

Diplomarbeit

**Vorkommen und Verteilungsunterschiede von braunem
Fettgewebe bei Erwachsenen, in Bezug auf
kardiovaskuläre und metabolische Erkrankungen sowie
bei Krebserkrankungen**

Eine retrospektive Autopsiestudie

eingereicht von

Petra Lurf

Geb. Dat.: 03.11.1985

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie, MedUni Graz

unter der Anleitung von Betreuerin

Dr. med. univ. Ariane Aigelsreiter

Graz, am

Unterschrift:

(Petra Lurf)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift:.....
(Petra Lurf)

Gender-Erklärung

Um die Lesbarkeit dieser Arbeit zu vereinfachen, wurde bevorzugt das genus commune verwendet.

Auf diese Weise soll ausdrücklich festgehalten werden, dass sich die männliche grammatikalische Form auf beide Geschlechter bezieht.

Graz, am

Petra Lurf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank denjenigen Menschen zukommen lassen, die mich in der Phase des Diplomarbeitschreibens tatkräftig förderten und auch all denen die mich mein ganzes Studium hindurch begleiteten und unterstützten.

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Diplomarbeitsbetreuerin Dr. med. univ. Ariane Aigelsreiter bedanken, die mein Interesse an der Pathologie und Pathophysiologie förderte und somit auch die Ausarbeitung dieses Themas ermöglichte, Hrn. Prof. Dr. med. univ. Gerhard Höfler (Leiter des Institutes für Pathologie) für seine Unterstützung, weiters geht mein Dank an das ganze Sezierraum-Team, das mir mit Rat und Tat beistand, an das Team der Biobank, welches mir nicht nur die Probenlagerung ermöglichte, sondern auch fachlich zur Seite stand und Fr. Silvia Schauer, für ihre Mühen und ihre große Hilfe bei der immunhistologischen Auswertung.

Meinen Eltern Peter und Gabriele für ihre große Geduld (nicht nur zu Studienzeiten), ihren Beistand und auch für ihre finanzielle Unterstützung, meinen beiden Schwestern Laura und Nina, die es immer schafften mich willentlich abzulenken und gleichzeitig zu motivieren und meinen Großeltern, die immer an mich glaubten, möchte ich auf diesem Weg meinen Dank zukommen lassen.

Last but not least all meinen Freunden, Tina, Stella, Michi, Jasi und Viki möchte ich auf diesem Weg für den Rückhalt, die Motivation und ihr Verständnis danken, um diese anstrengende aber sehr lehrreiche Zeit des Diplomarbeitsschreibens zu überstehen und die mich auch meine ganze Studienzzeit über begleiteten und unterstützten.

Martina, die mir mit ihrem Können bei der statistischen Auswertung unablässig und zeitaufwendig beistand, Alex, der die schwere Aufgabe der Diplomarbeitskorrektur übernahm und den ich dabei fast an den Rand der Verzweiflung trieb.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	2
Gender-Erklärung.....	3
Danksagung.....	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	12
Zusammenfassung.....	13
Abstract.....	15
1. Allgemeiner Teil	17
1.1. Einleitung	17
1.2. Fettgewebe	18
1.2.1. Entwicklung des Fettgewebes allgemein	18
1.3. WAT.....	19
1.3.1. Vorkommen und Verteilung von WAT.....	19
1.3.2. Physiologische und biochemische Prozesse des WAT	20
1.3.3. WAT als endokrines Organ	20
1.3.3.1. Adipokine	21
1.3.4. Morphologisches Erscheinungsbild des WAT	21
1.4. BAT	23
1.4.1. BAT allgemein.....	23
1.4.2. Differenzierung von BAT	23
1.4.3. Vorkommen und Verteilung des BAT.....	25
1.4.4. Anatomische Regionen von BAT beim Erwachsenen	26
1.4.4.1. Zervikal-supraclavikulär-Region	26
1.4.4.2. Plexus brachialis-Region	26
1.4.4.3. Paraspinal durch Brust und Bauchhöhle	27
1.4.5. Mikroskopisches Aussehen von BAT	27
1.4.6. Physiologische und biochemische Prozesse von BAT/UCP1	29
1.5. UCP1	30
1.5.1. UCP2 und UCP3	32
1.5.2. Einflussfaktoren auf BAT/UCP1-Expression	32

1.5.2.1. Kälte	32
1.5.2.2. Noradrenalin.....	33
1.5.2.3. Geschlecht/Alter	34
1.5.2.4. Ernährungszustand	34
1.6. Erkrankungengruppen innerhalb der Studie	35
1.6.1. Metabolische Erkrankungen	35
1.6.1.1. Definition des metabolischen Syndroms.....	36
1.6.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen	37
1.6.2.1. Definition der kardiovaskulären Erkrankungen	37
1.6.2.2. Score-System.....	38
1.6.3. Tumorerkrankungen.....	40
1.6.3.1. Definition des Begriffes „Tumor“	40
1.6.3.2. Folgen/Komplikationen maligner Tumoren	40
1.6.3.3. Tumorkachexie	41
2. Material und Methoden.....	43
2.1. Studiendesign	43
2.2. Patientenkollektiv	43
2.2.1. Patientengruppen allgemein.....	44
2.2.1.1. Hauptkriterien zur Zusammensetzung der Patientengruppen.....	45
2.2.2. Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen	45
2.2.2.1. Allgemein.....	45
2.2.2.2. Patientenspezifisch	46
2.2.3. Gruppe der metabolischen Erkrankungen	48
2.2.3.1. Allgemein.....	48
2.2.3.2. Patientenspezifisch	48
2.2.4. Gruppe der Tumorerkrankungen.....	49
2.2.4.1. Allgemein.....	49
2.2.4.2. Patientenspezifisch	49
2.2.5. Gruppe divers	50
2.2.5.1. Allgemein.....	50
2.2.5.2. Patientenspezifisch	50
2.2.6. Ein- und Ausschlusskriterien	51
2.2.7. Epidemiologische Daten	52
2.2.8. Klinische Parameter	52

2.2.9. Datenschutz	52
2.2.10. Nutzen-Risiko-Evaluierung	53
2.3. Studienablauf	53
2.3.1. Obduktion	53
2.3.2. Entnahmestellen	53
2.3.3. Kryokonservierung	54
2.3.3.1. Für die Kryokonservierung benötigte Materialien	54
2.3.3.2. Probenausarbeitung	55
2.3.4. FFPE.....	55
2.3.5. Immunhistochemie	57
2.3.5.1. Einzelschritte bei der IHC.....	57
2.4. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit.....	60
2.4.1. Ziele.....	60
2.4.2. 1. Hypothese	60
2.4.3. 2. Hypothese	60
2.4.4. 3. Hypothese	60
2.4.5. 4. Hypothese	60
2.4.6. 5. Hypothese	61
2.4.7. 6. Hypothese	61
2.4.8. Nullhypothese	61
2.5. Statistische Auswertung	62
2.5.1. Nullhypothese (H0)	62
2.5.1.1. H0 in Bezug auf die 6 Hypothesen	62
2.5.2. 1. Hypothese	63
2.5.3. 2. Hypothese	63
2.5.4. 3. Hypothese	64
2.5.5. 4. Hypothese	65
2.5.6. 5. Hypothese	68
2.5.7. 6. Hypothese	69
3. Ergebnisse	72
3.1. Histologisch	72
3.1.1. Metabolische Gruppe	73
3.1.2. Kardiovaskuläre Gruppe	74
3.1.3. Tumorgruppe	76

3.1.4. Gruppe divers	76
3.2. Immunhistochemie	78
4. Diskussion.....	80
Literaturverzeichnis	84
Fachbücher.....	84
Fachzeitschriften.....	87
Internetquellen.....	88
Anhang.....	89
Ethikkommissionsvotum	89
SOP Biobank.....	91
IHC.....	96

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Bedeutungen
AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropin
ADH	Antidiuretisches Hormon
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AOST	Aortenstenose
ARDS	Acute-Respiratory-Distress-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
C/EBP Alpha	CCAAT/enhancer-binding-protein-alpha
CLL	Chronisch-Lymphatische-Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
COPD	Chronisch-Obstruktive-Lungenerkrankung
CREBP	CAMP-Responsive-Element-Binding-Protein
Dilat. CMP	Dilatative Kardiomyopathie
DM	Diabetes Mellitus
e ⁻	Elektron
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FFPE	Formalin fixiert und Paraffin eingebettet
FFS	Freie Fettsäuren
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GÖR	Gastroösophagealer Reflux
GPCR	G-Protein-gekoppelte-Membranrezeptoren
H ⁺	Wasserstoff
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	High-Density-Lipoprotein
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HI	Herzinsuffizienz
Hp-Gastritis	Helicobacter pylori-Gastritis
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HT	Hypertonus
HTX	Herztransplantation
IDF	Internationale Diabetes Federation
IL-6	Interleukin-6
IRS- PI3K	Insulin-Receptor-Signaling-Phosphatidylinosidite-3-Kinasen
JAK 2	Janus Kinase 2
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Linke Koronararterie

LDL	Low-Density-Lipoprotein
Lp(a)	Lipoprotein(a)
M.	Muskel
MI	Myokardinfarkt
MOV	Multiorganversagen
MSC	Mesenchymale Stammzelle
Myf5	Myogenic-factor 5
NINS	Niereninsuffizienz
NADH/H⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
OP	Operation
pAVK	peripher-Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-Bufferes-Saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PKA	Proteinkinase A
PPAR	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor
PRDM16	PR-Domain-Containing 16
PROCAM	Prospective-Cardiovascular-Munster-Study
Proc.	Processus/Fortsatz
SHT	Schädelhirntrauma
SSW	Schwangerschaftswoche
TGFβ	Transforming-Growth-Factor-β
TNF Alpha	Tumor Nekrose Faktor Alpha
UCP	Uncoupling Protein
WAT	Weißes Fettgewebe
#	Fraktur/Bruch

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Seitenzahl	Beschreibung
Abb. 1	22	WAT aus eigener Probandenreihe.
Abb. 2	25	Braune Adipogenese nach Cypess & Kahn.
Abb. 3	28	BAT und WAT.
Abb. 4	29	Überblick über die Signalkaskade zur Aktivierung von UCP1.
Abb. 5	31	Ablauf der Energiegewinnung in einem Mitochondrium.
Abb. 6	43	Geschlechterspezifische Darstellung des Sterbealters anhand der 41 Probanden.
Abb. 7	62	Prozentuelle Verteilung von BAT innerhalb der Studienpopulation.
Abb. 8	63	Prozentuelle Verteilung der Geschlechter n=41.
Abb. 9	64	Prozentuelle Verteilung der Geschlechter n=9.
Abb. 10	64	Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppen bei n=9.
Abb. 11	65	Prozentuelle Verteilung n=41 in der Alterskategorie <50 J. und >50 J.
Abb. 12	65	Verteilung der Proben n=41 nach dem Alter innerhalb der Erkrankungsgruppen.
Abb. 13	65	Prozentuelle Verteilung bei n=9 in der Alterskategorie <50 J. und >50 J.
Abb. 14	66	Verteilung des Alters innerhalb der Gruppen bei n=9.
Abb. 15	67	Prozentuelle Verteilung der obduzierten innerhalb der Gruppen (n=41) und in Bezug auf das Vorkommen von BAT (n=9).
Abb. 16	68	Prozentuelle Verteilung der beiden Gruppen bei n=41.
Abb. 17	69	Prozentuelle Verteilung der Bauchumfangsgruppen bei n=9.
Abb. 18	69	Prozentuelle Verteilung der Erkrankungsgruppen innerhalb der Bauchumfangsgruppen bei n=9.
Abb. 19	70	Prozentuelle Verteilung der Erkrankungsgruppen innerhalb der Bauchumfangsgruppen bei n=41.
Abb. 20	72	BAT-Areal aus Probe B bei obigen Patienten.
Abb. 21	74	Ausschnitt aus HE gefärbter Probe F von Patient 30.
Abb. 22	74	Prozentuelle Verteilung von BAT in Bezug auf die Lokalisation innerhalb der Gruppen.
Abb. 23	75	BAT bei Nr. 12 in A-Lokalisation.
Abb. 24	76	HE Ausschnitt von Patient Nr. 12 aus Gruppe divers in B-Lokalisation.
Abb. 25	76	Prozentueller Vergleich der BAT-Verteilung innerhalb der vorgegebenen Lokalisationen in Gruppe divers.
Abb. 26	77	Linkes Bild: IHC-positiv Kontrolle, rechts: HE-gefärbter Hibernomschnitt.
Abb. 27	78	IHC Schnitt, Patient Nr. 2, links B-Lokalisation, rechts C.

Tabellenverzeichnis

Nr.	Seitenzahl	Beschreibung
Tab. 1	35	Überblick über die Verteilung von BAT in Bezug auf die Einflussfaktoren
Tab. 2	39	PROCAM-Score
Tab. 3	41	Häufigste paraneoplastische Komplikationen
Tab. 4	44	Verteilung der Patientenpopulation innerhalb der Gruppen
Tab. 5	46	Patienten der kardiovaskulären Gruppe
Tab. 6	47	Patienten der metabolischen Gruppe
Tab. 7	48	Patienten der Tumorgruppe
Tab. 8	50	Darstellung der Einchlusskriterien
Tab. 9	53	Überblick über die Proben-Entnahmestellen
Tab. 10	62	Prozentuelle Verteilung der Personen auf die Lokalisationen
Tab. 11	63	Beschreibt die H1 der 2. Hypothese
Tab. 12	66	Prozentuelle Verteilung von BAT innerhalb der <50 und >50 jährigen
Tab. 13	67	Prozentuelle Verteilung der obduzierten Personen in Bezug auf die Grunderkrankung und das Vorkommen von BAT
Tab. 14	68	Prozentuelle Verteilung der Bauchumfangsgruppe bei BAT-positiven und BAT-negativen Proben
Tab. 15	69	Verteilung der Erkrankungen innerhalb der Bauchumfangsgruppe und des Geschlechts
Tab. 16	72	Gehalt von BAT innerhalb der Lokalisationen und Gruppen

Zusammenfassung

Hintergrund

Braunem Fettgewebe, als zentralem Organ für die zitterfreie Thermogenese wurde lange Zeit nur in Hinblick auf Winterschläfer und Neugeborene Relevanz zugesprochen. Erst durch die Identifikation von UCP1 als entscheidendem Protein im BAT-Stoffwechsel wurden Einsichten in Bezug auf das Vorkommen und die Bedeutung auch beim Erwachsenen erzielt. Durch weitere Nachforschungen konnte somit die Existenz von BAT beim Erwachsenen bewiesen und zugleich beachtliche Verteilungsunterschiede betreffend das Vorhandensein und den Gehalt an BAT und seines UCP1 festgestellt werden.

Methoden

In dieser retrospektiven Autopsiestudie wurden an Stellen, an denen vermeintlich BAT vorkommt, Proben von 41 routinemäßig obduzierten Patienten entnommen und je nach Grunderkrankung in 3 Gruppen eingeteilt (kardiovaskuläre, metabolische und tumoröse Gruppe). Die Gewebeproben wurden weiters in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, um anschließend histologisch begutachtet zu werden. Bei Bestätigung von braunen Adipozyten in HE-gefärbten Schnitten wurden diese Proben immunhistochemisch weiterverarbeitet, um UCP1 nachzuweisen. Anhand dieser 2 Methoden sollte BAT/UCP1 nachgewiesen werden, um im Anschluss daran mögliche Verteilungsunterschiede in den Gruppen zu erörtern.

Ergebnisse

Unter allen in dieser Studie obduzierten Patienten konnte bei 22 % (9 BAT-positive Patienten) sowohl histologisch als auch immunhistochemisch BAT/UCP1 nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Entnahmestellen innerhalb dieser 22 % ergab sich ein Minimum an BAT in Lokalisation „A“ (rechts zervikal) und ein Maximum in „F“ (links paravertebral). Die BAT-positiv bewerteten Probanden zeigten eine dem Bauchumfang indirekt proportionale Verteilung, wobei sich eine maximale Zuordnung in der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen präsentierte. Ein alters- und geschlechtsabhängiges Verteilungsmuster konnte anhand statistischer explorativer Auswertungen nicht bestätigt werden.

Schlussfolgerung

Aufgrund des Nachweises von BAT bei obduzierten Patienten konnte eindeutig bewiesen werden, dass braune Adipozyten/Areale und auch das für die Thermogenese entscheidende UCP1 beim Erwachsenen in unterschiedlich großen Mengen auch bei Routineobduktionen zu finden ist. Daher kann auf eine gewisse Relevanz im adulten Stoffwechsel geschlossen werden. Weiters zeigte sich eine Häufung bei Probanden mit regelrechten bis verminderten Bauchumfangswerten. Durch die geringe Fallzahl ließ sich kein signifikanter Verteilungsunterschied in Bezug auf die zuvor definierten Krankheitsgruppen zeigen. Eine Erhöhung der Probandenpopulation könnte eine derartige Korrelation mit BAT ersichtlich machen.

Abstract

Background

For a long time brown adipose tissue (BAT) as a central organ for nonshivering thermogenesis was considered only in terms of hibernating animals and babies. Only through the identification of UCP1 as crucial protein in the BAT metabolism, were insights achieved regarding the occurrence and significance in adults too. After more research the existence of BAT in adults could be proven and simultaneously differences concerning the availability and content of BAT and UCP1 were observed.

Methods

In this retrospective autopsy study 41 samples were collected from routinely autopsied patients of supposed areas with BAT and were divided according to basic disease in three groups. These tissue materials were fixed in formalin and embedded in paraffin to be then surveyed subsequently histologically. After the proof of brown adipocytes at HE stained sections these samples were analyzed immunohistochemically for UCP1 presence. Presence of BAT/UCP1 was further correlated with clinical dates in respect to the three groups.

Results

Among all autopsied patients in this study BAT/UCP1 could be demonstrated in 22 % of the cases histologically and immunohistochemically. From this 22 % a minimum of BAT was found in location "A" (right cervical) and a maximum in "F" (left paravertebral). Persons with BAT showed normal or reduced abdominal circumferences and it was primarily found in the cardiovascular group. An age and sex-dependent distribution pattern could not be proven in the explorative statistic.

Conclusion

BAT presence in routine autopsies was found in small to large quantities. This leads to the conclusion that BAT is significant in adult metabolism. BAT was more frequently found in patients with regular or reduced abdominal girth. Due to the small number of cases no significant difference was observed according to the

previously defined disease groups. An increase in the number of cases could reveal a correlation with BAT and underlying disease.

1. Allgemeiner Teil

1.1. Einleitung

Lange Zeit wurde braunem Fettgewebe, welchem die Funktion der sogenannten „nonshivering“ Thermogenese innewohnt beim Menschen nur in Bezug auf Säuglinge und Kleinkinder Bedeutung zugesprochen. Dies lässt sich auf den Umstand zurückführen, dass Babys zwar eine intakte Thermoregulation aufweisen, aber aufgrund von negativen physiologischen Einflussfaktoren schnell zur Auskühlung neigen. Einige Gründe sind die im Verhältnis zum Gewicht große Körperoberfläche, die Unfähigkeit durch Muskelzittern aktiv Wärme zu erzeugen, weiters das im Vergleich zu Erwachsenen deutlich dünnere subkutane WAT sowie das höhere Atemvolumen.¹

Um diese in Bezug auf die Körpertemperatur ungünstigen Faktoren minimieren zu können weisen Neugeborene und Säuglinge bis zu 6 %² BAT auf, wodurch sie in der Lage sind, Wärme direkt ohne Muskelzittern zu erzeugen. Diese zitterfreie Thermogenese wird durch das Enzym UCP1, welches in der inneren Mitochondrienmembran von braunen reifen Adipozyten eingelagert ist, vollzogen. Es handelt sich um ein Transmembranprotein, welches in aktivierter Konstitution die ATP-Bildung verhindert, indem es den ATP-Synthase-Komplex blockiert. Dieses außer Kraft gesetzte System kann folglich das für die Energieerzeugung benötigte Konzentrationsgefälle nicht mehr modellieren, womit direkt Wärme erzeugt werden kann.³

Diese schnelle und produktive Wärmeadaptation ist essentiell für die Thermogenese im Neugeborenen- und Säuglingsalter.²

In den letzten Jahren wurde BAT nicht nur für das Kindesalter, sondern auch im Erwachsenenalter Relevanz zugesprochen. Infolgedessen wurden das Vorkommen und die Bedeutsamkeit von BAT auch im Erwachsenenalter intensiver erforscht. Diese Nachforschungen wiederum brachten nicht nur Einsichten über die Wichtigkeit von BAT im adulten Metabolismus, sondern lieferten auch neue Hypothesen über dessen Einfluss und Bedeutung.

Einige Studien konnten mittels PET-Scan den Nachweis von aktiv relevantem BAT beim Erwachsenen erbringen und gleichzeitig erhebliche Verteilungsunterschiede in einem Patientenkollektiv ermitteln.⁴

Auf diesen mittels PET-Scan erbrachten Beweisen von BAT und den Verteilungsunterschieden innerhalb einer Patientenpopulation stützt sich diese Arbeit.

Sie stellt eine retrospektive Autopsiestudie dar, die im Rahmen klinisch-pathologischer Routineobduktionen am Institut für Pathologie Graz durchgeführt wurde und widmet sich dem Nachweis von BAT und der Frage nach Verteilungsunterschieden innerhalb häufiger Erkrankungen (kardiovaskulären, metabolischen und Tumorerkrankungen).

Die aus vorab genau bestimmten Bereichen entnommenen Proben wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Korrespondierende Areale wurden kryokonserviert, um für weitere Analysen zur Verfügung zu stehen.

Nach histologischer Beurteilung der verarbeiteten Proben wurden bei Nachweis von BAT diese Gewebestücke immunhistochemisch mit AK gegen UCP1 untersucht, um so mittels einer zweiten Methode den BAT-Nachweis zu erbringen. Auf Basis der Ergebnisse dieser 2 Methoden wurde das Verteilungsmuster von BAT innerhalb eines Patienten in den entnommenen Arealen sowie die Verteilung in den Patientengruppen untereinander analysiert und statistisch ausgewertet.

1.2. Fettgewebe

Fettgewebe stellt eine Sonderform des Bindegewebes dar, genauer gesagt des retikulären, nach einigen Autoren des lockeren Bindegewebes. Es besteht aus Zellen, den sogenannten Adipozyten, welche je nach Fettgewebsart einen Lipidtropfen (univakuolär) oder viele kleine Fetttropfen (multivakuolär) enthalten.⁵

1.2.1. Entwicklung des Fettgewebes allgemein

Das Fettgewebe lässt sich histologisch gesichert zum ersten Mal zwischen der 14 und 16 SSW nachweisen, in den Wochen davor können die Vorstufen der Fettzellen nicht sicher von anderen Bindegewebszellen unterschieden werden.

Zu Beginn der Fettzellendifferenzierung schließen sich pluripotente, mesenchymale Stammzellen zu Gruppen zusammen. In diese wachsen Kapillaren ein, wodurch erste, primitive Fettläppchen entstehen. Dieser Prozess startet im Kopf- und Halsbereich, wird über den Körperstamm fortgeführt und endet an den Extremitäten.

Zu Beginn des letzten Trimenons der Schwangerschaft zeigt der Fetus schon in nahezu allen Bereichen des Körpers differenziertes Fettgewebe.⁶

Im Verlauf der Adipogenese differenzieren sich Adipoblasten zu rundlichen Präadipozyten, welche bis ins hohe Erwachsenenalter im reifen Fettgewebe vorkommen. Durch den Einfluss von Transkriptionsfaktoren und anderen entscheidenden Faktoren differenzieren sich diese Vorstufen zu reifen Adipozyten. Diese zeigen die charakteristischen Lipideinlagerungen, die je nach Fettgewebsart zu einem univakuolären Lipidtropfen konfluieren oder sich multivakuolär präsentieren.^{7, 8}

Proteine der BMP-Familie scheinen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von weißen und braunen Adipozyten zu spielen. Während BMP2 und BMP4 eine Bildung zu weißen Fettzellen begünstigen, zeigte sich, dass hohe Konzentrationen von BMP7 die BAT-Entwicklung fördern.⁷

Die Fettzellendifferenzierung läuft entlang der Kapillaren ab.⁶

1.3. WAT

1.3.1. Vorkommen und Verteilung von WAT

Postnatal konnte ein durchschnittlicher Fettanteil in Bezug auf die Gesamtkörpermasse von 13 % bis 16 % festgestellt werden. Dieser Anteil erhöht sich im 1. Lebensjahr auf ca. 28 %⁹ wobei die Zunahme hauptsächlich aus einer Erhöhung des Adipozytenvolumens resultiert. Bis zum 6. Lebensjahr sinkt dieser Anteil, um anschließend wieder zu steigen. Dieser zweite Gipfel ergibt sich aus einer Zunahme der Adipozytenzahl. Bis auf wenige Ausnahmen verändert sich die Fettzellanzahl nach dieser Zeit nicht mehr. Die Zu- und Abnahme des Fettgehaltes steht in direktem Zusammenhang mit den körperlichen Wachstumsphasen.

