte sich heraus, dass durch die BAT-Transplantation einer linksventrikulären Größenzunahme und einer post-MI gestörten Glukosetoleranz entgegengewirkt werden konnte [45]. Dazu war die Genexpression inflammatorischer Marker wie beispielsweise *Tnfa* im BAT aber auch im WAT nach dem MI vermindert exprimiert, aufgrund der BAT-Transplantation. Aus diesem Grund konnten die vorliegenden Ergebnisse, mit denen der Studie im Einklang stehen.

Die inflammatorischen Signale im WAT bei DD-Fütterung waren hinsichtlich der CLS-Anzahl nach I/R signifikant höher als bei den Kontrollen.

In den qPCR Untersuchungen zeigte sich lediglich bei *Mcp1* eine signifikant erhöhte Detektion der Genexpression 21 Tage nach I/R. Eine Tendenz zeigte sich 3 und 21 Tage nach I/R für die restlichen Gruppen mit *Tnfa* und *Mcp1*, wobei jedoch keine Signifikanz vorzufinden war. Dies könnte in der geringen Probenanzahl begründet sein.

Hinsichtlich des Einflusses der kardialen I/R auf das WAT wurden in einem Experiment vergleichbare Ergebnisse für die Kontrollgruppe gezeigt. C57BL/6J Mäuse untergingen eine I/R und ihre Kontrollgruppe entsprechend eine *Sham-Operation* [70]. Nach sieben Tagen wurden MAC2 Immunfärbungen durchgeführt. Im epididymalen, viszeralen WAT war es dort zu keinem Anstieg an MAC2 und somit an Makrophagen Signal gekommen [70]. Zu beachten blieb, dass in diesem Experiment keine diätinduzierte Adipositas verwendet wurde. Aus diesem Befund lässt sich schlussfolgern, dass die diätinduzierte Adipositas die Voraussetzung für die inflammatorischen Signale im WAT nach I/R darstellt. Die Konsequenz und

Bedeutung der Inflammation im WAT nach I/R könnte sich also je nach Diät bzw. je nach dem, ob Vorerkrankungen bestehen, wie Prädiabetes und DM2 unterscheiden. Aus den vorliegenden Daten wäre vorstellbar, dass der systemische Einfluss der Inflammation bei dem MI (Vergleich Abb. 3) aus dem WAT gering wäre. Die Auswirkungen der kardialen I/R auf BAT und WAT waren also unterschiedlich. Die I/R bewirkte ein verstärktes inflammatorisches Signal im BAT bei der Kontrollgruppe und ein noch ausgeprägteres Signal bei der DD Gruppe. Im WAT war die Inflammation nur bei der DD Gruppe erhöht.

4.4 Fazit und Ausblick

Ziel der durchgeführten Experimente war es, metabolische und inflammatorische Veränderungen im BAT und WAT vor und nach einer kardialen I/R unter dem Einfluss eines Prädiabetes vergleichend zu charakterisieren.

Durch die hochkalorische diabetogene Diät kam es zu morphologischen Veränderungen im BAT. Histomorphologisch zeigte sich eine signifikant erhöhte Lipidspeicherung und Anzahl an inflammatorischen Signalen. Die Genexpression der Lipidmetabolismus- und Inflammationsmarker zeigte sich hingegen nicht signifikant erhöht.

In Folge der kardialen I/R wurden die initial beschriebenen histomorphologischen Differenzen zwischen KDD und DD nach 3 Tage aufgehoben. 21 Tage nach der I/R zeigte sich jedoch wieder wie eingangs eine Zunahme der Lipidspeicherung aufgrund der DD. Die histomorphologisch gezeigte Inflammation verblieb hingegen 21 Tage nach I/R im BAT für KDD und DD weiterhin ähnlich.

Auch im WAT zeigten sich allein durch die Diät histomorphologisch eine Zunahme der Lipidspeicherung und der Inflammation.

Im Vergleich zum BAT blieben die Unterschiede bezüglich der Adipozytengröße und somit Lipidspeicherung jedoch auch nach der kardialen I/R beständig. Allein die Inflammation, nachgewiesen über die Ausbildung von CLS, war zwischen den Fütterungsgruppen 3 Tage nach I/R aufgehoben. Nach 21 Tage etablierte sich jedoch wieder dieser Unterschied im WAT und es zeigte sich eine stärkere WAT-Inflammation in der DD-Gruppe, welches auch auf Genexpressionsebene für *Mcp1* nach 21 Tage detektierbar war.

Die vorliegenden Ergebnisse ermöglichten eine Einsicht über Veränderungen des WAT und BAT, welche den Einflüssen einer hochkalorischen Diät und einer I/R

unterlagen. Die zwei Fettgewebe reagierten im Hinblick auf die hochkalorische Diät ähnlich, jedoch unterschiedlich auf eine kardiale I/R. Während im BAT die Lipidspeicherung akut und auch längerfristig nach I/R verändert war, ließ sich im WAT nur akut nach I/R ein leichter Unterschied darstellen. Hinsichtlich der Inflammation war im BAT bei beiden Diäten ebenfalls ein ausgeprägteres Signal nach I/R zu detektieren und dabei unterschieden sich KDD und DD nicht mehr signifikant. Im WAT bestand hingegen kein wesentlicher Unterschied als Reaktion auf die I/R. Dies könnte möglicherweise auf unterschiedliche Rollen im Kontext der kardialen I/R hindeuten.

Perspektivisch wäre für die klinische Anwendung bei dem metabolischen Syndrom und dem Ereignis eines MI das Verständnis dieser Fettgewebe relevant.

Die Evidenz dafür, dass die Effekte des BAT positive Auswirkungen auf den Stoffwechsel und das Herz nach dem MI besaßen, wurde schon bei anderen Forschungsgruppen im Mausmodell deutlich [45].

Es erschloss sich nun aus den Ergebnissen dieser Arbeit, dass sich einerseits eine Dynamik in der Lipidverteilung akut nach I/R ereignete. Welche Funktion dieser Umsatz hatte, steht noch zur Untersuchung aus. Am wahrscheinlichsten erscheint die Notwendigkeit der Lipolyse für Prozesse der Thermogenese.

Andererseits erscheint es auch möglich, dass das BAT an der systemischen Entzündungsreaktion akut und langfristig nach I/R beteiligt ist. Die Ergebnisse ermöglichten aber keine Aussage darüber, ob dies durch äußere Einwanderung von Makrophagen oder intrinsische Wirkungen residenter Immunzellen geschieht. Eine Differenzierung etwaiger Makrophagen-Subgruppen, beispielsweise mit Hilfe der Durchflusszytometrie, würde dabei eine weitere Charakterisierung der Zellen ermöglichen.

Das WAT scheint weitaus weniger von Veränderungen durch eine I/R betroffen, wodurch dessen systemische Bedeutung nach I/R entsprechend geringer erscheinen mag. Die Veränderungen, welche durch die hochkalorische Diät hervorgerufen wurden, blieben hier weiter bestehen.

Nicht Gegenstand dieser Arbeit waren die Metabolite des BAT und beige Fettgewebes, auch Batokine oder Metabokine genannt, welche bekannte positive Stoffwechseleigenschaften besaßen [72]. In der Zukunft wäre es daher interessant, auch deren Funktion und Wirkung im Zusammenhang mit dem DM2 und MI zu betrachten. Dazu wäre das beige Fettgewebe ebenso ein weiterer interessanter und

relevanter Forschungsgegenstand, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass das Gewebe aus dem WAT entstand [26].