Vorkommen und Verteilung des WAT sind geschlechts- und altersabhängig. Es ergeben sich dafür typische geschlechtsspezifische Fettverteilungsmuster, wobei sich diese erst nach der Pubertät einstellen. Im Durchschnitt beträgt der Fettgehalt nach Ende des Körperwachstums bei Mädchen 23-26 % und bei Jungen 11-17 %.¹⁰ Die Lipidverteilung beim Kind präsentiert sich nahezu gleichmäßig subkutan, während sich beim Erwachsenen eine typische geschlechtsabhängige Verteilung zeigt.¹¹

WAT wird in subkutanen (peripheres) und intraabdominelles Fettgewebe eingeteilt. Bei Frauen überwiegt das subkutan (viele Östrogen-Rezeptoren) gelegene Fettgewebe, hier besonders im Bereich der Brust und am Gesäß. Bei Männern findet man vor allem intraabdominell (viele Androgen-Rezeptoren) gelegenes Fettgewebe, aber auch im Bereich des Nackens.¹²

Diese geschlechterdifferenzierte Verteilung unterliegt hormonellen Kontrollen und resultiert zum Teil aus der im subkutanen und intraabdominellen Fett gelegenen unterschiedlichen Expression von Östrogen- und Androgen-Rezeptoren. Im Alter verlagert sich diese Rezeptorverteilung unabhängig vom Geschlecht von peripher zu intraabdominell, wodurch es auch zu einer Fettverlagerung kommt.⁷

1.3.2. Physiologische und biochemische Prozesse des WAT

Lange Zeit galt als Hauptfunktion des weißen Fettgewebes die Speicherung und Bereitstellung von Energie in Form von Lipiden.

Heute weiß man, dass es sich beim Fettgewebe auch um ein endokrines Organ handelt, welches durch Synthese und Sekretion von verschiedensten Mediatoren auch metabolischen und kardiovaskulären Einfluss nimmt.¹³

1.3.3. WAT als endokrines Organ

Als größtes endokrines Organ hat das weiße Fettgewebe durch seine Sekretionsprodukte erheblichen Einfluss auf verschiedene Funktionen des Körpers. Dabei wird unterschieden zwischen fast ausschließlich in den Adipozyten synthetisierten Mediatoren (Adipokine), Hormonen/Prohormonen, die auch in

anderen endokrinen Organen erzeugt werden, und Zytokinen, die von ins Fettgewebe eingewanderten Entzündungszellen produziert werden.⁸

1.3.3.1. Adipokine

Adipokine, auch Adipozytokine genannt, sind von Adipozyten sezernierte, endokrin aktive Stoffe mit unterschiedlichen regulatorischen Funktionen. Das wohl bekannteste hiervon ist Leptin, durch welches das Fettgewebe erst als endokrines Organ erkannt wurde. Weitere wichtige Adipokine sind: Adiponectin, Resistin, TNF α und IL-6.¹⁴

Leptin

Dieses 1994 entdeckte Amino-peptid übermittelt Informationen über die vorhandenen Energiereserven von den Adipozyten zum Gehirn. Es konnte gezeigt werden, dass der Leptinspiegel mit der Körperfettmasse korreliert.

Die Leptinsynthese wird durch Insulin und Glukokortikoide stimuliert, das sezernierte Leptin bindet an seinen Zytokinrezeptor, welcher in einer hohen Dichte im Nucleus arcuatus und im ventromedialen Hypothalamus zu finden ist. Im Anschluss an die Rezeptorbindung stellt sich über eine Aktivierung der JAK2 und der IRS-P13K Appetithemmung ein.⁶

1.3.4. Morphologisches Erscheinungsbild des WAT

Reife, weiße Fettgewebszellen, die sogenannten weißen Adipozyten, sind sehr große Zellen, die einen Durchmesser zwischen 50 und 150 μm aufweisen und von einem Lipidtropfen weitestmöglich ausgefüllt werden. Sie präsentieren sich somit als univakuoläre Fettgewebszellen. Durch diesen großen Fetttropfen wird der Kern an den Rand gedrängt und erscheint abgeflacht und exzentrisch gelegen. Auf Grund von fettlöslichen Medien, welche für die mikroskopische Präparation notwendig sind, erscheint die reife Fettgewebszelle optisch leer, zusammen mit dem Zytoplasmasaum erinnern diese Zellen an Siegelringzellen.^{15, 16} Die Adipozyten präsentieren sich als runde Zellen wenn sie einzeln liegen, aber

polyedrisch wenn sie dicht gepackt in einem Fettgewebsverband liegen.¹⁷ Das gespeicherte Lipid liegt membranlos frei im Zytoplasma.¹⁸

Elektronenmikroskopisch sichtbar sind an der Oberfläche der Plasmamembran gelegene Caveolae,¹⁹ welche als Domäne für die Koppelung von Membranrezeptoren und intrazellulären Signalketten dienen.²⁰ Der Golgi-Apparat und die Mitochondrien sind im Vergleich zum ER und den freien Ribosomen vermehrt im Zytoplasma anzutreffen.¹⁵

Adipozyten werden von retikulären und kollagenen Fasern umschlossen und so in Form gehalten. Eingelagert sind die weißen Fettgewebszellen einzeln oder in Gruppen in lockeres Bindegewebe. Zwischen den Fettzellen liegt reichlich Interzellularsubstanz.¹⁸

Fettgewebe wird durch Bindegewebssepten in Läppchen unterteilt, welche wie ein Halteapparat die ober- und unterhalb gelegenen Strukturen mit dem Fettgewebe verbinden.²¹

WAT ist ein gut vaskularisiertes und noradrenerg innerviertes Gewebe. Es zeigt sich, dass im Durchschnitt auf eine Fettzelle eine Kapillare kommt. Bei den innervierenden Nerven handelt es sich um postganglionäre, sympathische Fasern die Adrenalin und Noradrenalin freisetzen.²²

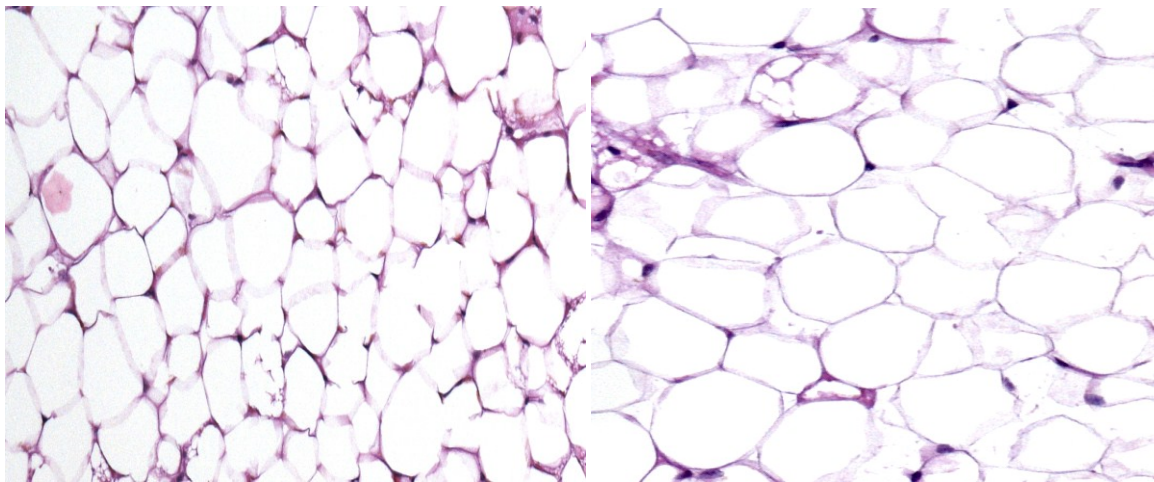


Abb.1 WAT aus eigener Probenreihe

1.4. BAT

1.4.1. BAT allgemein

Erst vor ca. 40 Jahren wurde die Hauptaufgabe und Funktion des braunen Fettgewebsorgans und seines einzigartigen mitochondrialen Proteins, UCP1, erstmals formuliert: „Energie in Wärme transferieren“. Es ist entscheidend für die Thermogenese und unmöglich ohne BAT Wärme längerfristig zitterfrei zu erzeugen. Somit ist es nicht nur bei Winterschläfern, sondern auch beim Menschen von Bedeutung. Dies besonders postnatal, da aufgrund negativer Faktoren sehr schnell Wärme an die Umgebung verloren geht.

Die Aktivierung dieses thermogenetischen Prozesses wird durch unterschiedliche Ursachen initiiert wie z.B. Körperkerntemperatur, Ernährungszustand, Energiezustand des Körpers, etc.

Die Kontrolle zur Aktivierung der Thermogenese befindet sich mit großer Wahrscheinlichkeit im ventromedialen Hypothalamus. Über Sympathikusaktivierung und Katecholaminfreisetzung, insbesondere Noradrenalin, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, deren Endergebnis die UCP1-Aktivierung und somit die Wärmebildung ist.²³

Weiters zeigte sich in den letzten Jahren ein reges Interesse an der Differenzierung von braunen Adipozyten, da vermutet wird, dass diese sich aus weißen Fettzellen differenzieren können.

Dies könnte einen entscheidenden Ansatz für die Entwicklung von Therapien für adipöse Patienten liefern.²⁴

1.4.2. Differenzierung von BAT

Der Großteil des BAT entwickelt sich pränatal und ist zum Zeitpunkt der Geburt funktionsfähig, um die hohen thermogenen Anforderungen erfüllen zu können. Es wird angenommen, dass sich nur ein kleiner Teil postnatal differenziert, um aktiv auf Einflussfaktoren reagieren zu können.²⁵ Aufgrund von Nagetierversuchen konnte gezeigt werden, dass es zwei Arten von braunen Adipozyten gibt, cBAT und rBAT. Unter cBAT versteht man BAT embryonalen Ursprungs, welches in der

Interskapular-Region zu finden ist. rBAT präsentiert sich zwischen WAT und Skelettmuskel und wird auch als „induzierbares“ BAT bezeichnet.²⁶

Weiters konnte in Mausmodellen dargestellt werden, das cBAT sich aus Myf5-positiv exprimierenden myogenen Vorläuferzellen entwickelt, während sich rBAT von Myf5-negativen Zellen mit bestimmten Merkmalen, wie z.B. größere Sensibilität für β 3-adrenerge Stimulationen und kalte Temperaturen ableitet.

Der bekannteste Induktor für die Adipogenese von BAT ist Noradrenalin. Jüngste Veröffentlichungen haben gezeigt, dass auch viele Liganden wie z.B. BMP-Familie, TGF- β -Superfamilie, PPAR γ , C/EBPs und FGF eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung zu spielen scheinen. Insbesondere bei BMP7 konnte gezeigt werden, dass es sich um einen starken Auslöser für die braune Adipogenese handelt, während BMP2 und BMP4 die WAT-Differenzierung induzieren. Bei TGF- β konnte ein hemmender Effekt auf die Adipozyten nachgewiesen werden.^{27, 28}

Die Differenzierung von MSC zu einem funktionsfähigen braunen Adipozyt kann laut Cypess und Kahn in 3 Phasen eingeteilt werden, wobei jede Phase unter einem spezifischen hormonellen und transkriptionellen Einfluss steht. Die 1. Phase „Commitment-Phase“ beschreibt die Differenzierung von einer MSC zum braunen Präadipozyten. Hier sind PRDM16, ein Transkriptionskoaktivator, welcher durch Bindung an PPAR γ die Adipogenese stimuliert und PGC1 α sowie C/EBP von entscheidender Bedeutung.²⁷ Es zeigte sich, dass eine erhöhte Konzentration der beiden Koaktivatoren PRDM16 und PGC1 α zu einer Wandlung von Myoblasten zu BAT-Zellen führen kann. Ein Verlust von PRDM16 führt demzufolge zu einer vermehrten Differenzierung von Muskelzellen.²⁹

Die 2. Phase oder „Differentiations-Phase“ genannt führt zur Entstehung von braunen Adipozyten.

In der letzten Phase entstehen aktivierte, voll funktionsfähige enddifferenzierte braune Fettzellen.²⁷

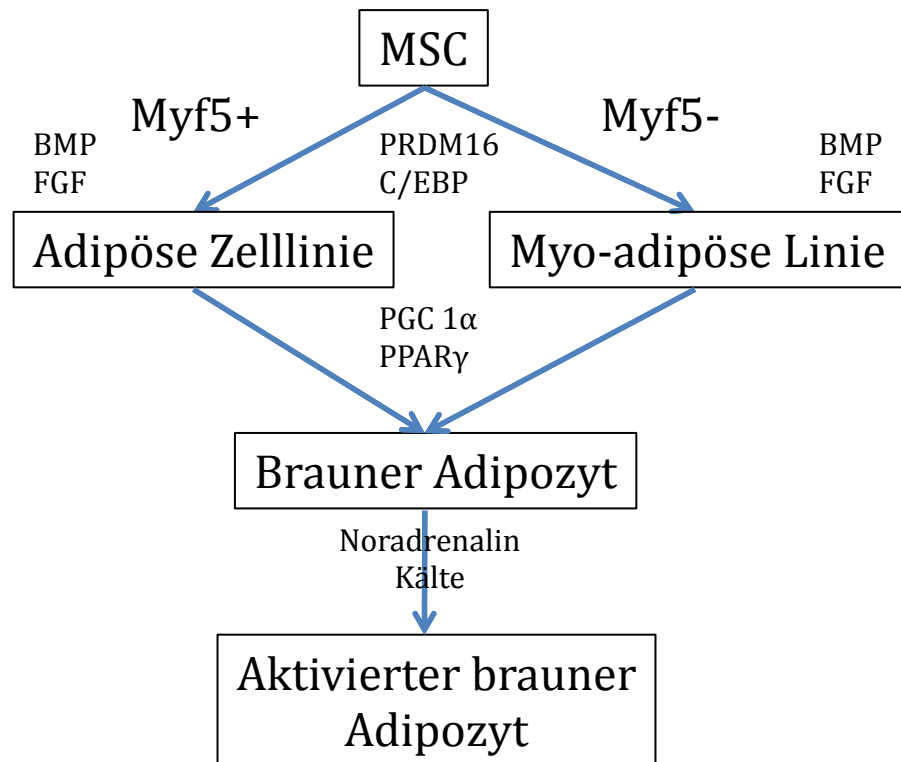


Abb.2 Braune Adipogenese nach Cypess & Kahn

1.4.3. Vorkommen und Verteilung des BAT

In der Neonatalperiode zeigen Kinder einen BAT-Gehalt von bis zu 6 % des eigenen Körpergewichtes.

Prädilektionsorte sind subkutan im Bereich der Axillen und der Scapulae. Weiters findet man Ansammlungen von BAT nahe der Capsula fibrosa, in beiden Nieren und im Mediastinum. Dieser beeindruckende Anteil wird im Laufe des ersten Lebensjahres zunehmend in WAT umgewandelt.²

Lange glaubte man, dass Erwachsene keinen oder nur einen nicht nennenswerten Anteil von BAT besitzen. Auch heute noch findet man in einigen Lehrbüchern diesen Irrglauben.

Durch das zunehmende Interesse an dieser Fettgewebsform konnte diagnostisch bewiesen werden, dass auch Erwachsene einen nicht zu verachtenden Anteil an BAT besitzen, wobei der Gehalt variiert und von bestimmten Faktoren abhängig zu sein scheint.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass BAT vermehrt bei weiblichen, jungen (<50 J.) Erwachsenen mit einem niedrigen BMI auftritt. Männer zeigten im PET-Scan

einen BAT-Gehalt von durchschnittlich 11,6 g, Frauen schafften es im Durchschnitt auf 12,3 g.

Die beim Erwachsenen bevorzugten Regionen unterscheiden sich im Vergleich zum neonatalen BAT, wodurch es in der Vergangenheit auch zu Fehleinschätzungen in Bezug auf das Vorkommen von BAT beim Erwachsenen gekommen sein dürfte.

Prädilektionsorte des adulten BAT sind im Bereich der zervikal-supraclavikulären Region, superficial und lateral des M. sternocleidomastoideus, weiters zwischen dem M. subscapularis und M. pectoralis, hinter dem Plexus brachialis und paraspinal durch Brust und Bauchhöhle. Ein minimaler Anteil fand sich bei einigen Probanden perinephrer.⁴

1.4.4. Anatomische Regionen von BAT beim Erwachsenen

1.4.4.1. Zervikal-supraclavikulär-Region

Mittels PET-Scan konnte in der zervikal-supraclavikulär-Region BAT am häufigsten nachgewiesen werden. Die genaue Lokalisation befindet sich ventral des Halses, gesondert in einer Faszie, superficial und lateral des M. sternocleidomastoideus.⁴

Bei der beschriebenen Faszie handelt es sich um die oberflächliche Halsfaszie, die Lamina superficialis oder auch Fascia zervikalis superficialis. Diese bindegewebige Membran umschließt nach ventral den M. sternocleidomastoideus und den dorsal gelegenen M. trapezius.³⁰

Der M. sternocleidomastoideus gehört zu den oberflächlichen Halsmuskeln. Er entspringt zweiköpfig, mit einem Caput sternale am Manubrium und einem Caput clavikulare am mittleren Drittel des Schlüsselbeins. Vereinigt setzen beide Muskelköpfe breitbasig am Proc. mastoideus an.³¹

1.4.4.2. Plexus brachialis-Region

Ferner zeigte sich BAT zwischen dem M. subscapularis und dem M. pectoralis minor, hinter dem Plexus brachialis.⁴

Der M. subscapularis gliedert sich zu den dorsalen Schultermuskeln und bildet mit drei anderen Muskeln die Rotatorenmanschette aus.³² Er entspringt breitbasig von der ventralen Schulterblattfläche, genauer gesagt in der Fossa subscapularis und zieht zum Humeruskopf, wo er am Tuberculum minor ansetzt.³³

Der M. pectorialis minor hat seinen Ursprung zwischen der 2. bis 5. Rippe lateral der Knorpel-Knochen-Grenze und setzt am Proc. coracoideus der Schulter an.

Zwischen dem kleinen Pectoralismuskel und der Clavikula liegt das Trigonum clavipectorale, welches als Durchtrittspforte für den Plexus brachialis, für die V. axillaris und die A. axillaris fungiert.³⁴

Der Plexus brachialis setzt sich aus einem proximalen und einem distalen Anteil zusammen. Der Ast der Spinalnerven C₅-TH₁ und drei Trunci bilden den oberen Plexus brachialis. Der untere Teil formiert sich aus drei Nervenbündeln, Fasciculus posterior, medialis und lateralis.³⁵ Im dorsalen Drittel der Clavikula vereinigen sich die Trunci zu den Faszikeln um die A. axillaris herum, hinter dem M. pectorialis minor.³⁶

Dies ist auch der Bereich in dem BAT diagnostisch nachgewiesen werden kann.

1.4.4.3. Paraspinal durch Brust und Bauchhöhle

Gelegentlich zeigten sich auch neben dem Canalis vertebralis, von thorakal bis abdominal, schwach positive BAT-Areale im PET-Scan, wobei sich diese Bereiche diffus in der Brust und Bauchhöhle befanden.⁴

1.4.5. Mikroskopisches Aussehen von BAT

Die Zellen des BAT präsentieren sich deutlich kleiner als die der weißen Adipozyten. Sie zeigen einen Durchmesser von 30 µm.³⁷ Ihr Nucleus liegt exzentrisch, randständig. Aufgrund ihrer multivakuolären Fettspeicherung³⁸ zeigen sich die braunen Fettzellen plurivakuolär.³⁹

Im Zytoplasma befindet sich zwischen den multiplen Lipidvakuolen eine Vielzahl von Mitochondrien, welche spezifisch für BAT sind.³⁰ Dieser Reichtum an Mitochondrien erklärt sich dadurch, dass die aus gespeicherten Triglyceriden

entstandenen FFS in den Mitochondrien verbrannt werden, im Gegensatz zum WAT, welches FFS ins Blut und in die Leber abgibt.⁴⁰

In der inneren Mitochondrienmembran wird UCP1 unter anderem durch frei werdende Fettsäuren aktiviert und bewerkstelligt seine Aufgabe als Transmembranprotein.

Die bräunliche Färbung, die sich auch makroskopisch gut erkennen lässt, entsteht durch Lipochrome. Andere Zellorganellen, wie zum Beispiel der Golgi-Apparat und das ER, sind nur schwach entfaltet.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal für BAT sind die zahlreichen noradrenergen Nervenfasern welche an die Oberfläche der braunen Adipozyten herantreten³⁰ und synapsenähnliche Strukturen aufweisen.³² Noradrenalin stimuliert über cAMP-Aktivierung eine Lipase, wodurch FFS freigesetzt wird und so wiederum Thermogenin aktivieren.⁴¹

Eine weitere Auffälligkeit, die sich mikroskopisch darstellt, ist die große Anzahl an Kapillaren, welche BAT umschließen.³⁰

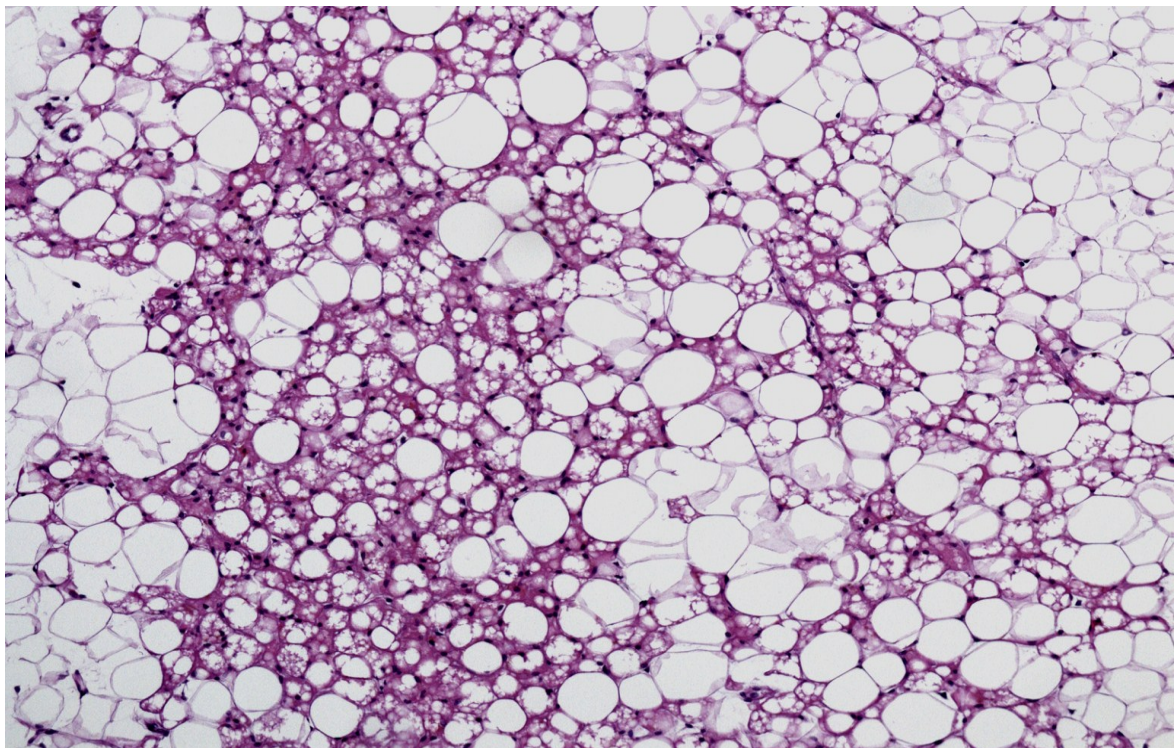


Abb. 3 BAT und WAT (aus eigener Probandenreihe), deutlich erkennbar der Unterschied zwischen den plurivakuolären braunen Adipozyten und den univakuolären weißen Fettzellen.

1.4.6. Physiologische und biochemische Prozesse von BAT/UCP1

Die Katecholamine, Adrenalin und vor allem Noradrenalin, welche an den postganglionären sympathischen Nervenenden abgegeben werden, aktivieren unter anderem die braunen Adipozyten zur Thermogenese über die Bindung an β_3 -Rezeptoren.⁴²

Diese β_3 -Rezeptoren gehören in die Gruppe der G_s -Protein-gekoppelten Membranrezeptoren und kommen fast ausschließlich im BAT vor. Ein kleiner Anteil konnte auch im WAT nachgewiesen werden. GPcR vermitteln schnelle Reaktionen, d.h. binnen Sekunden kommt es über eine Signalkaskade zu Regulationsvorgängen.⁴³

Die β_3 -Rezeptoren sind für Noradrenalin empfindlicher als für Adrenalin.⁴⁴ Effektoren die am GPcR im BAT binden stimulieren die AC wodurch es zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration kommt.

Diese Konzentrationserhöhung des second messengers führt zu einem Andocken von diesem an die regulatorische PKA-Untereinheit, wodurch diese aktiviert wird.⁴⁵

Die Enzymaktivierung führt auf der einen Seite zur Phosphorylierung der hormonsensitiven Lipase, welche durch TGZ-Spaltung FFS zur intramitochondrialen β -Oxidation bereitstellt und dadurch Thermogenin stimuliert. Auf der anderen Seite führt die PKA-Aktivierung zur Freisetzung von CREBP, welches als Transkriptionsfaktor die Codierung von UCP1 in der inneren Mitochondrienmembran fördert.⁴⁶

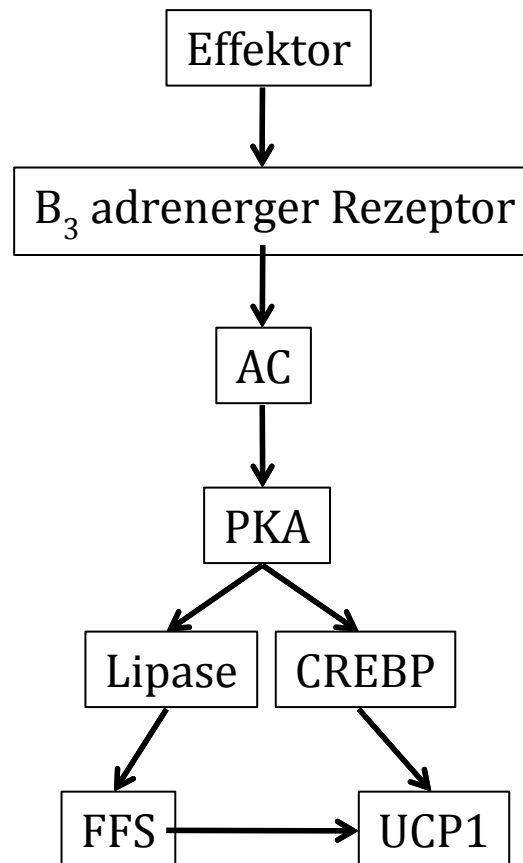


Abb.4 Überblick über die Signalkaskade zur Aktivierung von UCP1.