In den nächsten Schritten wäre es ebenso interessant im Mausmodell die Effekte von Medikamenten, welche das BAT oder das beige Fett aktivieren, zu beobachten, beispielsweise mit Mirabegron, welches anfangs erwähnt wurde. Es bliebe zu untersuchen, wie sich auch hier die Effekte in der Konstellation mit dem metabolischen Syndrom und einem MI verhalten. Zusätzlich wären aber auch die Effekte von frühzeitigen medikamentösen Interventionen aufschlussreich, um der Entwicklung von metabolischen und kardiovaskulären Komplikationen vorbeugen zu können.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 469-80.
2. Saklayen, M.G., *The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2018. **20**(2): p. 12.
3. Samson, S.L. and A.J. Garber, *Metabolic syndrome*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014. **43**(1): p. 1-23.
4. Camilleri, M. and A. Acosta, *Combination Therapies for Obesity*. Metab Syndr Relat Disord, 2018. **16**(8): p. 390-394.
5. Dalle Grave, R., et al., *Personalized group cognitive behavioural therapy for obesity: a longitudinal study in a real-world clinical setting*. Eat Weight Disord, 2020. **25**(2): p. 337-346.
6. Collaborators, G.B.D.O., et al., *Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years*. N Engl J Med, 2017. **377**(1): p. 13-27.
7. Pi-Sunyer, F.X., *The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity*. Obes Res, 2002. **10 Suppl 2**: p. 97S-104S.
8. Goossens, G.H., *The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function*. Obes Facts, 2017. **10**(3): p. 207-215.
9. Nuffer, W.A. and J.M. Trujillo, *Liraglutide: A New Option for the Treatment of Obesity*. Pharmacotherapy, 2015. **35**(10): p. 926-34.
10. Singh, G., M. Krauthamer, and M. Bjälme-Evans, *Wegovy (semaglutide): a new weight loss drug for chronic weight management*. J Investig Med, 2022. **70**(1): p. 5-13.
11. Park, J.S., et al., *Clinical effectiveness of liraglutide on weight loss in South Koreans: First real-world retrospective data on Saxenda in Asia*. Medicine (Baltimore), 2021. **100**(2): p. e23780.
12. Whitten, J.S., *Liraglutide (Saxenda) for Weight Loss*. Am Fam Physician, 2016. **94**(2): p. 161-6.
13. Kopin, L. and C. Lowenstein, *Dyslipidemia*. Ann Intern Med, 2017. **167**(11): p. ITC81-ITC96.
14. Marquez, A.B., S. Nazir, and E.P.C. van der Vorst, *High-Density Lipoprotein Modifications: A Pathological Consequence or Cause of Disease Progression?* Biomedicines, 2020. **8**(12).
15. Wu, L. and K.G. Parhofer, *Diabetic dyslipidemia*. Metabolism, 2014. **63**(12): p. 1469-79.
16. Sun, H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract, 2022. **183**: p. 109119.
17. Padhi, S., A.K. Nayak, and A. Behera, *Type II diabetes mellitus: a review on recent drug based therapeutics*. Biomed Pharmacother, 2020. **131**: p. 110708.
18. Petersmann, A., et al., *Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2019. **127**(S 01): p. S1-S7.
19. Zheng, Y., S.H. Ley, and F.B. Hu, *Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications*. Nat Rev Endocrinol, 2018. **14**(2): p. 88-98.
20. Zannad, F., et al., *Cardiac and Kidney Benefits of Empagliflozin in Heart Failure Across the Spectrum of Kidney Function: Insights From EMPEROR-Reduced*. Circulation, 2021. **143**(4): p. 310-321.
21. Wermelt, J.A. and H. Schunkert, *[Management of arterial hypertension]*. Herz, 2017. **42**(5): p. 515-526.
22. Williams, B., et al., *2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of*

- Cardiology and the European Society of Hypertension*. J Hypertens, 2018. **36**(10): p. 1953-2041.
23. Kearney, P.M., et al., *Global burden of hypertension: analysis of worldwide data*. Lancet, 2005. **365**(9455): p. 217-23.
 24. Harrison, D.G., T.M. Coffman, and C.S. Wilcox, *Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and Beyond*. Circ Res, 2021. **128**(7): p. 847-863.
 25. Narkiewicz, K., *Diagnosis and management of hypertension in obesity*. Obes Rev, 2006. **7**(2): p. 155-62.
 26. Park, A., W.K. Kim, and K.H. Bae, *Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells*. World J Stem Cells, 2014. **6**(1): p. 33-42.
 27. Pachon-Pena, G. and M.A. Bredella, *Bone marrow adipose tissue in metabolic health*. Trends Endocrinol Metab, 2022. **33**(6): p. 401-408.
 28. Zwick, R.K., et al., *Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue*. Cell Metab, 2018. **27**(1): p. 68-83.
 29. Kajimura, S. and M. Saito, *A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis*. Annu Rev Physiol, 2014. **76**: p. 225-49.
 30. Rosen, E.D. and B.M. Spiegelman, *What we talk about when we talk about fat*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 20-44.
 31. Yang, F.T. and K.I. Stanford, *Batokines: Mediators of Inter-Tissue Communication (a Mini-Review)*. Curr Obes Rep, 2022. **11**(1): p. 1-9.
 32. Engin, A., *The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 221-245.
 33. Girousse, A. and D. Langin, *Adipocyte lipases and lipid droplet-associated proteins: insight from transgenic mouse models*. Int J Obes (Lond), 2012. **36**(4): p. 581-94.
 34. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1821-30.
 35. Villarroya, F., et al., *Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease*. J Intern Med, 2018. **284**(5): p. 492-504.
 36. Soundarajan, M., et al., *Activated brown adipose tissue and its relationship to adiposity and metabolic markers: an exploratory study*. Adipocyte, 2020. **9**(1): p. 87-95.
 37. Wang, Q., et al., *Brown adipose tissue activation is inversely related to central obesity and metabolic parameters in adult human*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123795.
 38. Bel, J.S., et al., *Mirabegron: The most promising adipose tissue beiging agent*. Physiol Rep, 2021. **9**(5): p. e14779.
 39. Lu, L., et al., *Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments*. Cell Biochem Biophys, 2015. **72**(3): p. 865-7.
 40. Bhatt, D.L., R.D. Lopes, and R.A. Harrington, *Diagnosis and Treatment of Acute Coronary Syndromes: A Review*. JAMA, 2022. **327**(7): p. 662-675.
 41. Jenca, D., et al., *Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors*. ESC Heart Fail, 2021. **8**(1): p. 222-237.
 42. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
 43. Karwi, Q.G., et al., *Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart*. Front Cardiovasc Med, 2018. **5**: p. 68.
 44. Chang, H.X., et al., *Removal of epicardial adipose tissue after myocardial infarction improves cardiac function*. Herz, 2018. **43**(3): p. 258-264.
 45. Peres Valgas da Silva, C., et al., *Brown adipose tissue prevents glucose intolerance and cardiac remodeling in high-fat-fed mice after a mild myocardial infarction*. Int J Obes (Lond), 2022. **46**(2): p. 350-358.
 46. Libby, P., M. Nahrendorf, and F.K. Swirski, *Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum"*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(9): p. 1091-1103.