1.5. UCP1

UCP1 oder auch Thermogenin genannt ist ein Mitglied der mitochondrialen multipass Transmembranprotein-Familie, welches sich in der inneren Mitochondrienmembran von BAT befindet.

Dieses uncoupling-Protein bildet ca. 10 % von allen Membranproteinen im BAT. Im Vergleich dazu machen UCP2 und UCP3 nur ca. 0,01-0,1 % im BAT aus. Wie auch andere Carrier zeigt das Thermogenin strukturelle Gemeinsamkeiten mit seinen Verwandten. Es ist ca. 300 Aminosäuren lang und zeigt eine dreigliedrige Struktur.^{47, 48}

Das Gen, welches UCP1 exprimiert, wurde am langen Arm vom Chromosom 4 im q31 Bereich identifiziert.⁴⁹ Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 33 kDa bildet einen Dimer⁵⁰ mit 2 kongruenten Untereinheiten. Diese Untereinheiten

setzen sich aus 6 hydrophilen Helices zusammen, welche die innere Mitochondrienmembran durchziehen und so einen Protonenkanal bilden.⁵¹

In aktivierter Form kommt es über den Protonenkanal zu einem H^+ -Einstrom ins Mitochondrieninnere. Durch diese H^+ -Permeabilitätserhöhung im Inneren kann kein H^+ -Gradient erzeugt werden der für die Produktion von ATP notwendig wäre. Somit wird Wärme durch die Entkoppelung des Atmungsketten-ATP-Synthase-Kreislaufes erzeugt.⁵² Bisher wurde kein anderes Enzym entdeckt einschließlich UCP2 und UCP3, welches direkt Wärme erzeugt.⁵³

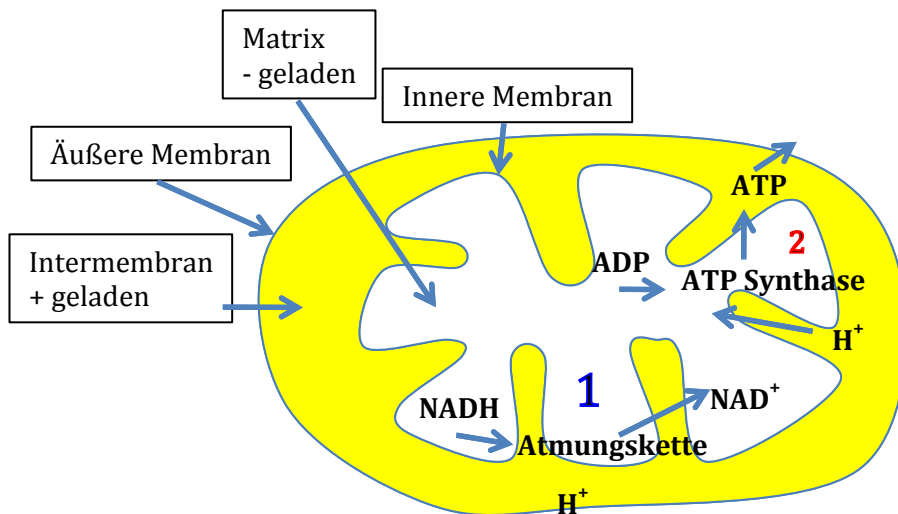


Abb. 5 Ablauf der Energiegewinnung in einem Mitochondrium.

1. Die als Endprodukte aus dem Citratzyklus entstehenden Reduktionsäquivalente $NADH/H^+$ und $FADH_2$ übertragen in mehreren Schritten e^- auf Sauerstoff (Atmungskette). Dabei entstehen Protonen, welche zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles für die ATP-Synthase benötigt werden.
2. Nummer 2 zeigt den Ablauf der ATP-Synthase. Diese erfolgt durch passiven Protoneneinstrom aufgrund der im Inneren der Mitochondrienmembran herrschenden niedrigen H^+ -Konzentration und der im Zwischenraum herrschenden hohen Konzentration. Nach gewisser Zeit würde sich ein Ausgleich einstellen und anstatt Energie zu erzeugen müsste Energie aufgebracht werden um ein Gefälle zu erschaffen.
Diese erforderliche Energie wird über die Atmungskette gestellt. In diesem Kreislauf setzt Thermogenin ein, indem es das benötigte Konzentrationsgefälle verhindert.⁵⁴

1.5.1. UCP2 und UCP3

Die beiden verwandten Transmembranproteine des UCP1, das UCP2 und UCP3 wurden erstmalig 1997 entdeckt. Sie zeigen eine 56 % Ähnlichkeit in der Aminosäureabfolge wie UCP1, untereinander sogar von 73 %.

Im Gegensatz zu Thermogenin ist das UCP2 weit verbreitet. Es präsentiert sich mit einer hohen Syntheserate in der Lunge, der Milz und im WAT. Mit einer mittleren Expression kommt es in den Nieren, den Hoden, im Uterus, im BAT, im Hirn und im Herzen vor. Sehr gering zeigt es sich im Skelettmuskel und in der Leber, wogegen das UCP3 nur im Skelettmuskel und im Fettgewebe vertreten ist. Durch die verwandtschaftlichen Verhältnisse und die Gemeinsamkeiten in der Aminosäureidentität wird von einer Protonentransportfunktion von UCP2 und UCP3 ausgegangen.

Dies konnte in einem Hefeexperiment gezeigt werden, welches ein erniedrigtes Membranpotential zur Folge hatte. Diese Verminderung durch die beiden uncoupling Proteine wurde als eine Entkoppelung im ATP-Atmungskettenkreislauf gewertet, wobei unterschiedliche Mechanismen dafür verantwortlich zu sein scheinen.⁵¹

1.5.2. Einflussfaktoren auf BAT/UCP1-Expression

In den letzten Jahren zeigte sich durch eine Vielzahl veröffentlichter Papers, dass ein Expressionsunterschied des UCP1 und das Vorkommen und die Aktivität von BAT durch bestimmte Faktoren/Einflüsse bewirkt werden können.

Dies konnte v.a. in Tierversuchen an Nagern verdeutlicht werden.

Unter diesen mit einer erhöhten UCP Synthese bewiesenen Ursachen zählt die Kälteexposition, die als thermoregulatorische Kompensation die Hauptfunktion des BAT und seines UCP1 darstellt.⁵⁵

Zu den weiteren Faktoren, welche auch in dieser Studie veranschaulicht und nachgewiesen werden sollen, zählen das Geschlecht, das Alter und der Ernährungszustand einer Person.⁴

1.5.2.1. Kälte

Die Entwicklung von BAT bei Säugetieren war vermutlich evolutionär um das postnatale Überleben und auch das Überleben in Zeiten von nächtlichen oder länger dauernden Kälteperioden zu garantieren.

Bei akuter Kälteeinwirkung kompensiert der Körper die sinkende Körpertemperatur durch Muskelzittern. Dieser aufwendige Thermogeneseprozess kann nur kurzfristig die absinkende Temperatur ausgleichen. Bei langfristiger Kälteexposition muss daher auf eine zitterfreie Wärmeproduktion umgesattelt werden. Dies führt zu einer Steigerung der UCP1-Expression und somit zu einem Anstieg an BAT.

Eine zitterfreie Thermogenese ist im Vergleich zur Wärmeerzeugung durch Muskelzittern energieärmer, wobei der Stoffwechselgrundumsatz im Vergleich zu euthermen Tieren trotzdem deutlich erhöht ist.⁴⁷

Auch die Arbeitsgruppe um Cypess konnte einen Zusammenhang zwischen niedriger Außentemperatur und erhöhtem BAT beim Menschen nachweisen. Hierfür wurden Probanden ausgewählt welche nachweislich BAT enthielten (BAT-Aktivität und Vorkommen wurde mittels PET-Scan bewiesen) und über einen Zeitraum gescannt, um festzustellen, ob es in Bezug auf die Temperatur zu einer erhöhten BAT Aktivität kommt.

Es zeigte sich, dass in den Wintermonaten die BAT-Aktivität am höchsten war und im Sommer am niedrigsten.⁴

1.5.2.2. Noradrenalin

Von den Faktoren die die Synthese von braunen Adipozyten und somit auch UCP1 beeinflussen ist Noradrenalin die wichtigste und meist erforschte Größe. Es dient auf der einen Seite zur akuten Aktivierung der Thermogenese und auf der anderen Seite zur Steuerung der Zellproliferation und Zelldifferenzierung von braunen Fettzellen.⁴⁷

Weiters konnte anhand von Studien mit Patienten, die ein Phäochromozytom aufwiesen, gezeigt werden wie sich die Expression in Bezug auf BAT steigert.

Die Studie rund um Wang et. al. befasste sich mit der Frage welchen Einfluss eine erhöhte Katecholaminkonzentration auf die Aktivität von BAT hat. Es wurden Patienten mit einem diagnostizierten Phäochromozytom und Gesunde mittels 18F-

FDG PET/CT und Metanephrin-Plasmamessung untersucht. Hier stellte sich heraus, dass Patienten mit erhöhten Metanephrinspiegeln im Plasma eine signifikant höhere BAT-Aktivität aufwiesen als gesunde Probanden.

Diese Verbindung wurde weiters von hiesiger Arbeitsgruppe adipösen Patienten verglichen, wobei sich eine dem WAT-Gehalt umgekehrt proportionale Verteilung von BAT herausstellte.⁵⁶

1.5.2.3. Geschlecht/Alter

Mittels PET-Scan konnte in einer Versuchsgruppe gezeigt werden, dass sowohl das Alter als auch das Geschlecht beim Vorkommen von BAT eine Rolle spielten. Die statistische Auswertung konnte eine deutliche Erhöhung von BAT bei Frauen zeigen. Weiters konnte festgestellt werden, dass die Wahrscheinlichkeit von nachweisbarem BAT bei jungen Frauen (Frauen <50 J.) deutlich höher ist im Vergleich zu älteren Männern welche die niedrigste Vorkommensrate von BAT aufwiesen.⁴

1.5.2.4. Ernährungszustand

Die große Gruppe um Cypess stellte nicht nur Korrelationen zwischen dem Alter, dem Geschlecht und der Außentemperatur in Bezug auf BAT her, sondern konnte in einem PET-Scan Versuch auch nachweisen, dass der Ernährungszustand Einfluss hat. So zeigte sich bei der statistischen Auswertung, dass Probanden mit einem hohen BMI (>27,8) weniger BAT-Aktivität aufwiesen als Patienten mit einem BMI <23,5.⁴

Weiters konnten Rothwell und Stock an der Londoner Universität die Existenz und Bedeutung der diät-induzierten Thermogenese nachweisen. Hierbei wurden Nager mit der sogenannten „Cafeteria diet“ überfüttert. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede in der Gewichtszunahme, welche auf Variationen in der Thermogenese hindeuten.

Auch konnte die Arbeitsgruppe auffallende Ähnlichkeiten zwischen der DIT und der zitterfreien Thermogenese feststellen, weswegen ein gemeinsamer metabolischer Ursprung im BAT vermutet wird.⁵⁷

Einflussfaktoren	Bevorzugtes Vorkommen von BAT in Bezug auf die Einflussfaktoren
Alter <50 J. >50 J.	X
Geschlecht männlich weiblich	X
Ernährungszustand BMI <23,5 BMI >27,8	X
Kälte Winter Sommer	X
Höchste Wahrscheinlichkeit	<50 J., Frauen mit einem BMI <23,5, im Winter und bei hohen Katecholamin-Konzentrationen

Tab. 1 Überblick über die Verteilung von BAT in Bezug auf die Einflussfaktoren.

1.6. Erkrankungsgruppen innerhalb der Studie

- Metabolische Erkrankungen
- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Tumorerkrankungen

1.6.1. Metabolische Erkrankungen

Wie im Punkt „Ernährungszustand“ beschrieben, korreliert dieser umgekehrt proportional mit dem über PET-Scan festgestellten Anteil an BAT. Dies würde bedeuten dass Patienten mit einem metabolischen Syndrom im Vergleich zu Probanden mit einem kachektischen Ernährungszustand weniger BAT-Aktivität aufweisen, was auch in Tierversuchen bestätigt werden konnte. Mäuse, welche in thermoneutraler Umgebung gehalten wurden aber eine Deletion im UCP1 Gen aufwiesen, zeigten eine erhöhte Gewichtszunahme.

Weiters konnte ermittelt werden, dass Mäuse, welche große Mengen an BAT besitzen, weniger zu Gewichtszunahme neigen, insulinsensitiver sind, weniger FFS besitzen und vor DM und anderen metabolischen Folgeerscheinungen besser geschützt zu sein scheinen.²⁸ Aus diesen Überlegungen und durch den Umstand, dass die Wahrscheinlichkeit erhöhter Bauchumfangswerte bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom deutlich erhöht sind, wurde die Erkrankungsgruppe „metabolisch“ definiert.

1.6.1.1. Definition des metabolischen Syndroms

Das metabolische Syndrom beschreibt eine Gruppe von Erkrankungen die im Wesentlichen auf einen ungesunden bis krankhaften Lebensstil zurückzuführen sind. Die IDF definiert das metabolische Syndrom durch das Vorliegen eines erhöhten Bauchumfangs (bei Männern >94 cm und bei Frauen >80 cm → zentrale Adipositas) und das Erfüllen von mindestens 2 von 4 weiteren Kriterien.

1. Erhöhung der TGZ über 150 mg/dl oder wenn eine TGZ-senkende Therapie eingeleitet wurde.
2. Erniedrigung des HDL-Wertes, bei Männern unter 40 mg/dl und bei Frauen unter 50 mg/dl oder wenn eine HDL-Cholesterin erhöhende Therapie erfolgt.
3. Bestehender arterieller Hypertonus, systolische Werte >130 mmHg und/oder diastolisch über 85 mmHg oder bestehende antihypertensive Therapie.
4. Erhöhter Nüchtern-Glukosewert über 100 mg/dl oder ein diagnostizierter DM II.⁵⁸

Die Kriterien eines metabolischen Syndroms werden von den einzelnen Organisationen unterschiedlich definiert und charakterisiert, allen gemeinsam sind ihnen aber: Adipositas, Hypertonus, DM und Hypercholesterinämie.⁵⁹

1.6.2. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Aufgrund der Häufigkeit kardiovaskulärer Erkrankungen innerhalb der Allgemeinbevölkerung wurden diese möglichen Einflussfaktoren in die vorliegende Studie aufgenommen.

Dieser Faktor soll die Hypothese einer möglichen Korrelation zwischen BAT und Erkrankungen aus dem kardiovaskulären Formenkreis formulieren und gleichzeitig als weiterer Vergleichsfaktor mit dem viel beschriebenen Einflussfaktor „Körpergewicht“ dienen.

1.6.2.1. Definition der kardiovaskulären Erkrankungen

Unter kardiovaskulären Erkrankungen wird eine Gruppe von Erkrankungen/Symptomen zusammengefasst, deren Genese auf kardialer und/oder vaskulärer Ebene beginnt.

Generell versteht man unter dieser Erkrankungsgruppe Folgeerkrankungen der Atherosklerose:

- **pAVK**
- **KHK**
- **MI**
- **Insult**

Risikofaktoren

Diese Risikofaktoren bestehen nicht für sich alleine sondern verstärken sich und erhöhen die Wahrscheinlichkeit von Folgeerkrankungen. Je mehr negative Faktoren bestehen, desto höher ist die Eintrittswahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Zwischenfälle.

Klasse I

Diese Klasse umfasst Risikofaktoren, welche mittels therapeutischer Beeinflussung das Risiko auf kardiovaskuläre Erkrankungen senken oder bei welchen eine eindeutige Korrelation mit kardiovaskulären Erkrankungen nachgewiesen wurde.

Hierzu zählen die arterielle Hypertonie, chronischer Nikotinkonsum und die Hypercholesterinämie.

Klasse II

Bei dieser 2. Gruppe sinkt durch Behandlung die Wahrscheinlichkeit auf Herz-Kreislaufkrankungen.

In diese Klasse fallen als Risikofaktoren: der DM, ein niedriges HDL-Cholesterin, mangelnde körperliche Betätigung und hohe TGZ-Werte.

Klasse III und IV

In die Klasse 3 werden Faktoren gezählt, welche einen möglichen negativen Einfluss zeigen, bei denen aber der Beweis eines positiven Verlaufs im Falle der Abwesenheit dieser Faktoren noch nicht erwiesen wurde.

Zu diesem Punkt werden Homocystein- und Lp(a)-Erhöhungen gezählt. Die 4. Klassifikation beinhaltet nicht beeinflussbare sich negativ auswirkende Faktoren, wie z.B. erhöhtes Alter und das männliche Geschlecht.

1.6.2.2. Score-System

Es gibt eine Vielzahl von Score-Systemen, welche die Wahrscheinlichkeit eines kardiovaskulären Ereignisses mittels epidemiologischer Daten berechnen.

In Österreich ist der am meisten verbreitete der PROCAM-Score. Er errechnet das Risiko eines Myokardinfarktes in den nächsten 10 Jahren.

Risiko	Beschreibung	Punkte
Alter	35-39 J.	0
	40-44 J.	6
	45-49 J.	11
	50-54 J.	16
	55-59 J.	21
	60-65 J.	26
Positive Familienanamnese	Ja	4
	Nein	0
Nikotinkonsum	Ja	8
	Nein	0
DM	Ja	6
	Nein	0
Systolischer RR (mmHg)	<120	0
	120-129	2
	130-139	3
	140-159	5
	>159	8
HDL-Cholesterin (mg/dl)	<35	11
	35-44	8
	45-54	5
	>54	0
LDL-Cholesterin (mmol/l)	<100	0
	100-129	5
	130-159	10
	160-189	14
	>189	20
TGZ (mmol/l)	<100	0

	100-149	2
	150-199	3
	>199	4
Risikoberechnung:	Pkt.	Wahrscheinlichkeit eines MI in den nächsten 10 J. (%)
	0-13	<0,5
	14-19	0,5-1
	20-26	1-1,7
	27-35	1,8-4
	36-41	4,2-7
	42-50	7,4-15,5
	51-58	16,8-28

60

Tab. 2 PROCAM-Score

1.6.3. Tumorerkrankungen

Angesichts der häufig vorkommenden Komplikation eines kachektischen Zustandsbildes (über 50 % der malignen Tumorerkrankungen)⁶¹ aufgrund von malignen Tumorerkrankung wurde diese chronische und häufig zum Tode führende Erkrankung unterschiedlicher Genese in die Patientengruppen aufgenommen.

Weiters soll sie als Vergleichsgruppe zur metabolischen und kardiovaskulären Gruppe in Bezug auf den Bauchumfang als viel diskutiertem und diagnostisch nachgewiesenem Einflussfaktor für BAT dienen.

1.6.3.1. Definition des Begriffes „Tumor“

Ein Tumor beschreibt im eigentlichen Sinn nur eine Vergrößerung eines Organs oder eines Organteils. Diese Definition gibt noch keine Auskunft über die Eigenschaften der Schwellung (benigne/maligne). Erst die Dignitätsbeurteilung von Tumoren kann Informationen über die möglichen Folgen und den Verlauf geben. Maligne Tumoren zeigen ein invasives und destruktives Wachstum mit Metastasierungstendenz.

1.6.3.2. Folgen/Komplikationen maligner Tumoren

Um die Ausbreitung und damit auch die möglichen Folgen/Komplikationen und auch die Therapien zu bestimmen werden maligne Tumore nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Diese internationale Einteilung beschreibt das spezifische Wachstum (lokal/systemisch), die Metastasierung und die Differenzierung für jede Tumorart.

Aber nicht nur durch Absiedelungen neoplastischer Zellen und lokale Zerstörung können Neoplasien Schaden anrichten, sondern auch durch das sogenannte paraneoplastische Syndrom, zu dem auch die in dieser Studie genutzte Tumorkachexie gezählt wird.⁶⁰

1.6.3.3. Tumorkachexie

Aufgrund der vielgefürchteten Komplikation einer Tumorkachexie, die nicht nur eine zusätzliche Belastung für den Patienten darstellt, sondern auch die Behandlung nachweislich negativ beeinflusst, sterben jährlich ca. 2 Millionen Menschen weltweit an den Folgen und Komplikationen einer tumorbedingten Kachexie. Sie präsentiert sich beim Erwachsenen durch einen chronischen Gewichtsverlust, welcher sich im Vergleich zum Fettgewebe als verstärkter Abbau von Muskelmasse auswirkt.⁷⁵ Die Ursachen der Tumorkachexie sind bis heute noch nicht vollends aufgeklärt, einen Ansatz für den Hypermetabolismus lieferte die Gruppe rund um Sherlock. Diese stellte die Hypothese auf, dass ein Teil des Gewichtsverlustes von einer BAT-Aktivierung verursacht werden könnte. Aus diesem Grund untersuchten Sherlock et. al. mikroskopisch Nebennieren-Gewebe von verstorbenen Patienten mit und ohne Tumornachweis. Es stellte sich eine deutlich erhöhte Prävalenz von BAT bei tumorkachektischen Patienten heraus, im Vergleich zu Probanden welche an einer anderen Todesursache verstorben waren.⁶²

Häufigsten Komplikationen	Pathophysiologie	Tumorart
Tumorkachexie	Interaktionen von Stoffwechselprodukten →Lipolyse, Proteolyse, erhöhter	Jede, v.a. Pankreas, Magen- Darm-Ösophagus-und

	Energieverbrauch	Bronchuskarzinome.
Fieber	Direkte oder indirekte Sekretion von Zytokinen → TNF, IL	v.a. Lymphome, Nierenzellkarzinome
Neuromuskuläre Syndrome	Neuropathien, ALS, Myasthenia gravis	Thymome, Bronchialkarzinom
Hämatogene Syndrome	<ul style="list-style-type: none"> Erythrozytose → Erythropoetinprod. Granulozytose, Thrombozytose 	z.B. Nierenzell- hepatozelluläre Karzinome
Kutane Syndrome	Produktion von Wachstumsfaktoren → seborrh. Keratose, Acanthosis nigr.	Diverse maligne Tumoren
Endokrine Syndrome	<ul style="list-style-type: none"> Cushing → ACTH Sekretion Antidiurese → ADH Sekretion Hypoglykämie → Insulin Sekretion 	<ul style="list-style-type: none"> Bronchialkarz. neuroendokrine T. GI-Tumoren Prostatakarz.

63

Tab. 3 Häufigste paraneoplastische Komplikationen

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Im Zuge der klinisch-pathologischen Obduktionen am Institut für Pathologie am LKH Graz wurde diese retrospektive Autopsiestudie vom 14.02.2011-28.09.2011 realisiert. Innerhalb dieses Zeitraums wurden Proben unter Aufsicht des diensthabenden Pathologen aus definierten Arealen bei 41 routinemäßig zu obduzierenden Patienten, welche den Einschlusskriterien entsprachen, entnommen.

Um diese zuvor bestimmten Entnahmestellen einheitlich zu halten, wurde eine Testentnahme vollzogen. Hierbei wurden mit Unterstützung eines anatomisch geschulten Kollegen die zu entnehmenden Stellen identifiziert, überprüft und präpariert. Jede determinierte Lokalisation wurde paarig entnommen, um diese sowohl zu kryokonservieren als auch in Formalin zu fixieren. Die in Formalin korrespondierenden Proben wurden anschließend in Paraffin gebettet, um nachfolgend histologisch und bei Bedarf auch immunhistochemisch beurteilt und analysiert zu werden.

Zu Beginn wurden die zu untersuchenden histologischen Präparate in einem Überblick auf Vorkommen von BAT begutachtet. Im Anschluss fand eine Detailbeschreibung und eine Berechnung des Gehaltes an BAT statt.

Anhand dieser histologischen Auswertung wurden auf BAT verdächtige Proben immunhistochemisch auf UCP1 hin verarbeitet und untersucht.

Mittels histologischer und immunhistochemischer Auswertung, die sich auf das in BAT produzierte UCP1 stützt, konnte ferner eine statistische Auswertung erfolgen, welche die gewonnenen Ergebnisse mit den Hypothesen in Einklang zu bringen versuchte.

2.2. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv beinhaltete grundsätzlich Patienten zwischen 0 und 100 Jahren, unabhängig von ihren Grunderkrankungen und ihrer Todesursache.

Es ergab sich innerhalb der 7-monatigen Probensammlung ein Sterbealter zwischen 15 und 100 Jahren.

Das Durchschnittssterbealter betrug 65,02 Jahre.

Von den 41 obduzierten Patienten waren 26 männlich und 15 weiblich, wobei das Todesdurchschnittsalter der Männer bei 60,88 Jahren lag und das der Frauen bei 72,20 Jahren.

Vor jeder Probenentnahme wurden die Patienten vermessen, um anhand dieser Daten eine Aussage über die Fettverteilung geben zu können. Aus diesem Grund wurde bei jedem Probanden die Körpergröße und der Bauchumfang ermittelt.

(Das Gewicht konnte aufgrund einer fehlenden Waage im Obduktionssaal nicht berechnet werden und wurde durch den diensthabenden Arzt geschätzt. Aus diesem Grund fließt das Gewicht in die epidemiologischen Datensammlungen und in die statistischen Auswertungen nicht ein).

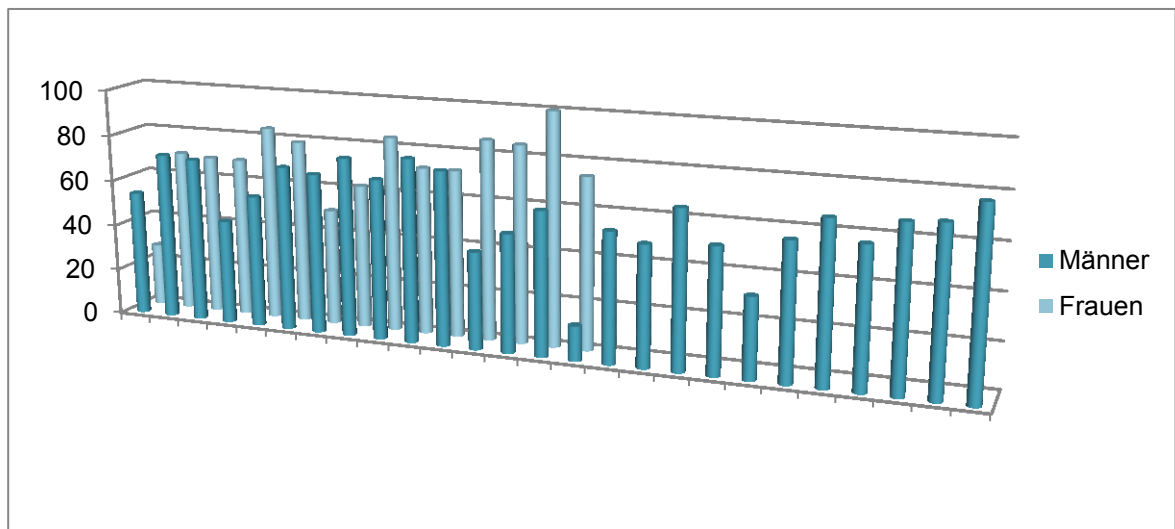


Abb. 6 Geschlechterspezifische Darstellung des Sterbealters der 41 obduzierten Patienten.

2.2.1. Patientengruppen allgemein

Anhand der epidemiologischen Daten aller Studienteilnehmer und dem Verdacht auf relevante Unterschiede in Bezug auf kardiovaskuläre metabolische und Tumorerkrankungen, wurde das Patientenkollektiv eingeteilt. Aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Gruppen fand die Zuordnung mittels festgelegter Kriterien und Hauptkriterien für die einzelnen Gruppen statt.

2.2.1.1. Hauptkriterien zur Zusammensetzung der Patientengruppen

Diese 4 unten stehenden Hauptkriterien gelten als Grundgerüst für die Einteilung der Patienten in die einzelnen Gruppen. Die Reihenfolge gibt den Stellenwert an.

1. Sobald eine maligne Neoplasie nachgewiesen wurde, fiel der Patient automatisch in die Tumorgruppe unabhängig von etwaigen Begleiterkrankungen und der Todesursache.
2. Bei einem diagnostizierten DM und erhöhten Bauchumfangswerten wurde die Testperson in die metabolische Gruppe gerechnet, unabhängig von kardiovaskulären Erkrankungen, da diese als Folge des metabolischen Syndroms betrachtet werden können.
3. Sollte ein Proband in alle drei Hauptgruppen gezählt werden können gilt Regel Nummer 1.
4. Sollte ein Patient in keine Gruppe eingeteilt werden können fällt er in die Einteilung „divers“

Gruppen	Anzahl	Männer	Frauen
Tumorgruppe	12	9	3
Metabolische Gruppe	8	3	5
Kardiovaskuläre Gruppe	17	12	5
Gruppe divers	4	2	2

Tab. 4 Verteilung der Patientenpopulation innerhalb der Gruppen

2.2.2. Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen

2.2.2.1. Allgemein

In diese Gruppe fielen alle Patienten die zu Lebzeiten an einer kardiovaskulären Erkrankung gelitten haben oder daran gestorben sind und nicht in die Tumor- oder metabolische Gruppe eingeordnet werden konnten. Weiters wurden Testpersonen zugeteilt, bei denen ein Hypertonus bestand und/oder bei denen unter der

Obduktion eine Atherosklerose Grad 3 diagnostiziert werden konnte, aber keine eindeutigen kardiovaskulären/metabolischen oder Tumorerkrankungen auffindig gemacht werden konnten.

Der Nachweis dieser kardiovaskulären Erkrankungen erfolgte anhand der Krankenakten. Dies bedeutet, dass Patienten welche in diese Gruppe eingeordnet wurden, entweder an einer KHK, einer pAVK (nicht-metabolischer Genese) gelitten haben und/oder einen MI/Insult erlitten haben.

Eine Kombination aus allen Faktoren ist möglich.

2.2.2.2. Patientenspezifisch

Atherosklerose-Graduierung

Die Einteilung der Atherosklerose in Grad 1-3 in der unten stehenden Tabelle fand anhand der makroskopischen Beurteilung der Aorta während der Obduktion statt.

Grad 1: fatty-streaks

Bei den fatty-streaks handelt es sich um sogenannte Lipidflecken, welche ab dem ersten Lebensjahr nachweisbar sind und bevorzugt in der Aorta vorkommen. Sie gelten als reversibel, wobei sie bis zum 30. Lebensjahr bis zu 50 % der Aortenintima befallen können. Makroskopisch erkennt man sie als streifige, nicht erhabene, subendotheliale, gelbliche Fettablagerungen.

Grad 2: fibröse-Plaques (Atherom)

Unter fibrösen Plaques versteht man eine fortschreitende Läsion, welche sich bevorzugt in der Aorta abdominalis zeigt. Zu finden sind diese Atherome ab der 3. Lebensdekade und sie nehmen ab diesem Zeitpunkt an Größe und Häufigkeit stetig zu. Makroskopisch identifiziert man sie als weißliche, beetartige Herde unterschiedlicher Größe. Im Zentrum größerer Plaques sind breiartige Kerne sichtbar.

Grad 3: komplizierte-Läsionen

Die schwerste und komplikationsreichste Ausprägung der Atherosklerose ist die komplizierte Läsion. Sie kann Ursache von parietalen Thromben oder Embolien sein und so zu höhergradigen Stenosierungen bis hin zur Obliteration führen. Diese sekundären Läsionen entstehen durch Verkalkung oder Aufbruch eines Atheroms. Die Maximalvariante der Grad 3 Läsionen ist die sogenannte Porzellanaorta.⁶⁴

Nr.	m/ w	Alter	Bauch= umfang	Atheroskl. (1-3)	HT	Grundleiden	Todesursache
3	m	72	92	3	Ja	NINS, Z.n. 3-fach Bypass, card. Dekompensation	Rezid. MI
5	m	71	84	3	X	Bullöses Emphysem, COPD, Z.n. Lobektomie	Rechtsherz= dilatation
8	w	69	107	3	Ja	AOST operiert, Ileus	MI
13	w	50	79	2	X	Alkoholabusus, Aszites, Emphysem, Pankreatitis	MI
14	m	69	106	2	X	KHK, nach LAD Stent implantation→Mesenterialinfarkt	MOV, Herz- Kreislaufstillstand
16	m	69	105	3	X	Z.n. HTX, NINS, V. cava Thrombose	MOV
18	w	84	110	3	X	Mediainfarkt, NINS, Pneumonie	Pneumonie, Herz- Kreislaufstillstand
20	m	75	110	2	Ja	Cor hypertonicum, globale Herzdilatation, ruptur. AO. Aneurysma	Blutungsschock Z.n. AO. Aneurysma,
22	m	42	95	2	X	Mediainfarkt	Hirnödem, Rechtsherzdilatation
23	m	51	100	3	Ja	Cor hypertonicum	Kleinhirnfarkt
28	w	86	92	3	Ja	Operiertes AOST	Herzdilatation
30	m	52	80	3	Ja	Z.n. Lebertransplant.→ zunehmende Cholestase	MOV
32	w	100	76	3	Ja	Hämorrhagisch eitrige Pyelonephritis	Urosepsis
34	m	35	95	1	Ja	Dilat. CMP→Z.n. HTX→Sepsis	Sepsis
35	m	59	96	2	Ja	Z.n. MI,	MOV
38	m	70	97	3	Ja	Z.n. Bypass-OP, HI	MI
41	m	80	74	3	Ja	Verwirrtheit, Schwäche re.	Hirnmassenblutung

Tab. 5 Patienten der kardiovaskulären Gruppe

2.2.3. Gruppe der metabolischen Erkrankungen

2.2.3.1. Allgemein

Patienten (n=41), welche nachweislich die Kriterien der Diagnose metabolisches Syndrom (siehe Definition „metabolisches Syndrom“) erfüllen oder gemäß dem oben genannten Hauptkriterium dem metabolischen Syndrom zugeordnet werden konnten, wurden in diese Gruppe eingeteilt.

Diese Faktoren wurden mittels Messung des Bauchumfangs und der Größe gezielt ermittelt. Weiters wurde in den Vorerkrankungen nach einem nachgewiesenen DM I oder II und/oder einem Hypertonus gesucht.

2.2.3.2. Patientenspezifisch

Die in der Tabelle 6 näher beschriebenen 8 Probanden sind eindeutig der metabolischen Gruppe zuzuordnen, da sie nicht nur an einem DM Typ I oder II gelitten haben sondern auch erhöhte Bauchfettwerte aufwiesen und zu Lebzeiten Hypertoniker waren.

Somit erfüllen sie die Hauptkriterien eines metabolischen Syndroms.

Nr.	Alter	m/ w	Größe	Bauch= umfang	DM	HT	Grundleiden	Todesursache
4	70	w	165	99	II	Ja	Pneumonie, ARDS	MOV, MI
6	69	w	170	124	II	Ja	Atherosklerose	Herzdilatation
7	45	m	180	97	I	Ja	Nekrotisierende Faszitis, Ikterus	MOV, Insult
11	79	w	175	76	II	Ja	KHK	Rezid. MI
26	72	w	162	120	II	Ja	GÖR, Hp-Gastritis, Z.n. Hüft-OP	Asystolie
29	85	w	163	102	II	Ja	Serienrippen #→Endo-Perikarditis	Herzdilatation
31	68	m	178	95	II	Ja	MINS, NINS, dilat. CMP	Rezid. MI
37	60	m	178	119	II	Ja	Atherosklerose, MI	Stammhirninfarkt

Tab. 6 Patienten der metabolischen Gruppe

2.2.4. Gruppe der Tumorerkrankungen

2.2.4.1. Allgemein

In die Gruppe der Tumorerkrankungen wurden Probanden eingeordnet die eine diagnostizierte Neoplasie hatten, unabhängig von der Tumorart oder der Todesursache. Die Einteilung folgte dem 1. Hauptkriterium.

2.2.4.2. Patientenspezifisch

Aufgrund zusätzlicher für die Bewertung relevanter Details wurde der unter Patient Nr.1 geführte Proband genauer besprochen.

Er zeigte bei der Obduktion eine massive Metastasierung der Leber und beider Lungenflügel. Wegen ausgeprägte Lebermetastasen (Lebergewicht: 7 kg) wurde die Bauchumfangsmessung als nicht aussagekräftig bewertet. Der Patient präsentierte sich trotz hoher abdomineller Werte kachektisch.

Nr.	Alter	m/ w	Bauch= umfang	Größe	Grundleiden	Todesursache
1	54	m	95	180	Sigmakarzinom	Tumorprogression
9	57	m	81	180	Burkit-Lymphom	CMV-Pneumonie, ARDS
10	84	w	97	170	Lungenkarzinom	Tumorprogression
12	71	m	78	175	Bronchuskarzinom	Herz-Kreislaufstillstand
15	77	m	118	180	Dickdarmkarzinom	Asystolie bei kardiogenem Schock
17	62	w	94	173	Mammakarzinom	Respiratorische Insuffizienz
19	79	m	80	175	CLL	Globale Herzdilatation
24	62	m	75	176	HCC	Peritonitis/Sepsis
27	56	m	82	178	Bronchuskarzinom	Asystolie bei kardiogenem Schock
33	54	m	97	170	Retroperikard. Sarkom	Linksherzdilatation
39	74	w	120	160	Nierenzellkarzinom	MI
40	71	m	80	178	Mediastinaler Tumor	Rechtsherzdilatation

Tab. 7 Patienten der Tumorgruppe

2.2.5. Gruppe divers

2.2.5.1. Allgemein

Da nicht alle Probanden den oben definierten Gruppen zugeordnet werden konnten fielen Patienten welche in keine der zuvor bestimmten Gruppen passten und auch nicht mittels der Hauptkriterien eingeteilt werden konnten in die Unterteilung „divers“ (2 junge und 2 ältere Teilnehmer).

2.2.5.2. Patientenspezifisch

1. Patient divers

Dem 15-jährigen Patienten wurde in dieser Studie die Nummer 25 zugeordnet. Er verstarb an einem Multiorganversagen infolge eines Mopedunfalls. Er zeigte keine Vorerkrankungen laut Patientenakte, zum Zeitpunkt der Obduktion hatte der Proband einen Bauchumfang von 90 cm, wobei sich bei der nachfolgenden Obduktion ein deutlicher Aszites zeigte, wodurch der gemessene Bauchumfang nicht dem tatsächlichen Wert entsprach. Die Messung der Körpergröße ergab 178 cm bei einem geschätzten Gewicht von 75 kg. Aufgrund dieser Messwerte und der epidemiologischen Daten konnte der Patient keiner der oben genannten Gruppen zugeteilt werden.

2. Patient divers

Die 2. Patientin die in die Kategorie „divers“ fällt ist die Probandin mit der Nummer 2, mit einem Sterbealter von 27 Jahren. Sie kam bei einem Verkehrsunfall durch Polytrauma zu Tode. Zum Obduktionszeitpunkt wurde ein Bauchumfang von 77 cm bei einer Körpergröße von 175 cm gemessen. Vorerkrankungen konnten nicht eruiert werden.

3. und 4. Patient divers

Die 2 älteren Patienten, eine 72-jährige Frau und ein 69-jähriger Mann, konnten aufgrund fehlender tumoröser, metabolischer und kardiovaskulärer Genese nicht in eine dieser Gruppen eingeteilt werden.

Der im Alter von 72 Jahren an einer unstillbaren Ösophagusvarizenblutung verstorbenen Frau wurde die Nummer 21 in der Gesamtpopulation zugeteilt. Als Grunderkrankungen konnten eine Leberzirrhose nach langjährigem Alkoholabusus und eine Thrombopenie ermittelt werden. Vor der Obduktion konnte ein Bauchumfang von 95 cm bei einer Körpergröße von 165 cm ermittelt werden. Unter der Autopsie stellte sich eine Rechtsherzdilatation, eine Linksherzhypertrophie und eine Atherosklerose Grad 2 heraus.

Der 69-jährige Mann verstarb an einem SHT infolge eines häuslichen Sturzes. Die Todesursache wurde als Hirnmassenblutung vermerkt. In seiner Vorgeschichte konnten keine Anzeichen eines Hypertonus oder einer KHK nachgewiesen werden. Auch wurden keine makroskopischen Zeichen eines durchgemachten MI oder Infarcts entdeckt. Die Vermessung ergab einen Bauchumfang von 96 cm bei einer Größe von 182 cm. Die Obduktion zeigte eine massive Hirnblutung und eine Atherosklerose Grad 2, welche für eine Einteilung in die kardiovaskuläre Gruppe nicht ausreichte.

2.2.6. Ein- und Ausschlusskriterien

In diese retrospektive Studie wurden alle Patienten aufgenommen die am Institut für Pathologie im LKH Graz routinemäßig obduziert wurden und deren Verwesungszustand eine Probenauswertung zuließ (Dies war nicht vom Sterbezeitpunkt abhängig sondern von den Fäulniszeichen zum Zeitpunkt der Beschauung).

Auflistung	Einschlusskriterien
Alter	Zwischen 0 und 100 Jahren
Geschlecht	Männer und Frauen
Grunderkrankungen	alle
Todesursache	alle
Obduktion	Routineobduktion
Lagerung/Zeit	Kühl, ohne Fäulniszeichen

Tab. 8 Darstellung der Einschlusskriterien

2.2.7. Epidemiologische Daten

Zur Beurteilung und statistischen Auswertung wurden folgende epidemiologischen Daten der Studienteilnehmer erfasst:

- Der Vor- und Nachname wurde aus Datenschutzgründen durch fortlaufende Nummerierung ersetzt
- Geburtsdatum
- Sterbedatum
- Obduktionsnummer
- Geschlecht
- Grunderkrankungen
- Todesursache
- Vorerkrankungen

2.2.8. Klinische Parameter

Die klinisch für diese Studie relevanten Parameter wurden der computerunterstützten Krankenakte (Medocs) entnommen.

Bei diesen Parametern handelt es sich um bestehende Vorerkrankungen und Grunderkrankungen, welche für die Gruppeneinteilung und die daraus resultierende Zuordnung von Bedeutung sind.

2.2.9. Datenschutz

Auf Grund des Datenschutzes und der ärztlichen Schweigepflicht werden alle in die Studie eingeschlossenen Patienten in keiner Weise namentlich erwähnt, sondern mittels einer fortlaufenden Nummerierung erfasst um so die Anonymisierung zu gewährleisten. Zur weiteren Sicherung werden die Codierung und die dazugehörigen Daten auf einem PC mit Zugriffsbeschränkung an der Abteilung für Pathologie gespeichert.

Der Zugriff auf die Originaldaten ist nur autorisierten Personen des Institutes und Studienmitarbeitern gestattet.

2.2.10. Nutzen-Risiko-Evaluierung

Da sich das Patientenkollektiv aus bereits verstorbenen Probanden zusammensetzt ergibt sich für die aufgenommenen Patienten kein Nutzen aus dieser Studie. Da es sich um eine retrospektive Studie und Auswertung von Daten handelt ist natürlich auch kein Risiko für die Studienteilnehmer zu erwarten. Der einzig mögliche negative Effekt wäre das Bekanntwerden der sensiblen Patientendaten. Dieses Risiko wird durch die Pseudoanonymisierung und Zugriffsbeschränkung der sensiblen Daten minimiert.

2.3. Studienablauf

2.3.1. Obduktion

Die klinisch-pathologischen Routineobduktionen am Institut für Pathologie erfolgten wenn erforderlich am Vormittag des jeweiligen Tages. Der zu obduzierende Patient wurde vom zuständigen Prosekturgehilfen eröffnet.

Die dem Leichnam entnommenen Organe wurden anschließend ordnungsgemäß vom diensthabenden Pathologen obduziert, makroskopisch untersucht und relevante sowie Standardproben zur mikroskopischen Begutachtung entnommen. Nach Beendigung der adäquaten, routinemäßig durchgeführten Obduktion wurden für die Autopsiestudie Proben an zuvor festgelegten Stellen der Körperhülle entnommen.

Diese Proben wurden ohne Schaden oder Auffälligkeiten an der Leiche zu hinterlassen entnommen.

2.3.2. Entnahmestellen

Die für die Studie notwendigen Proben wurden vor Entnahme des Situs thoracis und Situs abdominis vom Patienten entnommen. Pro Patient wurden insgesamt 14 Proben entnommen (6 je links und rechts und 2 für die Gegenprobe).

Wie im Kapitel „Anatomische Regionen von BAT beim Erwachsenen“ dieser Arbeit zu entnehmen, wurden die anatomischen Bereiche genau festgelegt, um analoge Probestellen zu gewährleisten. Dies heißt, dass pro Proband 4 Proben zervikal-supraclaviculär entnommen wurden, 4 im Bereich des Plexus brachialis, 4

paraspinal und 2 Proben aus dem peripheren Bauchfett. Daraus resultiert nach 7-monatiger Probensammlung eine Anzahl von 574 entnommenen Proben. Diese annähernd 600 Proben wurden zu einem Teil in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und zum anderen Teil kryokonserviert.

Entnahmestellen	Anzahl
Zervikal-supraclaviculär	4
Plexus brachialis Region	4
paraspinal	4
Peripheres Bauchfett	<u>2</u>
	14
Probanden	41
Proben insgesamt	<u>574</u>
Kryokonservierung + FFPE	287 + 287

Tab. 9 Überblick über die Proben-Entnahmestellen

2.3.3. Kryokonservierung

Wie aus der obigen Tabelle zu entnehmen wurden im Laufe dieser Studie 287 Proben kryokonserviert.

Nach jeder Entnahme wurde jede von den 14 pro Patient entnommenen Proben zu einem Teil kryokonserviert und zum anderen Teil in Formalin fixiert.

2.3.3.1. Für die Kryokonservierung benötigte Materialien

- Kryo-Röhrchen mit Barcode
- Dewar-Gefäß
- Flüssiger Stickstoff im Behälter
- Handschuhe
- Glasbehälter
- Methylbutan
- Pinzette
- Skalpell

2.3.3.2. Probenausarbeitung

Ein Teil des in einem vorgesehenen Behälter transportierten flüssigen Stickstoffs wurde in ein Dewar-Gefäß gegossen. In dieses Gefäß wurde ein mit Methylbutan gefüllter Glasbehälter gestellt. Dieser blieb, bis sich an dessen Boden Eisareale bildeten. Die zu kryokonservierenden Proben wurden währenddessen präpariert, um in die mit einem Barcode versehenen Kryo-Röhrchen zu passen. Anschließend wurde das Gewebstück in den Behälter mit Methylbutan getaucht, wo es augenblicklich gefror und dann in das Kunststoffröhrchen gegeben werden konnte.

Der auf dem Röhrchen stehende Barcode wurde auf das Protokollblatt des jeweiligen Patienten eingetragen.

Das in der gefrorenen Probe enthaltene Röhrchen wurde in den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter gelegt.

Nach Abschluss aller 7 zu kryokonservierenden Proben eines Probanden wurde der Transportbehälter von einem Mitarbeiter der Biobank abgeholt, um in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Lagerungstank verwahrt zu werden.

Dieser Vorgang wurde bei allen 287 Proben gleich durchlaufen.⁶⁵

2.3.4. FFPE

Wie im Kapitel „Kryokonservierung“ beschrieben wurden 287 Proben mittels flüssigen Stickstoffs verarbeitet. Die restlichen 287 präparierten, korrespondierenden Gewebeproben wurden nach jeder Probenentnahme in Formalin fixiert. Für den Vorgang der Formalinfixierung wurde eine 4 % gepufferte Formaldehydlösung verwendet, im Verhältnis 1:10. Die präparierten Gewebeproben wurden in eine zuvor beschriftete Einbettungskassette für Weichgewebe gelegt und nachfolgend in die oben beschriebene Formalinlösung gebettet.

Die Beschriftung der Gewebskassetten erfolgte wie folgt:

- rechts oben korrespondierender Kryobarcod
- links oben Datum der Fixierung
- rechts unten Entnahmestelle
 - A: rechts zervikal
 - B: links zervikal
 - C: rechts Plexus brachialis
 - D: links Plexus brachialis
 - E: rechts paraspinal
 - F: links paraspinal
 - G: zentrales Bauchfett
- links unten Obduktionsnummer

Diese in Formaldehyd eingelegten Kassetten wurden im Anschluss in das histopathologische Labor zur Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihen gebracht. Am Folgetag konnten die nun entwässerten Proben in Paraffinblöcke gegossen werden.

Die vorbehandelten in einer Gewebskassette gelagerten Proben wurden nach erfolgter Entwässerung an einer Paraffinausgießstation zu Paraffinblöcken gegossen.

Diese Ausgussstationen bestehen aus einer Kühlplatte auf welche die ausgegossenen Paraffinblöcke zur Kühlung gestellt werden können, einem Behälter, welcher die verschieden großen metallischen Ausgussformen enthält, einem Paraffinvorratsbehälter, einem fließgeschwindigkeitsregulierbaren Paraffinhahn und einer erwärmbaren Pinzette.

Im ersten Schritt wurde der Deckel der Kassette entfernt.

Im Anschluss wurde die Probe mit der vorgesehenen Pinzette mittig in die Ausgussform manövriert und die beschriftete Kassette auf die Ausgussform gestellt. Im nächsten Vorgang wurde die Metallform mit dem Gewebe mit flüssigem Paraffin gleichmäßig und langsam angefüllt.

Zum Schluss wurde dieses Gebilde auf die gefrorene Kühlplatte gestellt, bis die fertigen Paraffinblöcke ausgekühlt und aus der Form gegeben werden konnten.

In dieser Form sind die paraffinierten Objekte unbegrenzt halt- und färbbar.

Die erkalteten Blöcke wurden in der Folge von Mitarbeitern des histologischen Labors mittels Mikrotom geschnitten, auf einen Objektträger aufgezogen und mit HE-Färbung angefärbt.

2.3.5. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode um die Anwesenheit und die Lokalisation von Proteinen in Gewebsschnitten bestimmen zu können.⁶⁶ Die wichtigste Substanz in diesem Verfahren ist der gegen ein Gewebeantigen gerichtete Antikörper (Primärantikörper). Bei diesem handelt es sich um einen polyklonalen AK, welcher eine bestimmte Spezifität aufweist und beliebig reproduziert werden kann.⁶⁷

Die IHC dieser retrospektiven Autopsiestudie benutzte die indirekte Methode zum Nachweis von UCP1.

Schnitte, welche in der histologischen Beurteilung ein BAT-Vorkommen zeigten, wurden aus denselben Paraffinblöcken für die IHC geschnitten, um bei der immunhistochemischen Begutachtung eine Analogie zur histologischen zu schaffen.

2.3.5.1. Einzelschritte bei der IHC

Schritt 1

Die Paraffinblöcke wurden auf -20° abgekühlt und mit dem Mikrotom in 3-4 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden in einem Kaltwasserbad (20°) aufgefangen, anschließend in ein Heißwasserbad (45°) gelegt, um glatt und mittig auf einen für die Immunhistochemie geeigneten Objektträger aufgezogen zu werden. Nach diesem Vorgang wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und erst am nächsten Tag in einem Brutschrank, bei 60° für 30 Min., erwärmt.