47. Heeren, J. and L. Scheja, *Brown adipose tissue and lipid metabolism*. *Curr Opin Lipidol*, 2018. **29**(3): p. 180-185.
48. Saleh, M. and J.A. Ambrose, *Understanding myocardial infarction*. *F1000Res*, 2018. **7**.
49. Wang, X., et al., *Inflammation, Autophagy, and Apoptosis After Myocardial Infarction*. *J Am Heart Assoc*, 2018. **7**(9).
50. Andersson, C., et al., *Framingham Heart Study: JACC Focus Seminar, 1/8*. *J Am Coll Cardiol*, 2021. **77**(21): p. 2680-2692.
51. Huang, D., et al., *Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 7839101.
52. Jacoby, R.M. and R.W. Nesto, *Acute myocardial infarction in the diabetic patient: pathophysiology, clinical course and prognosis*. *J Am Coll Cardiol*, 1992. **20**(3): p. 736-44.
53. Kleinert, M., et al., *Animal models of obesity and diabetes mellitus*. *Nat Rev Endocrinol*, 2018. **14**(3): p. 140-162.
54. Petz, A., et al., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. *Circ Res*, 2019. **124**(10): p. 1433-1447.
55. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
56. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
57. Heydemann, A., *An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus*. *J Diabetes Res*, 2016. **2016**: p. 2902351.
58. Kunath, A., et al., *Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) is Related to Obesity in Mice*. *Horm Metab Res*, 2020. **52**(12): p. 877-881.
59. Mosser, R.E., et al., *High-fat diet-induced beta-cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015. **308**(7): p. E573-82.
60. Crandall, J.P., et al., *Measurement of Brown Adipose Tissue Activity Using Microwave Radiometry and (18)F-FDG PET/CT*. *J Nucl Med*, 2018. **59**(8): p. 1243-1248.
61. Sakamoto, T., et al., *Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016. **310**(8): p. E676-E687.
62. Li, J., et al., *High fat diet induced obesity model using four strains of mice: Kunming, C57BL/6, BALB/c and ICR*. *Exp Anim*, 2020. **69**(3): p. 326-335.
63. Pini, M., et al., *Adipose tissue senescence is mediated by increased ATP content after a short-term high-fat diet exposure*. *Aging Cell*, 2021. **20**(8): p. e13421.
64. Kotzbeck, P., et al., *Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation*. *J Lipid Res*, 2018. **59**(5): p. 784-794.
65. Cinti, S., et al., *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
66. Shimobayashi, M., et al., *Insulin resistance causes inflammation in adipose tissue*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(4): p. 1538-1550.
67. Shimizu, I. and K. Walsh, *The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity*. *Curr Obes Rep*, 2015. **4**(2): p. 224-9.
68. Jo, J., et al., *Hypertrophy-driven adipocyte death overwhelms recruitment under prolonged weight gain*. *Biophys J*, 2010. **99**(11): p. 3535-44.
69. Nguyen, T.D. and P.C. Schulze, *Lipid in the midst of metabolic remodeling - Therapeutic implications for the failing heart*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020. **159**: p. 120-132.
70. Wang, L., et al., *Cardiac ischemia modulates white adipose tissue in a depot-specific manner*. *Front Physiol*, 2022. **13**: p. 1036945.