Schritt 2

Das Entparaffinieren begann, indem die Schnitte in einen Objektträgerhalter eingeordnet und einmal 10 Min. sowie einmal 5 Min. lang in Xylol einstellt wurden. Das Xylol entfernte das Paraffin, welches für die Konservierung und die

Schnittanfertigung benötigt wurde. Um das Lösungsmittel aus den Schnitten zu entfernen wurden die Proben mit absteigender Alkoholreihe entwässert, indem sie zweimal 3 Min. lang in 100 %igem Ethanol, einmal 3 Min. lang in 70 %igem und zuletzt einmal 3 Min. lang in 50 %igem Ethanol eingestellt wurden.

Der Vorgang wurde beendet durch das Einstellen der Schnitte, für 3 Min. in Aqua dest.

Schritt 3

In einem Druckkochtopf wurden die Proben mit Natrium-Citratpuffer (pH 6.0, 0.01 M), für 2 Min. und 50 Sec. bei 120° vorbehandelt und anschließend 20 Min. lang abgekühlt.

Der Natrium-Citratpuffer diente der Renaturierung demaskierter Proteine die durch die Fixierung entstehen können.

Schritt 4

Um die im Gewebe natürlich vorkommende Enzymaktivität zu blockieren (endogene Peroxidase) wurden die Proben in 1 %igem H₂O₂ in Methanol für 15 Min. eingestellt und dann, dreimal für 5 Min., mit PBS gespült.

Schritt 5

Bei diesem Schritt wurde der 1. AK (Anti UCP1), welcher mit dem Antibody Diluent (Dako S2022) im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde, auf die vorbereiteten Schnitte aufgetragen, anschließend bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert und dann dreimal 5 Min. lang mit PBS gespült.

Schritt 6

In diesem Arbeitsvorgang wurde der 2. AK (Multi Link swine Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/Biotin) von der Firma Dako REAL™ (E0453) mit Antibody Diluent (S2022) im Verhältnis 1:100 verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen, bei Raumtemperatur für 30 Min. inkubiert und im Anschluß dreimal 5 Min. lang mit PBS gespült.

Dieser Sekundäre-AK war mit einem Marker versehen und band spezifisch an den Primären-AK.⁶⁸

Schritt 7

Auf die mit dem 1. und 2. AK behandelten Schnitte wurde ein HRP-Polymer (UltraVision LP Detections System, Thermo Scinetific TL-125 HL) aufgetragen. Die Gewebeschnitte wurden nachfolgend für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Einwirkzeit mit PBS dreimal 5 Minuten lang gespült.

Schritt 8, 9 und 10

Die letzten Schritte beinhalteten die Detektion mit AEC Substrat (DakoCytomation AEC-Substrate Chromogen Ready-to-Use, K3464), die Färbung mit Hämalaun nach Mayer (für 1 Min.) und das Eindecken der Schnitte mit Aquatex.

Das AEC-Substrat wurde auf die Gewebeschnitte aufgetragen und lagerte sich auf den Polymeren ab, wodurch diese sichtbar gemacht wurden. Dieser Färbeprozess wurde unter mikroskopischer Kontrolle gemacht, um die Farbeintensität zu beobachten.⁶⁸

2.4. Ziele und Fragestellungen dieser Arbeit

2.4.1. Ziele

Seit der Entdeckung und dem Bekanntwerden der Bedeutung von UCP1 im Stoffwechsel von Nagern wurde wiederholt geforscht, ob und welchen Einfluss BAT mit seinem Transmembranprotein auf den adulten Metabolismus ausübt. Aus diesem Grund hat sich diese Studie zum Ziel gesetzt, BAT histologisch und immunhistochemisch bei routinemäßig obduzierten Probanden nachzuweisen und infolge dieser Ergebnisse Abhängigkeiten und Einflüsse innerhalb bestimmter Erkrankungsgruppen darzulegen um so mögliche Korrelationen (siehe Hypothesen) innerhalb der festgelegten Gruppen aufzuzeigen. Diese Auswertungen könnten folglich als Grundlage neuer Studien und Hypothesen dienen.

2.4.2. 1. Hypothese

Braune Adipozyten/Areale können innerhalb der routinemäßig obduzierten Patienten histologisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden.

2.4.3. 2. Hypothese

Diese histologisch/immunhistochemisch nachgewiesenen Areale zeigen sich vermehrt in Lokalisationen, welche durch die Arbeitsgruppe um Cypess mittels PET-Scan-Untersuchungen genau definiert werden.⁴

2.4.4. 3. Hypothese

Die Verteilung und das Vorkommen der ausgewerteten BAT-Areale präsentieren sich geschlechtsunspezifisch.

2.4.5. 4. Hypothese

Hinsichtlich des Vorkommens und des Verteilungsmusters von BAT lässt sich eine Alterskorrelation feststellen.

2.4.6. 5. Hypothese

Bezüglich des Vorkommens und der Verteilung von braunen Adipozyten/Arealen lässt sich ein Zusammenhang von der Grunderkrankung (siehe Gruppeneinteilung → kardiovaskulär, metabolisch und tumorös) des betroffenen Probanden zeigen.

2.4.7. 6. Hypothese

Betreffs Vorkommen und Verteilung brauner Fettzellen kann sich eine Abhängigkeit in Bezug auf den gemessenen Bauchumfang des zu untersuchenden Patienten nachweisen lassen.

2.4.8. Nullhypothese

Die Nullhypothese lautet, dass kein BAT innerhalb der routineobduzierten Patienten nachgewiesen werden kann und demnach auch kein signifikanter Verteilungsunterschied zu eruieren wäre.

Folglich könnte weder histologisch noch immunhistochemisch BAT/UCP1 nachgewiesen werden, womit sich auch kein Unterschied innerhalb der definierten Gruppen ausarbeiten ließe.

2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte mittels SPSS Statistics 19, wobei sowohl deskriptive als auch explorative Statistik zur Anwendung kamen. Im Zuge der deskriptiven Statistik wurden Häufigkeitsverteilungen, Durchschnittswerte sowie Ober- und Untergrenzen betrachtet. Die explorative Statistik half bei der Testung der Stärke von Zusammenhängen abhängiger und unabhängiger Variablen, wobei hier aufgrund der eingeschränkten Skalierung (nominale und ordinale Daten herrschen vor) Kontingenzkoeffizienten und Chi-Quadrat-Tests eingesetzt wurden. Für alle betrachteten Auswertungen galt ein Konfidenzintervall von 95 % (p-value, <0,05), wenn es um die Kategorisierung von Fehlern 1. Ordnung ging.

2.5.1. Nullhypothese (H0)

Es gibt weder histologische noch immunhistochemische Nachweise für das Vorhandensein bzw. das Verteilungsmuster von BAT bei routinemäßig obduzierten Personen.

Die Nullhypothese beschreibt in der statistischen Auswertung die H0 und wird somit zu den übrigen Hypothesen (Arbeitshypothesen) in Beziehung gesetzt. Ziel ist es die H0 zu verwerfen.

$$H_0 = \mu_1 = 0$$

2.5.1.1. H0 in Bezug auf die 6 Hypothesen

1. $H_{01} = 0 \%$ (kein BAT innerhalb der 41 Patienten)
2. $H_{02} = \sum(A+ B+ C+ D + E + F) = 0 \%$ (kein Hinweis auf BAT innerhalb der mutmaßlichen Lokalisationen)
3. $H_{03} = \mu_1 \neq \mu_2$ (μ_1 =Männer, μ_2 =Frauen)
4. $H_{04} = \mu_1 = \mu_2$ (μ_1 =<50 J., μ_2 =>50 J.)
5. $H_{05} = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$ (μ_1 =metabolische Gruppe, μ_2 =kardiovaskuläre Gruppe, μ_3 =Tumorgruppe, μ_4 =Gruppe divers)
6. $H_{06} = \mu_1$ (μ_1 =Bauchumfang)⁶⁹

2.5.2. 1. Hypothese

Bereits durch die errechneten Häufigkeiten konnte das Vorkommen von BAT bestätigt werden. Bei 22 % (absolut 9) der obduzierten Patienten konnten braune Fettgewebszellen nachgewiesen werden, somit kann die H1 zugelassen werden.

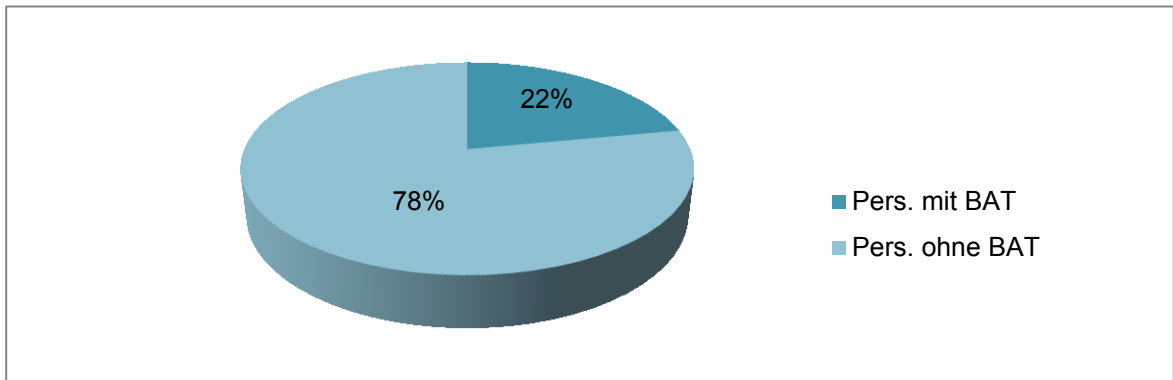


Abb. 7 Prozentuelle Verteilung von BAT innerhalb der Studienpopulation (22 %=n=9, 78 %=n=32).

2.5.3. 2. Hypothese

Die H2 kann auch beibehalten werden, da sich bei 9 Probanden (22 % von n=41) innerhalb der entnommenen Lokalisationen BAT zeigte, somit muss die H02 abgelehnt werden.

Entnahmestellen	Anteil
A	4,90 % (2 Personen)
B	9,80 % (4 Personen)
C	9,80 % (4 Personen)
D	7,30 % (3 Personen)
E	7,30 % (3 Personen)
F	14,60 % (6 Personen)

Tab. 10 Prozentuelle Verteilung der Personen auf die Lokalisationen (Mehrfachvorkommen bei n=41)

Lokalisationen	Proben % (* absolut 54)	% (** absolut 246)
A	2 (3,70 %)	0,81 %
B	4 (7,40 %)	1,62 %
C	4 (7,40 %)	1,62 %
D	3 (5,55 %)	1,21 %
E	3 (5,55 %)	1,21 %
F	<u>6 (11,11 %)</u>	<u>2,43 %</u>
	22 (40,71 %)	8,90 %

Tab. 11 Beschreibt die H1 der 2. Hypothese

Im Durchschnitt zeigten sich pro Proband 2,43 auf BAT positiv getestete Lokalisationen innerhalb aller BAT-positiv bewerteten.

2.5.4. 3. Hypothese

In Summe lag das Verhältnis der obduzierten Personen bei 63,40 % (26) Männer zu 36,60 % (15) Frauen (absolut=41).

Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Auftreten bzw. der Anzahl der gefunden Proben. Die berechneten Korrelationen nach Pearson ergaben bei $n=41 \rightarrow p\text{-value}=0,181$ und einen Kontingenzkoeffizienten $\rightarrow 0,204$, deshalb wird H03 beibehalten.

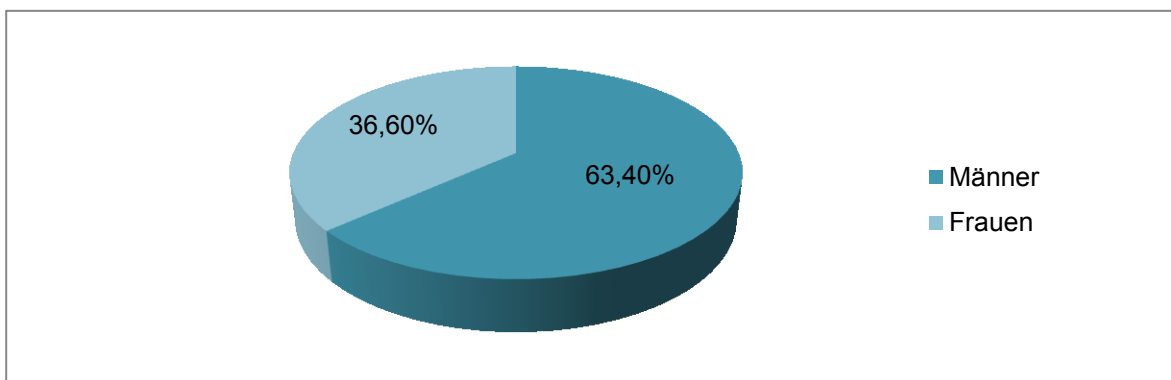


Abb. 8 Prozentuelle Verteilung der Geschlechter (absolut=41)

* Grundgesamtheit sind all jene, bei denen BAT nachweisbar war (9 Patienten= 54 Proben).

** Grundgesamtheit sind all jene, bei denen BAT nachweisbar war (41 Patienten= 246 Proben).

Bei den 9 positiv getesteten Probanden betrug das Verhältnis Männer zu Frauen 44,40 % zu 55,60 %.

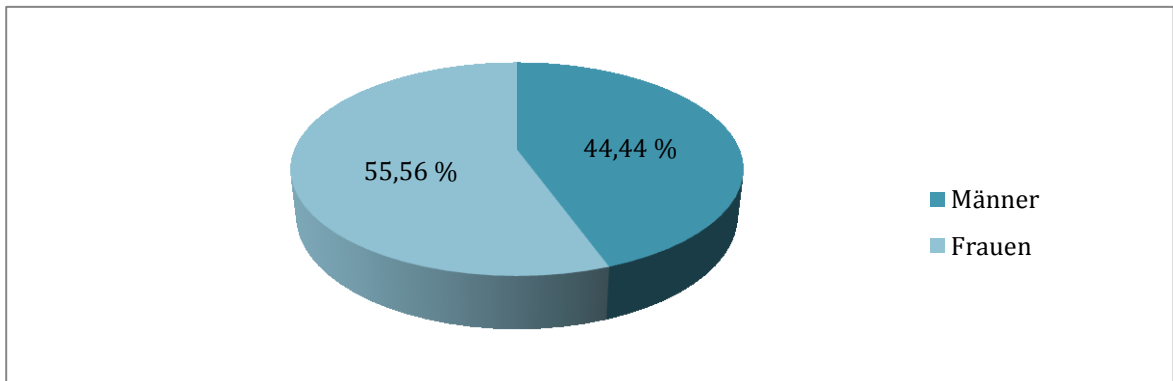


Abb. 9 Prozentuelle Verteilung der Geschlechter (absolut=9)

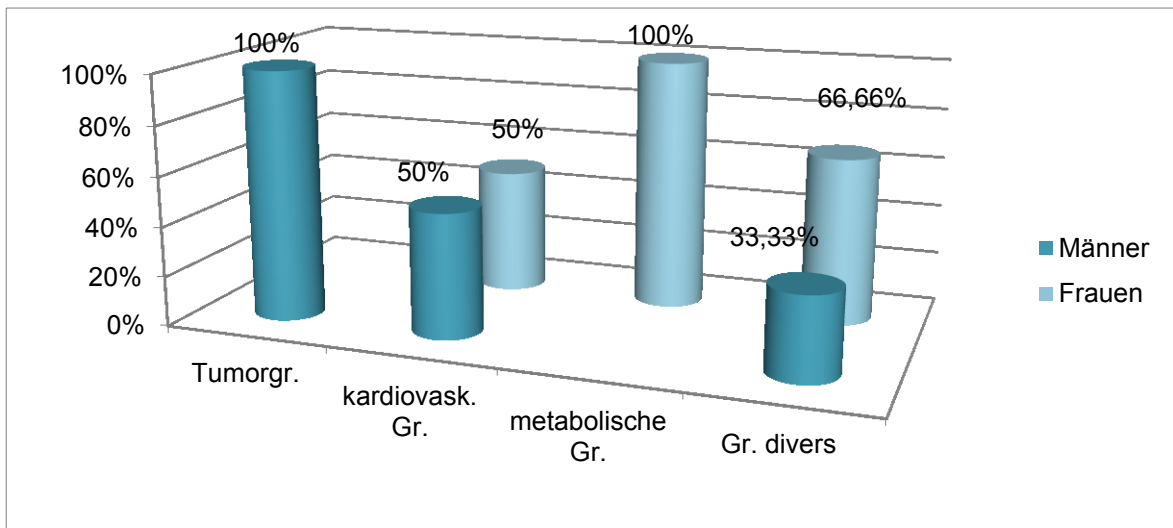


Abb. 10 Geschlechterverteilung innerhalb der Gruppen bei n=9.

2.5.5. 4. Hypothese

Im Durchschnitt ergab sich bei den obduzierten Personen ein Alter von 65,02 Jahren, wobei die älteste Person 100 und die jüngste 15 Jahre alt war. 14,60 % (6 Personen) waren <50 J. und 85,40 % (35 Personen) >50 J.

Belässt man die Spitzen in der Auswertung so ergibt sich mittels errechneter Korrelation nach Pearson kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und dem Vorkommen von braunen Fettzellen (n=41 → p-value=0,461, Kontingenzkoeffizient → 0,114). Weiters konnte auch keine Signifikanz

nachgewiesen werden ohne Einbeziehung der Spitzen ($n=41 \rightarrow p\text{-value}=0,555$, Kontingenzkoeffizient $\rightarrow 0,094$).

H04 wird somit beibehalten.

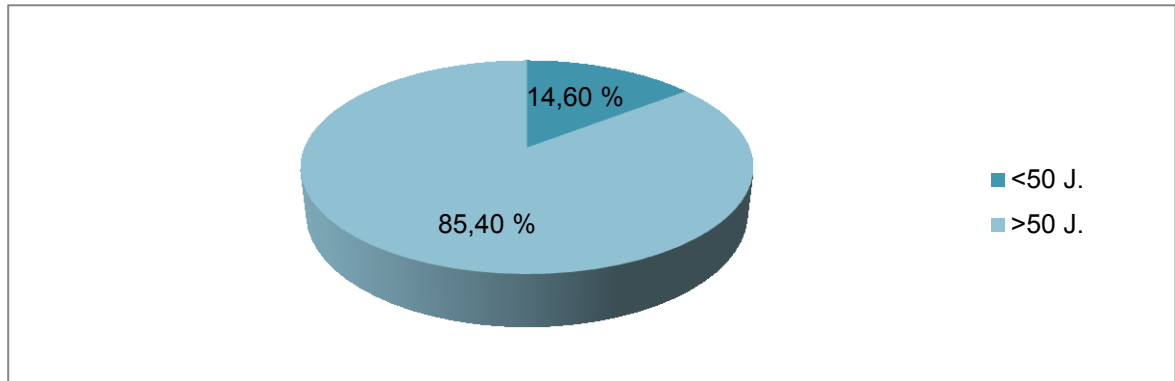


Abb. 11 Prozentuelle Verteilung $n=41$ in der Alterskategorie <50 J. und >50 J.

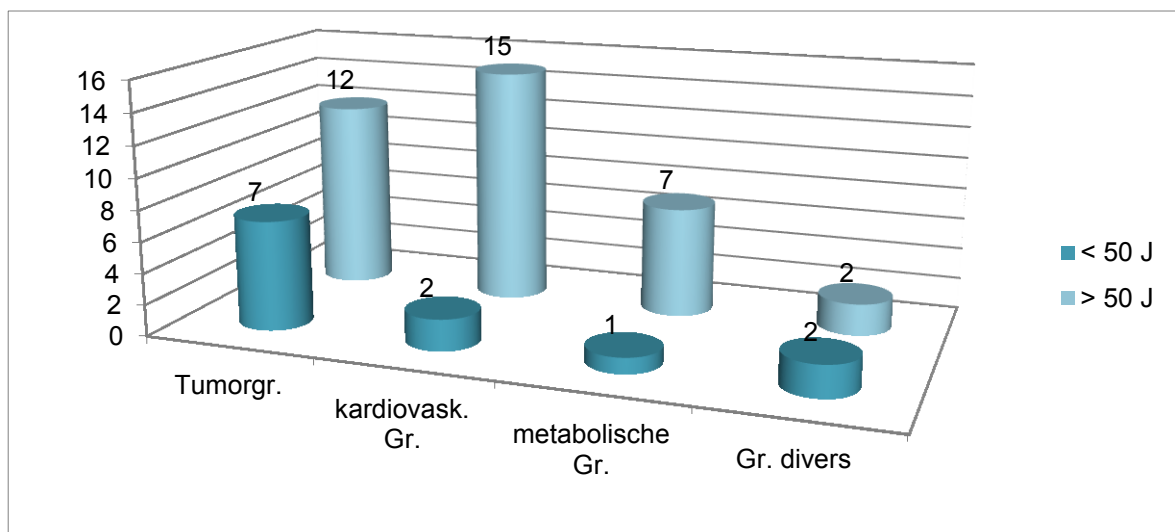


Abb. 12 Verteilung der Probanden $n=41$ nach dem Alter innerhalb der Erkrankungsgruppen.

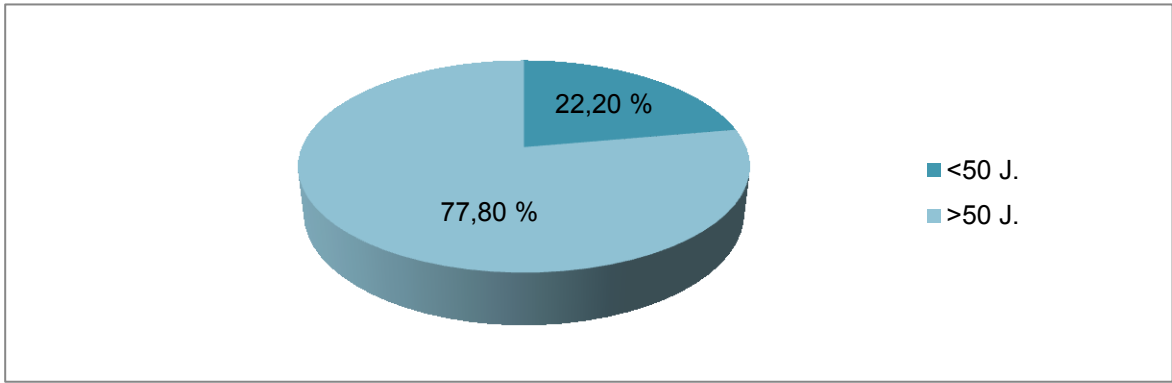


Abb. 13 Prozentuelle Verteilung bei n=9 in der Alterskategorie <50 J. und >50 J.

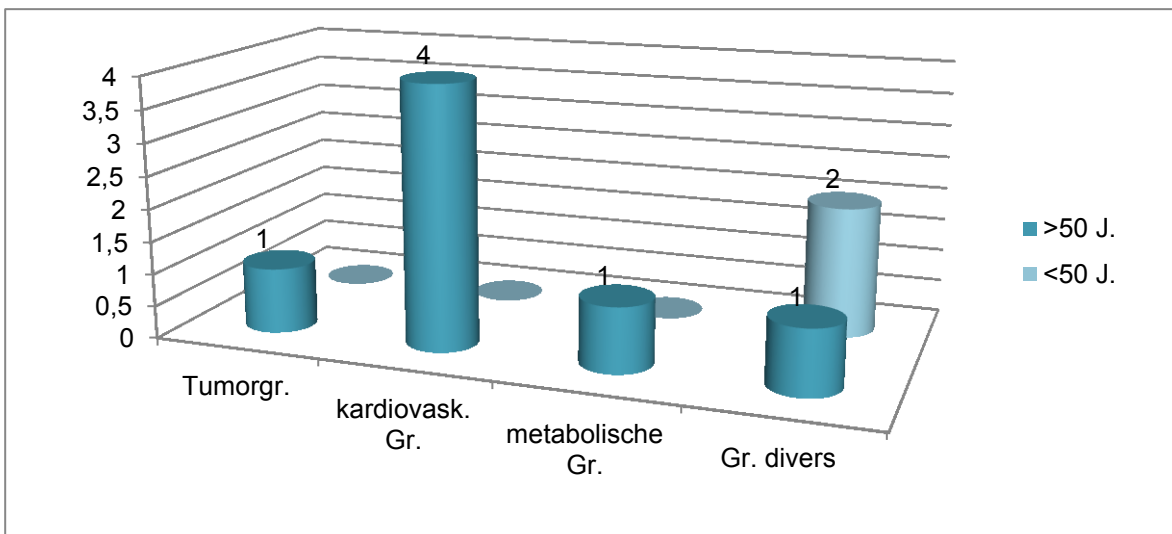


Abb. 14 Verteilung des Alters innerhalb der Gruppen bei n=9.

In der Altersklasse <50 J. bei n=9 zeigten sich durchschnittlich 1,67 Proben auf BAT positiv, wohingegen die Altersklasse >50 J. bei n=9 sich durchschnittlich auf 2,0 BAT positive Proben beliefen.

	Probanden <50 J. (n=41)	Prozente
BAT-positiv	2	22,22 %
	Probanden >50 J. (n=41)	Prozente
BAT-positiv	7	77,77 %

Tab. 12 Prozentuelle Verteilung von BAT innerhalb der <50 und >50 jährigen.

2.5.6. 5. Hypothese

Die Einteilung der Probanden in die Erkrankungsgruppen zeigte sich ungleichmäßig (kardiovaskulär→3, metabolisch und tumorös je 1 und Gruppe divers 4 Patienten), weswegen keine aussagekräftige deskriptive Testung auf das Vorkommen und die Verteilung von BAT durchgeführt werden konnte. Zusätzlich weist gerade die Gruppe divers einen überdurchschnittlich hohen BAT-Gehalt auf (75 %), was ein Zeichen für die unspezifische Verteilung von BAT-positiven Proben ist.

Die Gruppe divers wurde mit der Gruppe kardiovaskulär (3 BAT-positive Patienten) durch Chi-Quadrat Testung berechnet. Es konnte eine Signifikanz mit eingeschränkter Gültigkeit aufgrund geringer Fallzahl innerhalb der 2 getesteten Gruppen und BAT nachgewiesen werden ($n=41 \rightarrow p\text{-value}=0,394$ mit einem Kontingenzkoeffizienten von 0,049).

Gruppen	Anteil	Vorkommen von BAT
Tumor	29,20 % (12 Person)	8,30 % (1 Person)
Metabolisch	19,50 % (8 Personen)	12,50 % (1 Person)
Kardiovaskulär	41,50 % (17 Personen)	23,50 % (4 Personen)
divers	9,80 % (4 Personen)	75 % (3 Personen)

Tab. 13 Verteilung der obduzierten Personen in Bezug auf die Grunderkrankung und das Vorkommen von BAT.

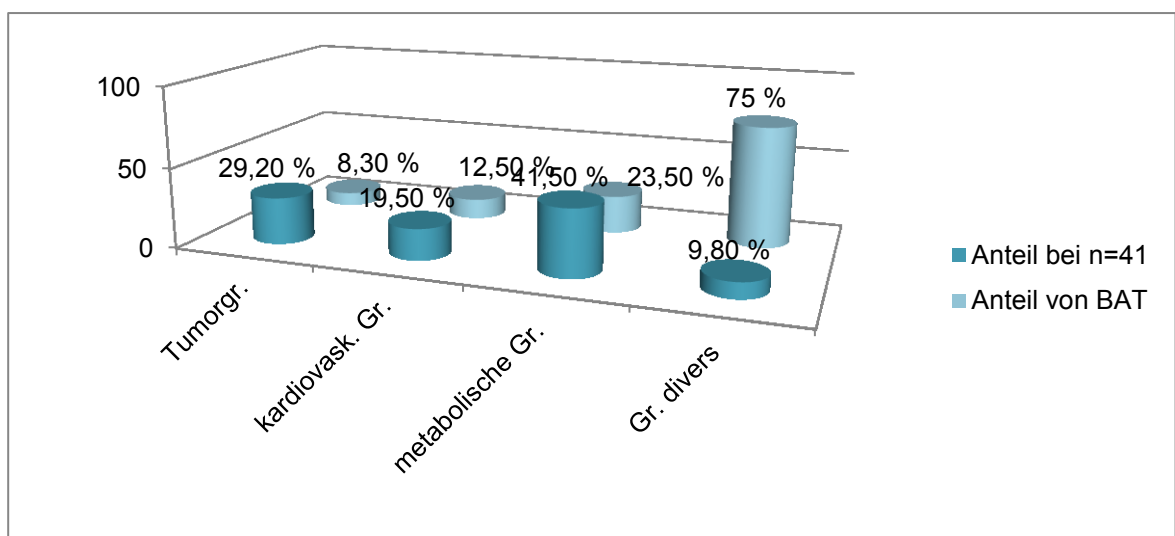


Abb. 15 Prozentuelle Verteilung der obduzierten innerhalb der Gruppen (n=41) und in Bezug auf das Vorkommen von BAT (n=9).

2.5.7. 6. Hypothese

Im Durchschnitt zeigten die Probanden einen Bauchumfang von 93,9 cm (Werte von 74 cm bis 124 cm bei n=41 konnten gemessen werden). Die Einteilung der Bauchumfangswerte für die explorativen Berechnungen wurde anhand der Richtlinien zur Definition eines metabolischen Syndroms erstellt.

Somit wurden die Probanden n=41 und n=9 in 2 Gruppen eingeteilt:

1. Frauen <80 cm und Männer <94 cm
2. Frauen >80 cm und Männer >94 cm

Daher konnten bei n=41 39 % (16 Personen) der 1. Gruppe zugeteilt werden und 61 % (25 Personen) der 2. Gruppe. Bei n=9 wurden 55,55 % (5 Personen) in die 1. Gruppe und 44,44 % (4 Personen) in die 2. Gruppe eingeteilt.

Die explorativen Berechnungen zeigten keinen Zusammenhang zwischen Bauchumfang und BAT innerhalb aller Studienteilnehmer (n=41 → 0,250, Kontingenzkoeffizient → 0,177).

	Gruppe 2	Gruppe 1
BAT-positiv	9,75 % (4 Patienten)	12,19 % (5 Patienten)
BAT-negativ	56,09 % (23 Patienten)	21,95 % (9 Patienten)

Tab. 14 Prozentuelle Verteilung der Bauchumfangsgruppen bei BAT-positiven und BAT-negativen Probanden.

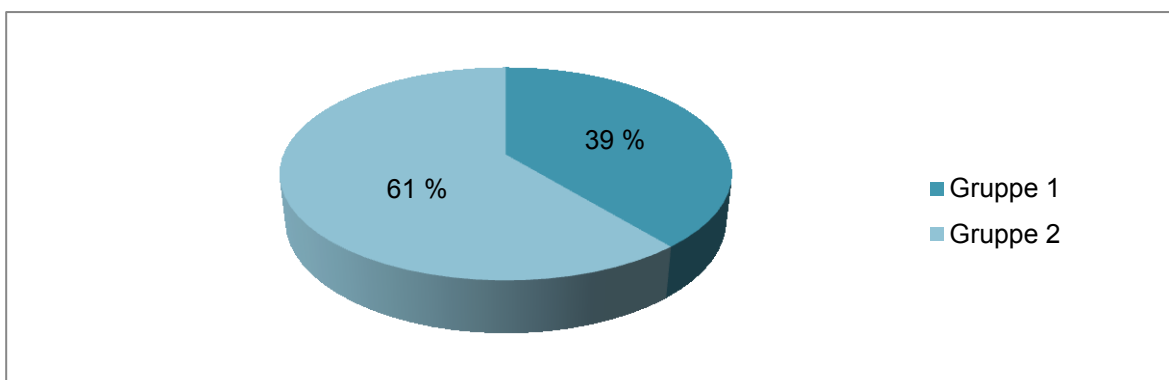


Abb. 16 prozentuelle Verteilung der beiden Gruppen bei n=41.

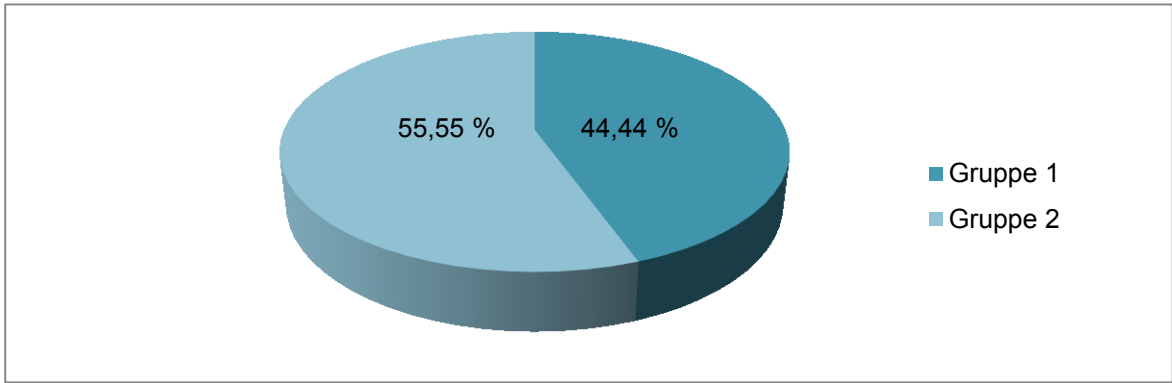


Abb. 17 Prozentuelle Verteilung der Bauchumfangsgruppen bei n=9.

	Männer	Frauen	Gruppe 1 (n=9)	Gruppe 2 (n=9)	Gruppe 1 (n=41)	Gruppe 2 (n=41)
Tumorgruppe	9	3	1	-	5	7
Kardiovask. Gr.	12	5	2	2	6	11
Metabolische Gr.	3	5	-	1	1	7
Gr. divers	2	2	2	1	2	2

Tab. 15 Verteilung der Erkrankungsgruppen innerhalb der Bauchumfangsgruppen und dem Geschlecht.

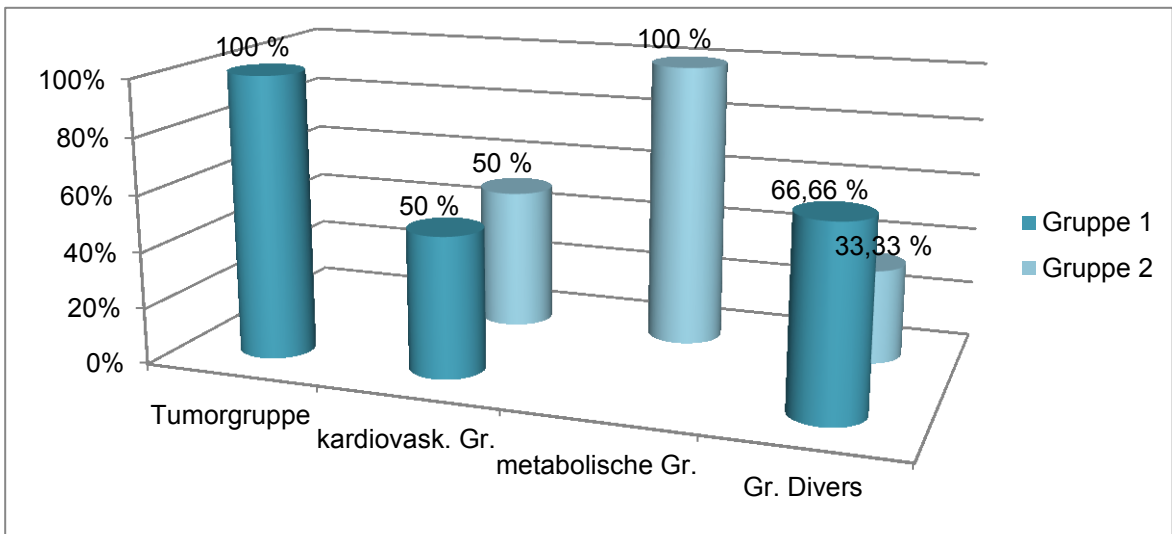


Abb. 18 Prozentuelle Verteilung der Erkrankungsgruppen innerhalb der Bauchumfangsgruppen bei n=9.

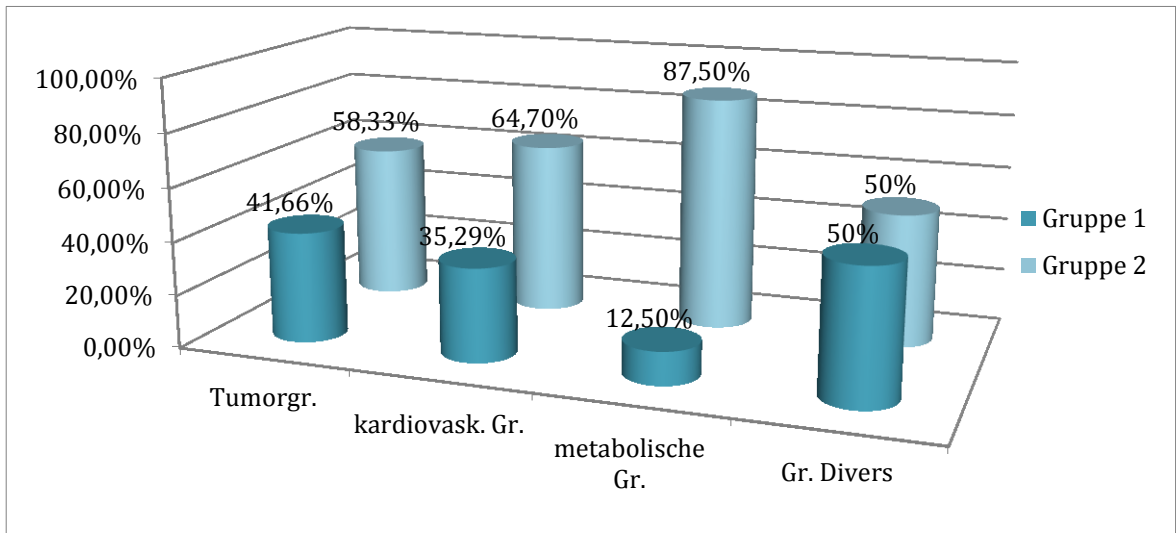


Abb. 19 Prozentuelle Verteilung der Erkrankungsgruppen innerhalb der Bauchumfangsgruppen bei n=41.

3. Ergebnisse

3.1. Histologisch

In den 287 histologisch untersuchten Proben wurden in 22 Proben braune Adipozyten/Areale gefunden, wobei nur 246 Proben anatomisch relevanten Arealen entnommen wurden. Die übrigen 41 Proben dienten als Gegenprobe und wurden aus zentralem Bauchfett entnommen. Aus diesem Grund zeigten sich histologisch univakuoläre Fettzellen ohne Anzeichen von plurivakuolären braunen Fettgewebszellen.

Um den Umfang und das Vorkommen von BAT in einem Präparat genauer definieren und identifizieren zu können, wurden die Schnitte anfangs in der Übersicht bei minimaler Vergrößerung begutachtet. In dieser 4-fachen Vergrößerung wurde nach Gruppen von braunen Adipozyten gesucht. Bei auffälligen Arealen in dieser Übersichtsaufnahme wurden diese in 40-facher Vergrößerung genauer untersucht.

Nachfolgend wurden die identifizierten braunen Fettgewebsgruppen/Areale in 10- und 40-facher Vergrößerung begutachtet, um die charakteristischen Merkmale von braunen Adipozyten sichern, erkennen und befunden zu können und um so das jeweilige Präparat als BAT-positive oder negative Probe zu bewerten.

Im Anschluss an die Befunderhebung wurde das Ausmaß an BAT definiert. Dies ging so vor sich, dass das Präparat wieder in minimaler Maßzahl eingestellt wurde um so das Gesamtbild überblicken zu können.

Dieses eingestellte Bild wurde dann in 16tel eingeteilt um so das Ausmaß an BAT zu definieren. Hierfür wurde vorab eine durchsichtige Folie in 16tel unterteilt, in Größe des Objektträgers und dann über das Präparat gelegt, um es so möglichst präzise zu bewerten.

Nr.	Alter	m/w	Gruppeneinteilung	BAT in 16tel in Lokalisationen (A-F)
2	27	w	Gr. divers	A→5/16, B→5/16, C→7/16, D→2/16
4	70	w	metabol. Gr.	B→1/16
12	71	m	Tumorgr.	A→2/16
18	84	w	kardv. Gr.	C→8/16, D→2/16, E→5/16, F→1/16
21	72	w	Gr. divers	F→1/16
23	51	m	kardv. Gr.	E→1/16, F→7/16
25	15	m	Gr. divers	A+B+D+E→15/16, C + F→16/16
30	52	M	kardv. Gr.	A+B →12/16, C→8/16, D→6/16, E + F →15/16
32	100	w	kardv. Gr.	F→8/16

Tab. 16 Gehalt von BAT innerhalb der Lokalisationen und Gruppen

3.1.1. Metabolische Gruppe

In der metabolischen Gruppe zeigte einer der 41 obduzierten Patienten BAT. Eine 70-jährige Frau mit einem Bauchumfang von 99 cm bei einer Körpergröße von 165 cm präsentierte sich deutlich adipös. Zu den Grunderkrankungen zählte nicht nur eine DM II sondern auch ein arterieller Hypertonus.

Die Gegenkontrolle in Lokalisation G aus zentralen Bauchfett zeigte sich positiv auf WAT (univakuolären Adipozyten). Der Lipidtropfen im Präparat, welcher durch die Präparation herausgelöst wurde, zeigte die Fettzellen als leer erscheinende Hüllen. Der Zellkern war an den Rand gedrückt. Es gab keine Anzeichen von multivakuolären Zellen. Von den Probanden aus zuvor bestimmten Lokalisationen ergab nur die Probe B (links zervikal) einen geringen Anteil an braunen Adipozyten und zwar 1/16tel, dies bedeutet dass der Proband mit der Nummer 12 6,25 % BAT in dieser Lokalisation aufweist. In den anderen 5 Proben konnten keine kleinen plurivakuolären Fettzellen mit relativ zentralem Kern nachgewiesen werden.

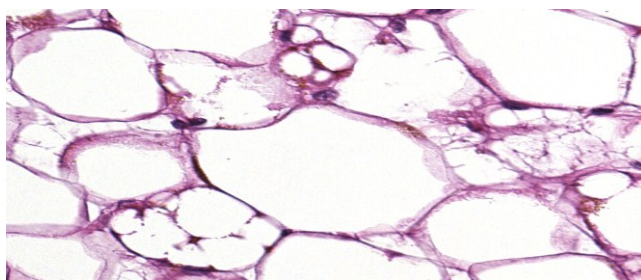


Abb. 20 BAT-Areal aus Region B bei obiger Patientin.

3.1.2. Kardiovaskuläre Gruppe

Aufgrund der mikroskopischen Befundung konnten insgesamt 4 Probanden der Gruppe der kardiovaskulären Patienten mit BAT-positivem histologischem Nachweis zugeordnet werden.

Diese 4 Studienteilnehmer mit den Nummern 18, 23, 30 und 32 zeigten einen gewissen Gehalt an BAT.

Patient Nr. 18

zeigte nach mikroskopischer Darstellung in 4 von 6 auf BAT verdächtigen Proben braune Adipozyten/Areale.

Präparat C mit der Lokalisation rechts supraclavikulär erreichte nach Messung einen Anteil an braunen Adipozyten von 8/16. Dies ergab einen 50 % Gehalt an BAT in Bezug auf das Gesamtpräparat. Die linke supraclavikuläre Region mit der Bezeichnung D erreichte im Gegenzug nur 12,50 % an BAT, Lokalisation E rechts paravertebral 31,25 % und links paravertebral mit der Bezeichnung F 6,25 %. Die Gegenprobe, entnommen aus zentralem Bauchfett in Lokalisation G zeigte sich WAT-positiv.

Patient Nr. 23

zeigte in der Lokalisation E einen 6,25 % BAT-Gehalt auf der Gegenseite, mit der Bezeichnung F 43,75 %. Auch hier zeigte sich die Kontrolle G BAT-negativ.

Patient Nr. 30

männlich mit einem Sterbealter von 52 Jahren, wies in allen BAT verdächtigen Arealen Gruppen von braunen Adipozyten auf, wobei der Gehalt je nach Lokalisation variierte.

Rechts und links zervikal 75 %, rechts und links paravertebral 93,75 %, rechts supraclavikulär 50 % und links mit der Bezeichnung D 37,50 % an nachweisbarem BAT.

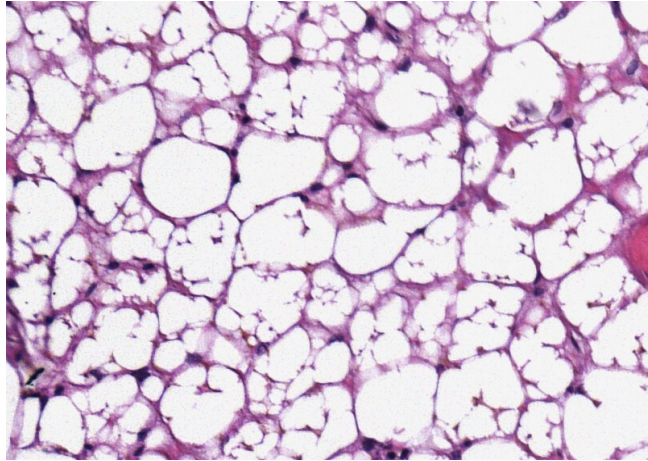


Abb. 21 Ausschnitt aus HE-gefärbter Probe F von Patient 30.

Patient Nr. 32

der letzte der kardiovaskulären Gruppe war zugleich auch der älteste Studienteilnehmer mit einem Alter von 100 Jahren. Bei dieser Auswertung konnte 1 Probe BAT-Areale aufweisen. Diese wurde in der F-Lokalisation gefunden, mit einem 50 % Gehalt.

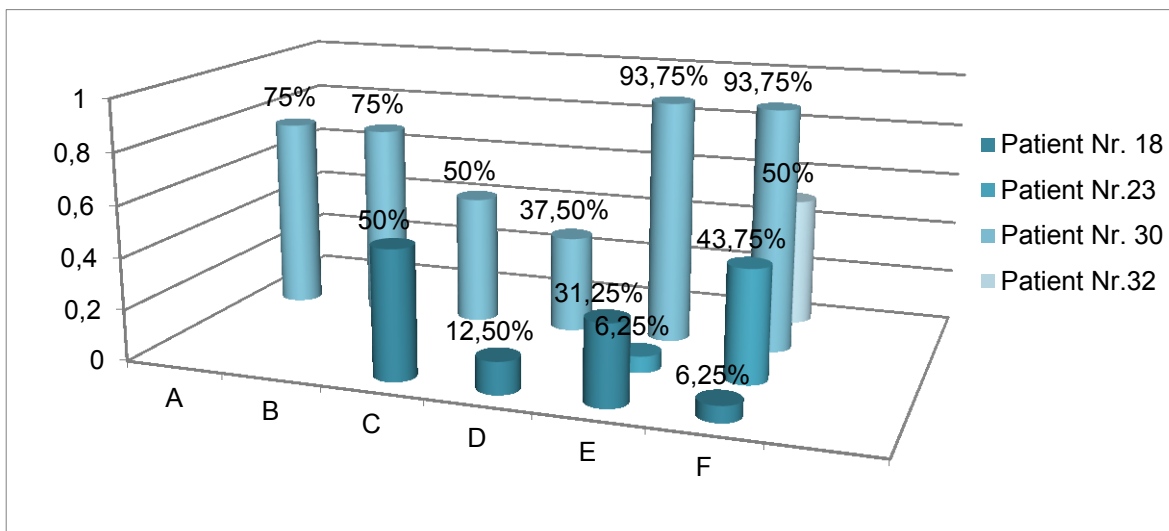


Abb. 22 Prozentuelle Verteilung von BAT in Bezug auf die Lokalisationen innerhalb der kardiovaskulären Gruppe.

3.1.3. Tumorgruppe

Innerhalb der Tumorgruppe konnte nach histologischer Auswertung aller Teilnehmer 1 Proband mit BAT gefunden werden. Dieser zu Lebzeiten an einer malignen Neoplasie erkrankte Mann besaß rechts zervikal 12,50 % braune Adipozyten in Bezug auf das Gesamtpräparat. Die Kontrollprobe G ergab keinen Hinweis auf BAT.

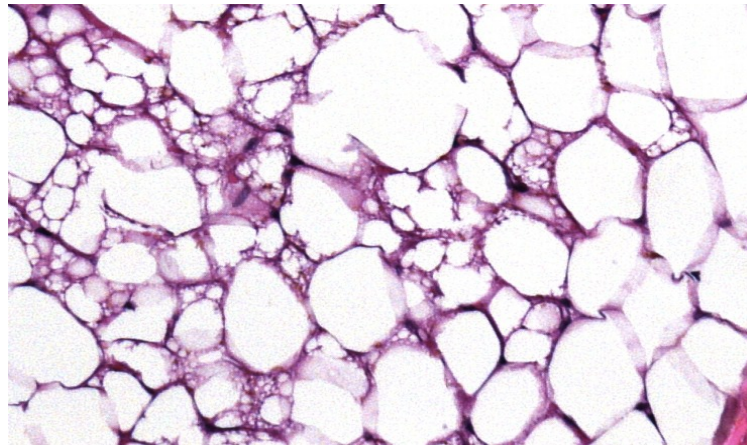


Abb. 23 BAT bei Nr.12 in A-Lokalisation.

3.1.4. Gruppe divers

In die Gruppe mit nicht näher definierten Erkrankungen/Unfällen wurden zwei Probanden BAT-positiv bewertet. Diese Patienten, zugleich auch die jüngsten Studienteilnehmer zeigten im Vergleich zu den anderen Gruppen den höchsten Gehalt an braunen Adipozyten.

Patient Nr. 2

eine weibliche 27-jährige Person mit einer WAT-positiven Gegenprobe wies in den Lokalisationen A und B je 31,25 % braune Fettzellen auf. In der rechten supraclaviculären Region 43,75 % und in der linken 12,50 %. Die Lokalisationen E und F paravertebral ergaben keinen Hinweis auf das Vorkommen von BAT.

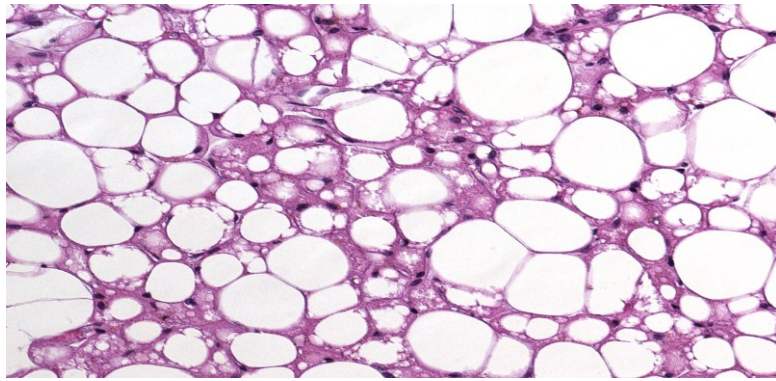


Abb. 24 HE-Ausschnitt von Patientin Nr. 2 aus der Gruppe divers in B-Lokalisation.