71. Wolf, Y., et al., *Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure*. Nat Immunol, 2017. **18**(6): p. 665-674.
72. Whitehead, A., et al., *Brown and beige adipose tissue regulate systemic metabolism through a metabolite interorgan signaling axis*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1905.

6 Anhang

6.1 Makros

6.1.1 Makro zur Auswertung der Hämatoxilin & Eosin Färbung des braunen Fettgewebes

```
setBackgroundColor(0,0,0);
original = getTitle();
oa=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"0";
ob=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"1";
oc=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"2";
//om="Original Metadata - "+substring(original,0,lengthOf(original)-6);
//selectWindow(oa);
//close;
selectWindow(oc);
close;
//selectWindow(om);
//close;
selectWindow(ob);
original=ob
run("Select None");
run("8-bit");
run("Pseudo flat field correction", "blurring=100");
close(original + "_background");
selectWindow(original);
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize");
run("Median...", "radius=2");
run("Subtract Background...", "rolling=10 light");
setOption("BlackBackground");
run("Auto Threshold", "method=Triangle white");
run("Fill Holes");
run("Watershed Irregular Features", "erosion=25");
waitForUser("eliminate unwanted particles\nand press Ok");
run("Select None");
roiManager("reset");
run("Analyze Particles...", "size=0.5-Infinity show=Masks display exclude clear summarize add");
firstAnalysis = getTitle();
close(original);
selectWindow("Summary");
```

```

run("Close");
selectWindow(firstAnalysis);
run("Invert LUT");
waitForUser("improve...\nand press Ok");
run("Select None");
roiManager("reset");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity show=Masks display exclude clear summarize add");
finalAnalysis = getTitle();
run("Invert LUT");
close(firstAnalysis);

```

6.1.2 Makro zur Auswertung der Hämatoxylin & Eosin Färbung des weißen Fettgewebes

```

setBackground(0,0,0);
original = getTitle();
oa=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"0";
ob=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"1";
oc=substring(original,0,lengthOf(original)-1)+"2";
//om="Original Metadata - "+substring(original,0,lengthOf(original)-6);
//selectWindow(oa);
//close;
selectWindow(oc);
close;
//selectWindow(om);
//close;
selectWindow(ob);
original=ob
run("Select None");
run("8-bit");
run("Pseudo flat field correction", "blurring=50");
close(original + "_background");
selectWindow(original);
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize");
run("Median...", "radius=2");
run("Subtract Background...", "rolling=40 light");
setOption("BlackBackground");
run("Auto Threshold", "method=Triangle white");
run("Fill Holes");

```

```
run("Watershed Irregular Features", "erosion=2");
waitForUser("eliminate unwanted particles\nand press Ok");
run("Select None");
roiManager("reset");
run("Analyze Particles...", "size=200-Infinity show=Masks display exclude clear summarize add");
firstAnalysis = getTitle();
close(original);
selectWindow("Summary");
run("Close");
selectWindow(firstAnalysis);
run("Invert LUT");
waitForUser("improve...\nand press Ok");
run("Select None");
roiManager("reset");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity show=Masks display exclude clear summarize add");
finalAnalysis = getTitle();
run("Invert LUT");
close(firstAnalysis);
```

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Maria Grandoch für die Promotionsgelegenheit in ihrem Institut sowie ihrer engagierten Betreuung während meiner Arbeit. Für die Ermöglichung der Teilnahme an dem Graduierten Kolleg SFB 1116 bin ich besonders dankbar.

Herrn Prof. Filler danke ich für die freundliche Übernahme der Co-Betreuung.

Dem Doktoranden- und Laborteam möchte ich für die Unterstützung und Zusammenarbeit während der Durchführung meiner Experimente danken, insbesondere Herrn Dr. Arne Beran für das Korrekturlesen und die hilfreichen Anregungen.

An meine Familie und meine Freunde, welche mich während der Promotion motiviert und begleitet haben, richte ich ein besonderes *merci!*