Patient Nr. 25

männlich, 15 Jahre alt barg in allen mutmaßlichen Lokalisationen einen hohen Anteil an braunen Lipidzellen. Die zervikalen Proben, die linke supraclaviculare und die rechte paravertebrale Region enthielten je 93,75 %. Annähernd 100 % ergaben die mikroskopischen Auswertungen in den übrigen Lokalisationen C und F. Somit erbrachte dieser sehr frühzeitig Verstorbene den mit Abstand höchsten Anteil und Gehalt an BAT, bei übereinstimmender Gegenprobe.

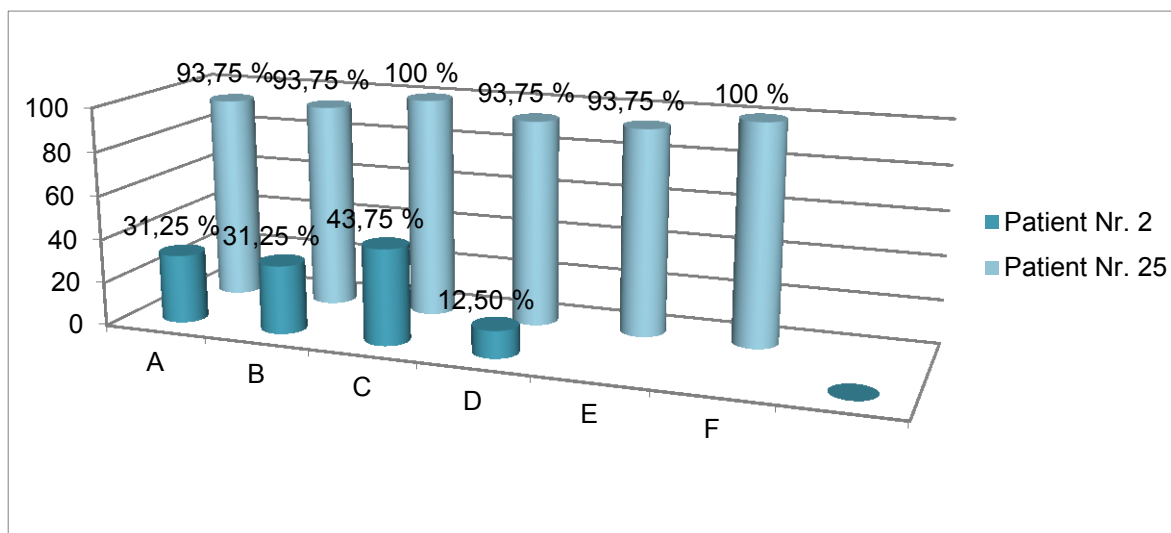


Abb. 25 Prozentueller Vergleich der BAT-Verteilung innerhalb der vorgegebenen Lokalisationen in der Gruppe divers.

3.2. Immunhistochemie

Die Grundlage bei der Auswahl der zur immunhistochemischen Färbung bestimmten Proben basierte auf Ergebnissen der zuvor bewerteten histologischen Proben. Diese 2 Methoden zum Nachweis von BAT, aus den eigens entnommenen Gewebematerialien stimmte wie vermutet mit der histologischen Auswertung überein. Durch die IHC zeigte sich eine positive Anfärbbarkeit (siehe Kapitel IHC) von Schnitten aus BAT-positiven Paraffinblöcken.

Als Beweis für die Richtigkeit dieser Methode diente eine positive (mit UCP1-AK gefärbter Schnitt) und eine negative (ungefärbter IHC-Schnitt) Kontrolle aus einem Hibernomschnitt. Mittels dieser beiden Kontrollschnitte aus einem braunen Fettgewebstumor konnte die Wirksamkeit des verwendeten AK bewiesen werden. Dies bedeutet, dass der Nachweis von BAT/UCP1 aus entnommenen Arealen auch mittels AK-Färbung bestätigt werden konnte. Bei der mikroskopischen Beurteilung und der darauffolgenden Berechnung des Gehaltes an BAT nach immunhistochemischer Färbung zeigte sich ein nahezu übereinstimmender Umfang von BAT.

Dieser Gehalt wurde wie schon bei der histologischen Bestimmung berechnet.

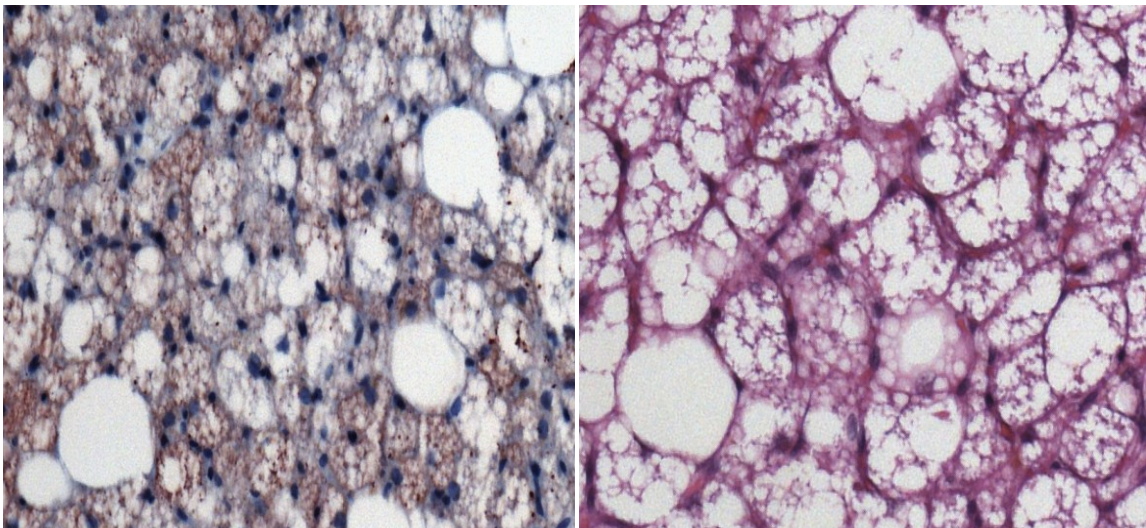


Abb. 26 Linkes Bild: IHC positiv-Kontrolle, rechtes Bild: HE-gefärbter Hibernomschnitt

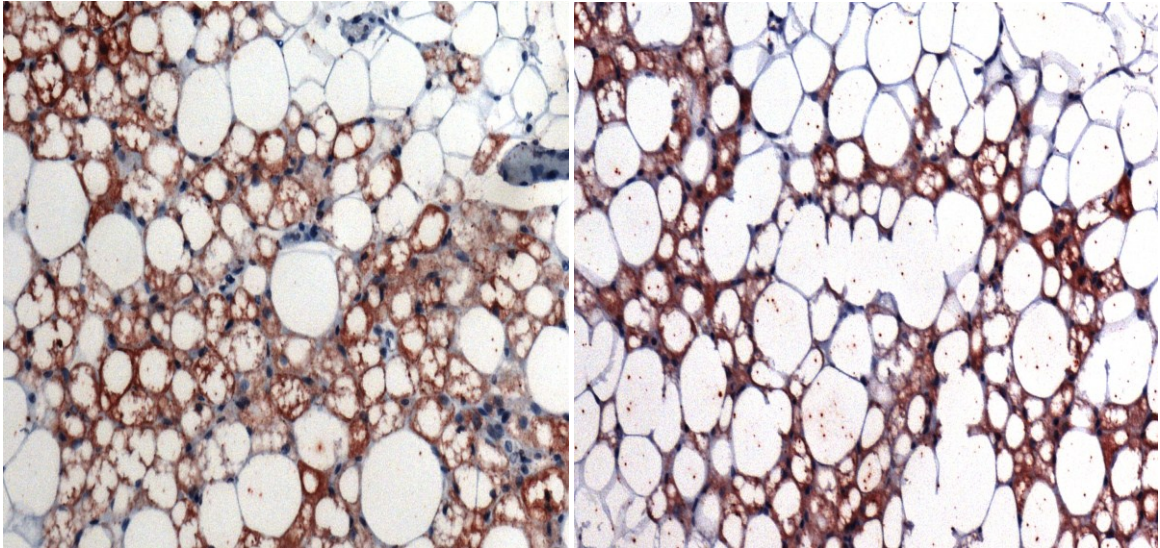


Abb. 27 IHC-Schnitt, Patientin Nr.2, linkes Bild: B-Lokalisation, rechtes Bild: C-Lokalisation

4. Diskussion

Bis heute konnten 2 Fettgewebsarten beim Menschen festgestellt werden. Das bekannte WAT und das seit geraumer Zeit immer besser erforschte BAT. Sie zeigen sich in ihrer Funktion kontrovers, da WAT überschüssige Energie als Fett speichert und BAT Lipide durch sein einzigartiges UCP1 in Wärme konvertiert. Es wird vermutet, dass ein Gehalt von 50 g BAT bis zu 20 % des täglichen Energiebedarfs verbrennen würde.⁷⁰

Viele Studien konnten nicht nur ein Vorkommen von BAT beim Erwachsenen darlegen, sondern beschäftigten sich auch mit der Bedeutung von BAT im adulten Organismus, wodurch eine Vielzahl von Hypothesen aufgeworfen und bestätigt werden konnten, die sich unter anderem mit Korrelationen zwischen dem Vorkommen von BAT und beeinflussbaren und festen Größen beschäftigten.^{4, 23, 27}

So konnte durch die Arbeitsgruppe um Cypess ein erhöhtes Vorkommen und eine Aktivitätssteigerung von BAT bei Frauen, Erwachsenen <50 J., und einem verminderten Ernährungszustand mittels PET-Scan dokumentiert werden.^{4, 27}

Auf diese Umstände stützt sich diese retrospektive Autopsiestudie, deren Ziel es ist, das Vorkommen von BAT bei routinemäßig obduzierten Patienten zu beweisen und gleichzeitig die oben genannten Faktoren in Bezug auf häufige Erkrankungen hin zu untersuchen.

Aus diesem Grund wurden bei 41 Probanden aus 6 BAT-verdächtigen Lokalisationen und einer als Kontrollprobe dienenden Stelle mit WAT Gewebeproben entnommen. Nach Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung wurden so insgesamt 246 auf multivakuoläre Fettzellen verdächtige Proben und 41 WAT-Kontrollproben mit HE gefärbt, um im Anschluss mikroskopisch begutachtet zu werden und den Gehalt an BAT zu bestimmen.

Proben, welche nach histologischer Auswertung BAT erkennen liessen, wurden durch IHC als 2. Methode bearbeitet um so auch UCP1 bestimmen zu können.

Infolge histologischer und immunhistochemischer Befundung konnte so bei 9 Probanden BAT nachgewiesen werden, dies bedeutet dass 78 % der Studienteilnehmer keine braunen Adipozyten in den entnommenen Lokalisationen enthielten.

Unter den 9 Probanden konnte in 22 von 54 verdächtigen Proben ein positives Ergebnis erzielt werden, wobei die A-Lokalisation mit 4,90 % (1 Person) das geringste Vorkommen und die F-Lokalisation mit 14,60 % (6 Personen) den höchsten Anteil an BAT/UCP1 aufwies. Im Durchschnitt zeigten 2,43 Lokalisationen BAT-Areale innerhalb der 9 positiven Patienten.

Hinsichtlich der bearbeiteten Arbeitshypothesen konnte somit die 1. Hypothese, die sich mit der Frage nach dem Vorkommen von BAT bei routinemäßig obduzierten Patienten beschäftigt, bestätigt werden und auch die 2. Fragestellung, welche besagt, dass in den entnommenen Lokalisationen BAT zu finden ist. Diese vorab definierten Stellen wurden durch die Arbeitsgruppe um Cypess mittels PET-Scan als BAT-aktive Lokalisationen beschrieben.⁴

Die 3. Hypothese dieser Arbeit widerspricht den gängigen Meinungen und behauptet, dass BAT keinen Zusammenhang mit dem Geschlecht aufweist und somit geschlechtsneutral ist. Dies konnte bevorzugt durch deskriptive statistische Auswertung aufgezeigt werden, wobei die kleine Studienpopulation und die Tendenz in Richtung des weiblichen Geschlechtes (55,60 % Frauen bei n=9) bei den Häufigkeitsberechnungen berücksichtigt werden müssen, d.h. dass sich bei einer höheren Fallzahl eine Geschlechterspezifität einstellen und dadurch diese Arbeitshypothese widerlegt werden könnte.

In Anlegung an Cypess wurde auch in dieser Studie die Patientenpopulation in <50-jährige und >50-jährige Personen klassifiziert. Es ergab sich ein Durchschnittsalter von 65,02 Jahren, mit einem Maximum von 100 Jahren und einem Minimum von 15 Jahren. 22,20 % (2 Personen) der BAT-positiven Probanden verstarben <50 J., bei einem Gesamtanteil dieser Gruppe von 14,60 % (7 Personen). Aufgrund dieser unausgeglichene und geringen Verteilung konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden, weswegen die 4. Arbeitshypothese verworfen werden muss.

Ein möglicher Hinweis auf ein vermehrtes Vorkommen von BAT bei jungen Menschen und somit eine Erfüllung dieser Alterskorrelation in dieser Arbeit, ergibt sich aus der Konstellation der 22,20 %, welche sich aus den zwei jüngsten Patienten (15 J. und 27 J.) zusammensetzt.

Angesichts der Häufung an Erkrankungen tumoröser, kardiovaskulärer und metabolischer Genese innerhalb der Gesamtbevölkerung wurden diese 3 Haupterkrankungsgruppen gewählt um eine mögliche Einflussnahme durch

Verteilungsunterschiede innerhalb der Gruppen aufzudecken. Weiters können diese Gruppen in Zusammenhang mit dem Ernährungszustand gebracht werden, wodurch Ergebnisse der 5. und der 6. Hypothese in Korrelation zueinander gestellt werden konnten.

Die Einteilung setzte sich wie folgt zusammen: Tumorgruppe, welche durch die Tumorkachexie die Wahrscheinlichkeit von verminderten Bauchumfangswerten begünstigt, kardiovaskuläre Gruppe als eine Mischgruppe in Bezug auf die Umfangswerte und die metabolische Gruppe, die durch ihre Kriterien ein Auftreten von zentraler Adipositas und somit gesteigerten Bauchumfangswerten erleichterte. Aufgrund der Vielzahl an Erkrankungen konnten nicht alle 41 Probanden in die 3 festgelegten Gruppen eingeteilt werden, weswegen eine Nebengruppe (Gruppe divers) für nicht-zuordenbare Patienten geschaffen wurde.

Nach deskriptiver Auswertung der Erkrankungsgruppen in Bezug auf die Gesamtfallzahl konnten 29,30 % in die Tumorgruppe mit einem BAT-Anteil von 8,30 % eingeteilt werden, 41,50 % in die kardiovaskuläre Gruppe mit einer Beteiligung von 23,50 %, 19,50 % in die metabolische, bei einer 12,50 %igen BAT-Masse und 9,8 % in die Gruppe divers mit einem 75 %igen braunen Fettgewebsgehalt.

Bezüglich dieser Häufigkeitsberechnungen und den nicht aussagekräftigen explorativen Berechnungen (getestet wurden aufgrund der Fallzahl nur die Gruppe divers und kardiovaskulär, hier konnte formal ein Zusammenhang erbracht werden, der aber durch die niedrige Anzahl als nicht aussagekräftig angesehen werden muss) durch eine niedrige Fallzahl liegt im allgemeinen kein Zusammenhang zwischen Erkrankungsgruppen und BAT-Existenz in dieser Studie vor. Die 75 % Mehrheit, welche eine Korrelation zwischen dem Vorkommen und der Verteilung von BAT in Bezug auf die Erkrankungsgruppen zeigen würde, kann angesichts der nicht näher definierten Erkrankungen in keinen Zusammenhang gebracht werden. Die Dominanz der Gruppe divers kann aber zur Konstellation der Alterskorrelation hinzugezogen werden, da es sich bei 50 % der Studienteilnehmer dieser Gruppe um die beiden jüngsten Probanden handelte. Dies könnte als Erklärung für das vermehrte Auftreten von BAT innerhalb dieser Gruppe dienen.

Auf Basis der Bauchumfangsmessung bei allen Probanden ergaben sich Werte zwischen 74 cm und 124 cm, dies ergab einen Durchschnittswert von 93,30 cm.

Zur Verwertung wurden wiederum 2 Gruppen erstellt. Die 1. Gruppe besteht aus Frauen mit Werten <80 cm und Männern <94 cm, die 2. Gruppe aus Frauen mit Werten >80 cm und Männern >94 cm. Nach Berechnung der Häufigkeit innerhalb dieser Kategorie zeigte sich, dass 55,55 % der BAT-positiven Probanden in die 1. Gruppe aufgenommen werden konnten. Die Testung nach Pearson ergab keinen signifikanten Zusammenhang.

Verteilt man die Patienten der 1. Gruppe (55,55 %) auf die Erkrankungsgruppen, so konnte 1 BAT-positiver Proband von insgesamt 1 in die Tumorgruppe eingeteilt werden, 2 von 3 in die Gruppe divers und weitere 2 von insgesamt 4 BAT-Personen in die kardiovaskuläre Gruppe.

Zusammenfassend zur 6. Hypothese lässt sich eine indirekt proportionale Korrelation zwischen BAT und dem Bauchumfang der untersuchten Testpersonen aufzeigen, welche eine Übereinstimmung von PET-Scan-Auswertungen mit einer angemessenen Fallzahl durch die Arbeitsgruppen um Cypess^{4, 27} erbrachte. Auch die Schätzung, dass 50 g BAT 20 % des Tagesumsatzes verbrennen kann⁷¹ und die Ergebnisse der „cafeteria diet“, welche ergab dass Mäuse mit hoher BAT-Aktivität Resistenz in Bezug auf ernährungsbedingte Adipositas zeigten⁵⁶, deuten auf einen Zusammenhang zwischen Bauchumfang (somit auch mit dem metabolischen Syndrom als Ausdruck von erhöhten Abdominalwerten und DM) und dem Vorkommen sowie der Verteilung von BAT hin.

Als Resümee dieser Arbeit ergibt sich, dass BAT bei Routineobduktion durch gezielte Gewebeentnahme bei beiden Geschlechtern, bei Jungen und bei Alten, sowie bei adipösen bis kachektischen Patienten gefunden werden kann. Signifikante Verteilungsunterschiede konnten durch die geringe Anzahl der Studienteilnehmer nicht nachwiesen werden. Diesbezüglich könnte eine Fallzahlerhöhung aussagekräftige Ergebnisse liefern sowie eine gleichmäßige Zuteilung in die Erkrankungsgruppen ermöglichen, wodurch sich eine Korrelation zwischen dem BAT-Vorkommen und den untersuchten Erkrankungsgruppen ergeben könnte. Dies und die Tatsache, dass korrespondierende Gewebeproben der 41 Probanden kryokonserviert wurden, könnte die Basis für aufbauende/ergänzende Studien sein.

Literaturverzeichnis

Fachbücher

Nr.	Beschreibung
1	Vgl. Kretz, F.-J., Teufel, F., <i>Anästhesie und Intensivmedizin</i> , 2006, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 440-441.
2	Vgl. Traupe, H., Hamm, H., <i>Pädiatrische Dermatologie</i> , 2006, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 11.
3	Vgl. Lüllmann- Rauch, R., Paulsen, F., <i>Taschenlehrbuch Histologie</i> , 2012, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 69.
4	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
5	Vgl. Schwegler, J., Lucius, R., <i>Der Mensch-Anatomie und Physiologie</i> , 2011, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 23.
6	Vgl. Hiort, O., Danne, T., Wabitsch, M., <i>Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie</i> , 2010, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 236.
7	Vgl. Wirth, A., <i>Adipositas-Fibel</i> , 2003, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 58-59.
8	Vgl. Püschel, G., Kühn, H., Kietzmann, T., Höhne, W., Christ, B., Doenecke, D., et al., <i>Taschenlehrbuch Biochemie</i> , 2011, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 25.
9	Vgl. Wabitsch, M., Hebebrand, J., Kiess, W., & Zwiauer, K., <i>Adipositas bei Kindern und Jugendlichen</i> , 2005, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 74.
10	Vgl. Lehrke, S., Laessle, R. G., <i>Adipositas im Kindes- und Jugendalter: Basiswissen und Therapie</i> , 2008, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 3.
11	Vgl. Schünke, M., <i>Funktionelle Anatomie-Topographie und Funktion des Bewegungsapparates</i> , 2000, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 21-23.
12	Vgl. Hochleitner, M., <i>Gender Medicine: Ringvorlesung an der Universität Innsbruck 1</i> , 2008, facultas Universitätsverlag/Wien/ Österreich, Seite 22-66.
13	Vgl. Jacobi, G. H., Biesalski, H. K., Gola, U., Huber, J., Sommer, F., <i>Kursbuch Anti- Aging</i> , 2005, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 57.
14	Vgl. Gressner, A. M., Arndt, T., <i>Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik</i> , 2006, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 17.
15	Vgl. Linß, W., Fanghänel, J., <i>Histologie; Zytologie, Allgemeine Histologie, Mikroskopische Anatomie</i> , 1999, Walter de Gruyter GmbH & Co/Berlin/Deutschland, Seite 55-58.
16	Vgl. Doll, A., Aust, G., Aumüller, G., <i>Duale Reihe Anatomie</i> , 2010, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 41-42.
17	Vgl. Luiz, C. U., Carneiro, J., Gratzl, M., <i>Histologie</i> , 2004, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 76-79.
18	Vgl. Michels, H., Neumann, C. L., <i>Kurzlehrbuch- Anatomie</i> , 2007, Urban & Fischer/München/Deutschland, Seite 28.
19	Vgl. Upledger, J. E., <i>Im Dialog mit der Zelle Cell Talk: Zellbiologische Grundlagen der CraniSacralen Therapien</i> , 2006, Haug Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgart GmbH & Co. KG/Stuttgart/Deutschland, Seite 25.
20	Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F., <i>Taschenlehrbuch Histologie</i> , 2012, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 140-142.

21	Vgl. Fanghänel, J., Pera, F., Anderhuber, F., Nitsch, R., <i>Waldeyer-Anatomie des Menschen</i> , 2009, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG/Berlin/Deutschland, Seite 1222.
22	Vgl. Schiebler, H. T., Korf, H. W., <i>Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie</i> , 2007, Steinkopff Verlag/Frankfurt/Main/Deutschland, Seite 44-46.
23	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
24	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
25	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
26	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
27	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
28	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
29	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
30	Vgl. Henne-Bruns, D., <i>Duale Reihe Chirurgie</i> , 2012, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 561.
31	Vgl. Schünke, M., <i>Funktionelle Anatomie-Topographie und Funktion des Bewegungsapparates</i> , 2000, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 456.
32	Vgl. Zilles, K., Tillmann, B., <i>Anatomie</i> , 2010, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 205.
33	Vgl. Schwegler, J. S., Lucius, R., <i>Der Mensch-Anatomie und Physiologie</i> , 2011, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 219.
34	Vgl. Schiebler, T. H.-W., <i>Anatomie</i> , 2007, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 259.
35	Vgl. Jesel, M., <i>Neurologie für Physiotherapeuten</i> , 2004, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 192.
36	Vgl. Whitaker, R. H., Borley, N. R., <i>Anatomiekompass</i> , 2003, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 126.
37	Vgl. Linß, W., Fanghänel, J., <i>Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie</i> , 1990, Walter de Gruyter GmbH & Co/Berlin/Deutschland, Seite 58.
38	Vgl. Buchta, M., <i>Physikum-Kompodium zum 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung</i> , 2010, Elsevier, Urban & Fischer Verlag/München/Deutschland, Seite 37.
39	Vgl. Schiebler, T. H., Korf, H. W., <i>Anatomie</i> , 2007, Steinkopff Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 45.
40	Vgl. Müller, W. A., Frings, S., <i>Tier- und Humanphysiologie</i> , 2009, Springer Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 255.
41	Vgl. Heldmaier, G., Neuweiler, G., <i>Vergleichende Tierphysiologie</i> , 2004, Springer Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 131.
42	Vgl. Königshoff, M., Brandenburger, T., <i>Kurzlehrbuch Biochemie</i> , 2012, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 135.
43	Vgl. Kleine, B., Rossmannith, W. G., <i>Hormone und Hormonsysteme</i> , 2012, Springer Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 181.
44	Vgl. Silverthorn, D. U., <i>Physiologie</i> . München, 2009, Pearson Education Deutschland GmbH/München/Deutschland, Seite 548.
45	Vgl. Buselmaier, W., <i>Biologie für Mediziner</i> , 2003, Springer Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 84.
46	Vgl. Rehner, G., Daniel, H., <i>Biochemie der Ernährung</i> , 2010, Spektrum Akademischer Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 518-519.
47	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis

48	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
49	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
50	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
51	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
52	Vgl. Kurtz, A., Pape, H. C., Klinke, R., & Silbernagl, S., <i>Physiologie</i> , 2009, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seiten 22-23.
53	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
54	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
55	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
56	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
57	Siehe Internetverzeichnis
58	Vgl. Siegenthaler, W., Blum, H. E., <i>Klinische Pathophysiologie</i> , 2006, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 203.
59	Vgl. Erdmann, E., <i>Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der Gefäße</i> , 2006, Springer Medizin Verlag/Heidelberg/Deutschland, Seite 1-3.
60	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
61	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
62	Vgl. Krams, M., Frahm, S. O., Kellner, U., Mawrin, C., <i>Kurzlehrbuch Pathologie</i> , 2009, Georg Thieme Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 23-27.
63	Vgl. Büttner, R., Thomas, C., <i>Allgemeine Pathologie</i> , 2003, Schattauer Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 226.
64	Siehe Fachzeitschriftenverzeichnis
65	Siehe Anhang und Fachzeitschriftenverzeichnis, SOP_Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D).
66	Siehe Internetverzeichnis
67	Vgl. Büttner, R., Thomas, C., <i>Allgemeine Pathologie</i> , 2003, Schattauer Verlag/Stuttgart/Deutschland, Seite 12.
68	Siehe Anhang, Schauer IHC
69	Siehe Internetverzeichnis
70	Vgl. Malhotra, K., Birks, D. F., <i>Marketing Resarch-An Applied Approach</i> , 2007, Pearson Education Company/Essex/England, Seite 511-515.
71	Siehe Internetverzeichnis

Fachzeitschriften

Nr.	Beschreibung
4	Vgl. Cypess, A. M., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., et al., <i>Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans</i> , 2009, <i>N. Engl. J. Med</i> 360, 1509-1517 .
23	Vgl. Cannon, B., Nedergaard, J., <i>Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance</i> , 2004, <i>Physiol Rev</i> , 277-279.
24	Vgl. Kajimura, S., Seale, P., Spiegelman, B. M., <i>Transcriptional Control of Brown Fat Development</i> , 2010, <i>Cell Metab.</i> , 257-262.
25	Vgl. Patrick Seale, S. K., <i>Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16</i> , 2007, <i>Cell Metab.</i> , 38–54.
26	Vgl. Tim J. Schulz, P. H.-H., <i>Brown-fat paucity due to impaired BMP signalling induces compensatory browning of white fat</i> , 2013, <i>Research Letter</i> , 379-383.
27	Vgl. Cypess A. M., Kahn., <i>The Role and Importance of Brown Adipose Tissue in Energy Homeostasis</i> , 2010, <i>Curr Opin Pediatr.</i> , 478–484.
28	Vgl. Seale, P., Kajimura, S., & Spiegelman, B. M., <i>Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function—of mice and men</i> , 2009, <i>GENES & DEVELOPMENT</i> 23, 788–797 .
29	Vgl. Shingo Kajimura, Seale Patrick et al., <i>Initiation of myoblast/brown fat switch through a PRDM16-C/ EBP-β transcriptional complex</i> , 2009, <i>Nature.</i> , 1154–1158.
47	Vgl. Cannon, B., Nedergaard, J., <i>Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance</i> , 2004, <i>Physiol Rev</i> 84, 285-286.
48	Vgl. Kozak, L., Anunciado-Koza, R., <i>UCP1: its involvement and utility in obesity</i> , 2008, <i>International Journal of Obesity</i> , 32-38.
49	Vgl. Ricquier, D., <i>Uncoupling Protein 1 of Brown Adipocytes, the Only Uncoupler: A Historical Perspective</i> , 2011, <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i> , 1-5.
50	Vgl. Jastroch, M., Hirschberg, V., Klingenspor, M., <i>Functional characterization of UCP1 in mammalian HEK293 cells excludes mitochondrial uncoupling artefacts and reveals no contribution to basal proton leak</i> , 2012, <i>Article history</i> , 1660.
51	Vgl. Frischmuth, K., <i>Struktur und Funktionsanalysen der humanen Uncoupling Proteine 1, 2 und 3 (hUCP1, hUCP2 und hUCP3)</i> , 2002, München (Dissertation), 2-6.
53	Vgl. Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., Cannon, B. <i>UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency</i> , 2011, <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 82-106.
54	Vgl. Cannon, B., Nedergaard, J., <i>Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance</i> , 2004, <i>Physiol Rev</i> 84, 298-311.
55	Vgl. Wang, Q., Zhang, M., Ning, G., Gu, W., Su, T., Xu, M., et al., <i>Brown Adipose Tissue in Humans Is Activated by Elevated Plasma Catecholamines Levels and Is Inversely Related to Central Obesity</i> , 2011, <i>Plos One</i> , 1-5.
56	Vgl. Rothwell, N. J., Stock, M. J., <i>A role for brown adipose tissue in diet- induced thermogenesis</i> , 1997, <i>Obesity Research</i> Vol. 5 Nr. 6, 31-35.
60	Vgl. C. C. Fontes-Oliveira, S. B.-S., <i>A differential pattern of gene expression in skeletal muscle of tumor-bearing rats reveals a dysregulation of excitation-contraction coupling together with additional muscle alterations</i> , 2013, <i>Muscle Nerve</i> , doi: 10.1002/mus.23893.

61	Vgl. Shellock, R. a., <i>Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia</i> , 1986, J Cancer Res Clin Oncol, 5-82.
65	Vgl. Sargsyan, K., SOP_Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D), 2010, Graz: Biobank, 1-4. Siehe Anhang

Internetquellen

Nr.	Beschreibung
57	Vgl. www.diabetes-deutschland.de/archiv/3834.htm , 12.03.13, Anja Lütke
66	Vgl. abcam. (2010), <i>abcam-protocols-book-2010</i> . 26.04.13 from docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf
69	Vgl. Scientific, T. (n.d.), 16.04.13 from UltraVision LP Detection System: http://www.thermoscientific.com/ecomm/servlet/productsdetail_11152___11961607_-1 .
71	Vgl. L. Madsen, L. M. Pederson et al., <i>UCP1 Induction during Recruitment of Brown Adipocytes in White Adipose Tissue Is Dependent on Cyclooxygenase Activity</i> , 2010, PLoS One, 10.1371/journal.pone.0011391, 16.05.13.

Anhang

Ethikkommissionsvotum

Ethikkommission



Medizinische Universität Graz

Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

FOLGEVOTUM gültig bis 25.02.2013

EK-Nummer: 23-085 ex 10/11
Studientitel: Vorkommen und Verteilung von braunem Fettgewebe beim Erwachsenen bei kardiovaskulären, metabolischen und Krebserkrankungen - eine retrospektive Autopsiestudie
Prüfer: Dr. Ariane Algelsreiter
Inst. für Pathologie
Sponsor: *) Med. Uni Graz
Ansprechpartner: Petra Lurf, 8010 Graz, Eduard-Richter-Gasse 9
CRO: -

*) Antragsteller

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals in der Sitzung 03-10/11 am 13.12.2010 behandelt.

Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Stimmberechtigte bzw. anwesende Mitglieder bei der Behandlung waren: Siehe beiliegende Liste vom 13.12.2010.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befähigt anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben: keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 04.11.2010, begutachtet in der Sitzung 03-10/11 am 13.12.2010

✓ Antragsformular	03.11.2010
Originalprotokoll 1.0	03.11.2010

Dokumente eingegangen am 23.02.2011, begutachtet im 'expedited Review' am 25.02.2011

✓ Originalprotokoll 1.1	23.02.2011
-------------------------	------------

Dokumente eingegangen am 19.03.2012, begutachtet im 'expedited Review' am 23.03.2012

✓ Zwischenbericht	15.03.2012
-------------------	------------

Datum Erstvotum: 25.02.2011

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen
- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen

EK-Nummer: 23-085 ex 10/11

Votum

Seite 1 von 2

Medizinische Universität Graz, Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz. www.medunigraz.at

Rechtsform: Juristische Person öffentlichen Rechts gem. Universitätsgesetz 2002. Information: Mitteilungszust der Universität und www.medunigraz.at. DVR-Nr. 210 9494. UID: ATU 575 111 75. Bankverbindung: Bank Austria Creditanstalt BLZ 12000 Konto-Nr. 500 948 400 04, Raiffeisen Landesbank Steiermark BLZ 38000 Konto-Nr. 49510.



SOP_Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D)

Serviceunterlage 1017.9639
Redaktion: GRA/ZMF-Dokumente
In der Grundfassung gültig: 28.09.2009 - undefiniert

Kurzinhalt/Zweck und Geltungsbereich:

Anlagen

FB318 Tagessprotokoll Kryoproben 2D
AL_Handheld
SOP_Trans_Kryo
SOP_DE_Bioesmple Pro

Mitgeliefende Dokumente und Links

keine

Änderungsprotokoll

10.06.2010, 13:47, Inhaltlich:
Aktualisierung Lagerung in Bioside 420 9C
Bearbeiter: Bayer, Michaela

01.09.2009, 15:16, Formal (z.B. Schreibfehler):
Verlinkung SOP_BW_Asidon
Bearbeiter: Bayer, Michaela

Das vollständige Änderungsprotokoll finden Sie im Internet.

Kontakt

Sargsyan, Karine

Freigeber

Tiran, Andreas

Autor

Friedrich, Barbara

Operativer Freigeber:

Tiran, Andreas

Original-Verteiler:

LKH/GRA/Kliniken/ZMF/BB

Zugestellt am:

10.06.2010

Frist:

Themen:

Lehre und Forschung


Kategorien:

keine

Prozesszuordnung:

keine

Hinweis: Nur die Online-Version im Internet ist die aktuellste und gültige.

	O-FIS Qualitätsmanagementsystem	SOP_FEK_BB
		Seite 1 von 4
Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D)		

1. Zweck: SOP für den Schnellschnitt und die Probenasservierung von Kryoproben für die Biobank am Institut für Pathologie.

2. Geltungsbereich:

- Biobank (BB)
- Institut für Pathologie (IP)

3. Zuständigkeit:

- Hauptverantwortliche/r; siehe Personalmatrix O-FIS
- Stellvertreter/in; siehe Personalmatrix O-FIS


4. Ablauf/Vorgehensweise:


4.1. Material/Geräte/Chemikalien:


- 2 Dewar-Gefäße
- Dewar mit Röhrchen-Halterung (Fa. Askion)
- Flüssiger Stickstoff
- Becherglas
- Methylbutan
- Kryo-Röhrchen (mit 2D-Barcode)
- Pinzette
- Messer
- Handschuhe
- Handheld Inkl. Home-Base (z.B. Dolphin 7600)
- Stickstofftank C-Line Hermetic Storage der Fa. Askion
- Stickstofftank Biosafe 420 SC der Fa. Messer

4.2. Verständigung und Abholung:

- Am Vortag werden anhand des OP-Programms relevante Operationen ausgewählt, sowie der dafür notwendige IC eingeholt.
- Die Koordination am jeweiligen OP-Tag, welche Präparate per Schnellschnitt auf die Pathologie kommen bzw. direkt im Operationssaal abzuholen sind, erfolgt durch Absprache eines BB-Mitarbeiters mit dem verantwortlichen OP-Personal.
- Sofern kein Schnellschnitt geplant ist, wird der für das jeweilige Fachgebiet verantwortliche Fachpathologe ca. eine halbe Stunde vor der geplanten Probenentnahme durch einen BB-Mitarbeiter informiert.
- Die Abholung, der unfixierte Transport auf die Pathologie mit dem dafür notwendigen histopathologischen Einsendeformular, sowie die neuerliche Verständigung des zuständigen Fachpathologen bei Eintreffen auf der Pathologie erfolgt durch BB-MitarbeiterInnen.
- Im Falle eines Schnellschnittes wird ein BB-Mitarbeiter Ober den Piepser (Nr. 113 1666) oder telefonisch (Nr. 80460) informiert.
- Sowohl bei abgeholten, als auch bei per Schnellschnitt eintreffenden Prä-

	O-FIS Qualitätsmanagementsystem	SOP_PFK_BB Seite 2 von 4
Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D)		
<p>paraten, entscheidet der befundende Pathologe, entsprechend den Vorgaben der Sammelstrategie, ob eine entsprechende Gewebeentnahme möglich ist und gibt die Proben zur Kryoasservierung frei (Ort; Schnellschnittraum der Pathologie).</p>		
<ul style="list-style-type: none">• Das verbleibende Gewebe wird formalinfixiert und der histopathologischen Routinediagnostik überlassen.		
4.3. Probenasservierung:		
<ul style="list-style-type: none">• Man gießt etwas flüssigen Stickstoff in das offene Dewar-Gefäß• In dieses Gefäß stellt man weiters ein Becherglas mit Methylbutan (ca. 1cm hoch befüllt). Das Methylbutan muss so lange im Stickstoff verweilen, bis sich am Boden des Becherglases gefrorene Areale bilden• Währenddessen scannt man vom Befundzettel die AZ-Nummer ein; mit Hilfe dieser Nummer werden die Patientendaten erfasst (siehe AL_Handheld)• Am Handheld muss dann das entsprechende Organ, die Lokalisation, der Inhalt und die dazugehörige Diagnose ausgewählt werden• Zwecks Identifikation der Probe wird der 2D-Barcode des Kryo-Röhrchens diesen Daten zugeordnet, indem man den Barcode mit dem Handheld einliest.• Das Gewebe wird, entsprechend der Größe des Kryoröhrchens, in kleine Stücke zerteilt (besonders Fettgewebe dehnt sich stark aus wenn es gefroren ist) und in das, mit gekühltem Methylbutan befüllte Becherglas getaucht (das Gewebe gefriert sofort)• Die Röhrchen werden sofort mit dem entsprechendem Gewebe befüllt um etwaige Verwechslungen zu vermeiden, erst dann wird das nächste Gewebe abgearbeitet. Gleich nach dem Befüllen werden die Röhrchen in den flüssigen Stickstoff transferiert• Die Daten werden zur späteren Kontrolle in das „FB318 Tagesprotokoll Eingang Kryoproben (2D)“ eingetragen• Das mit den Proben gefüllte Dewar-Gefäß wird am Ende des Tages abgeholt und die mit Gewebe bestückten Kryoröhrchen werden im Transporttank gelagert, der zwischenzeitlich verschlossen wird.• Die Handhelds werden täglich in die an einen PC angeschlossene Home-Base gestellt, wodurch die Daten in die Biosample Pro-Datenbank importiert werden. Außerdem wird automatisch die Position für die Einlagerung im Askon-Tank vergeben und in die „Order list“ übertragen, falls im Handheld unter Tank „Askon“ ausgewählt wurde (siehe AL_Handheld)• Die genaue Diagnose muss allerdings nachträglich ergänzt werden (siehe SOP_DE_Biosample Pro).• Je nach Bedarf werden die Proben aus dem Transporttank (die Röhrchen werden dort in den Laden organspezifisch geordnet) an Ihre Endlagerposition im Askon- oder Biosafe 420 SC-Tank transferiert.		

	O-RIS Qualitätsmanagementsystem	SOP_PEK_BB Seite 3 von 4
Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D)		
4.4. Probenlagerung:		
<ul style="list-style-type: none">• Aus dem Transporttank werden die Röhren aus den sich daran befindlichen Boxen in ein Dewar-Gefäß überführt.		
4.4.1. Probenlagerung im Askion:		
<ul style="list-style-type: none">○ In diesem Fall wird der Dewar ins ZMF in den 3. Stock Raum 065 transportiert, wo sich der Askion-Tank befindet○ Den Askion mittels Hauptschalter einschalten und die Stickstoffzufuhr zum Arbeitsbereich (Turm) aufdrehen (siehe AL_Askion)○ Der Arbeitsraum sollte auf ca. -100°C heruntergekühlt werden (dies dauert ca. eineinhalb Stunden)○ Wenn der Turm die gewünschte Temperatur erreicht hat, werden die Proben in die Röhrenhalterung und weiters in den Dewar d. Fa. Askion eingearbeitet. Mittels der Schleuse werden diese dann in den Arbeitsraum gebracht○ Man muss dann mit den befestigten Handschuhen eingreifen und den Dewar von der Schleuse nehmen○ WICHTIG: Den Dewar so abstellen, dass er sich nicht unmittelbar auf dem zu befüllenden Rack befindet!!!○ „Order List“ öffnen und einzuordnende Röhren aus der am Bildschirm erscheinenden Liste auswählen○ Röhren mit Hilfe der Pinzette (es sind zwei im Askion positioniert, diese sollten immer in den dafür vorgesehenen Vorrichtungen gelagert werden) unter den, sich im Gerät befindlichen Scanner halten und abwarten, bis die genaue Lagerposition erscheint○ Die Probe an die angezeigte Position im Rack stellen○ Wenn alle Proben abgearbeitet sind, den Askion Tank in den Standby-Modus bringen, den PC herunterfahren und den Stickstoffhahn, der den Arbeitsraum speist, abdrehen.		
4.4.2. Probenlagerung im Biosafe 420 SC-Tank:		
<ul style="list-style-type: none">○ Proben, die in den Biosafe 420 SC-Tank gelangen, werden ebenfalls mit dem Dewar ins ZMF transportiert, allerdings in den 2.UG Raum 016○ Es gibt drei Tanks, die A,B und C genannt werden○ Die Ständer in diesen Tanks sind organspezifisch geordnet○ Vor dem Einlagern wird eine Proben-Liste aus Biosample Pro in Excel importiert; in dieser werden die genauen Daten (Ständer/Box/Position) notiert○ Die Röhren werden immer jeweils an die nächste freie Position in der, dem Organ entsprechenden Box, gestellt○ Die Excel-Liste wird zum späteren Zeitpunkt wieder in Biosample Pro reimportiert und somit sind diese Informationen dann in der Datenbank abrufbar.		

	O-RS Qualitätsmanagementsystem	SOP_PEX_BB Seite 4 von 4
	Einbringen von Kryoproben in die Biobank (2D)	
<p>5. Mitgelieferte Unterlagen:</p> <ul style="list-style-type: none">• FB318 Tagesprotokoll Eingang Kryoproben (2D)• SOP_Trans_Kryo• SOP_DE_Biosample Pro• AL_Handheld <p>6. Dokumentation der Tätigkeit:</p> <ul style="list-style-type: none">• Ausgefülltes FB318 Tagesprotokoll Eingang Kryoproben (2D), abgelegt im Ordner „Tumorbank Protokolle“ im BB-Büro am Institut für Pathologie• Biosample Pro <p>7. Änderungsdienst: Hauptverantwortliche/er</p>		
Erstellt durch: Barbara Friedrich		
Inhaltlich geprüft von: Karina Sergejev		

IHC

Immunhistochemie UCP-1 (Santa Cruz SC6528)

- Schnitte über Nacht antrocknen lassen
- Bei 60°C für 30 min in den Brutschrank
- Entparaffinieren beginnend mit
 - 2x Xylol (1x 10 min, 1x 5 min)
 - 2x 100% Ethanol (je 3 min)
 - 1x 70% Ethanol (3 min)
 - 1x 50% Ethanol (3 min)
 - Aqua dest. (3 min)
- Vorbehandlung
 - Im Druckkochtopf Pascal Dako mit Natrium-Citratpuffer pH 6.0, 0.01M (Apotheke)
 - Programm: 120°C, 2 min 50 sec
 - Abkühlen lassen für 20 min
- Blockierung der endogenen Peroxidase
 - 1% H₂O₂ in Methanol, 15 min
 - 3x 5 min spülen mit PBS
- Auftragen des 1. AK
 - Anti UCP-1 1:100 in Dako REAL™ Antibody Diluent (S2022),
 - Inkubation 1h bei RT
 - 3x 5 min spülen mit PBS
- Auftragen 2. AK
 - Multi Link swine Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/Biotin

(E0453 Dako) 1:100 in Dako REAL™ Antibody Diluent (S2022)

Inkubation 30 min bei RT

3x 5 min spülen mit PBS

- Auftropfen von UltraVision LP Detections System (Thermo Scinetific TL-125 HL) HRP –Polymer für 30 Minuten bei RT

3x 5 min spülen mit PBS

- Detektion mit AEC Substrat (DakoCytomation AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use, K3464)

Kontrolle der Reaktion unter dem Mikroskop

Stoppen mit PBS

- Färbung mit Hämalaun nach Mayer (1 min) und bläuen in heißem Leitungswasser
- Eindeckeln mit Aquatex

Silvia Schauer



UCP1 (C-17): sc-6528

BACKGROUND

The uncoupling protein UCP1 (formerly designated UCP) is an integral membrane protein unique to brown adipose tissue mitochondria. UCP1 forms a dimer that acts as a proton channel, which can uncouple oxidative phosphorylation by dissipating the electrochemical potential across the inner mitochondrial membrane. This process induces heat production in brown adipose tissue and is involved in regulation of body temperature and glucose metabolism. UCP2 is a structurally related protein that also uncouples mitochondrial respiration. It is more widely expressed in human and mouse tissues, including white adipose tissue and muscle, than is UCP. UCP2 is thought to play a role in body weight regulation.

REFERENCES

- Nickolls, D.G., et al. 1994. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol. Rev.* 74: 1-64.
- Jacobson, A., et al. 1995. Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat: Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. *J. Biol. Chem.* 270: 16250-16254.
- Hirata-Hogan, J. 1990. Brown adipose tissue thermogenesis: Interdisciplinary studies. *FASEB J.* 4: 2880-2889.
- Cassard, A.M., et al. 1990. Human uncoupling protein gene: structure, comparison with rat gene, and assignment to the long arm of chromosome 4. *J. Cell. Biochem.* 43: 255-264.
- Feuyl, C., et al. 1997. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat. Genet.* 16: 269-272.
- Jalabek, M., et al. 2004. Hydroperoxy fatty acid cycling mediated by mitochondrial uncoupling protein UCP2. *J. Biol. Chem.* 279: 6307-63102.
- Ostrowski, J., et al. 2004. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. *J. Biol. Chem.* 279: 54688-54698.
- Suh, Y.H., et al. 2004. Overexpression of silent heterodimer partner receptors impairs glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic β cells overexpressing UCP2. *J. Endocrinol.* 183: 133-144.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: UCP1 (human) mapping to 4q31.1; Ucp1 (mouse) mapping to 8 C2.

SOURCE

UCP1 (C-17) is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of UCP1 of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 μ g IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Blocking peptide available for competitive studies, sc-6528 P (100 μ g peptide in 0.5 ml PBS containing < 0.1% sodium azide and 0.2% BSA).

APPLICATIONS

UCP1 (C-17) is recommended for detection of UCP1 of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation (1-2 μ g per 100-500 μ g of total protein [1 ml of cell lysate]), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and solid phase ELISA (starting dilution 1:30, dilution range 1:30-1:3000).

Suitable for use as control antibody for UCP1 siRNA (#): sc-42680, UCP1 siRNA (m): sc-42681, UCP1 siRNA Plasmid (h): sc-42680-SH, UCP1 siRNA Plasmid (m): sc-42681-SH, UCP1 siRNA (h) Lentiviral Particles: sc-42680-V and UCP1 siRNA (m) Lentiviral Particles: sc-42681-V.

Molecular Weight of UCP1: 33 kDa.

RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2026 (dilution range: 1:2000-1:100,000) or Cruz Marker™ compatible donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2033 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blocker A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use donkey anti-goat IgG-FITC: sc-2024 (dilution range: 1:100-1:400) or donkey anti-goat IgG-TR: sc-2783 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24641.

SELECT PRODUCT CITATIONS

- Edil, V.J., et al. 2006. Abnormal mitochondrial bioenergetics and heart rate dysfunction in mice lacking very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290: H1299-H1297.
- Plum, L., et al. 2007. Enhanced leptin-stimulated F3c activation in the CNS promotes white adipose tissue remodeling. *Cell Metab.* 6: 431-445.
- Zhang, H., et al. 2010. Cross talk between insulin and bone morphogenetic protein signalling systems in brown adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 30: 4224-4233.
- Auffray, J., et al. 2012. beige differentiation of adipose deposits in mice lacking prolactin receptor protects against high-fat-diet-induced obesity. *FASEB J.* 26: 3738-3737.

STORAGE

Store at 4° C. **DO NOT FREEZE**. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

**Polyclonal Swine
Anti-Goat, Mouse, Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated
>>Multi-Link<<**
Code No./ Code/ Code-Nr. E 0458
Edition/ Ausgabe 07.11.02

ENGLISH

Intended use	<p>For <i>in vitro</i> diagnostic use.</p> <p>>>Multi-Link<< is intended for use in immunocytochemistry, immunoblotting and ELISA. The biotinylated antibody serves as an efficient "link" between a primary antibody, and avidin or streptavidin labelled with enzymes or other markers. It reacts with primary antibodies raised in a number of species, notably goat, guinea pig, mouse, rabbit, rat and sheep. The cross-reaction with human immunoglobulins and fetal calf serum proteins is negligible.</p>
Reagent provided	<p>Biotinylated, affinity-purified and strep-balanced swine antibody to goat, mouse, and rabbit immunoglobulins provided in liquid form in 0.01 mol/L phosphate, 0.15 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2.</p> <p>Concentration of specific antibodies, g/L: see label on vial.</p>
Preparation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Three individual antibodies to goat, mouse and rabbit immunoglobulins have been solid-phase absorbed with human and ox serum proteins to reduce cross-reactions with human IgG and fetal calf serum proteins to a very low level. 2. The absorbed antibodies have been further purified by affinity isolation on columns with inactivated goat, mouse and rabbit immunoglobulins, respectively. 3. After separate labelling of the three antibodies with activated biotin containing an aminocaproic acid spacer arm, the three antibodies have been carefully mixed to produce a reagent which shows an equally strong reactivity with goat, mouse and rabbit immunoglobulins in ELISA and immunocytochemistry. 4. Final quality control includes testing in immunocytochemistry, immunoblotting and ELISA to ascertain functional reactivity with goat, mouse and rabbit immunoglobulins, as well as to monitor the presence of cross-reactivity with other antigens (see below).
Immunogens	<p>Immunoglobulins, mainly IgG, isolated from goat, mouse, and rabbit sera.</p>
Specificity	<p>Biotinylated >>Multi-Link<< reacts with all immunoglobulin classes of goat, mouse and rabbit.</p> <p>The reagent cross-reacts strongly with immunoglobulins from several other species as determined by ELISA. Thus, the cross-reaction with immunoglobulins of guinea pig, rat and sheep is well over 50%, when E 0458 is used at a dilution range of 1:50-1:150. Accordingly, >>Multi-Link<< is a unique "poly-specific" secondary antibody for use with primary antibodies from generally used animal sources. The cross-reaction with human immunoglobulins, as determined by ELISA, is low, less than 2%. Cross-reaction with fetal calf serum is very low, less than 0.1%.</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> 1. For professional users. 2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing. 3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
Storage	<p>Store at 2-8 °C.</p> <p>If unexpected reactions are observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the product is suspected, contact our Technical Services.</p>
Dilution guidelines	<p>Immunocytochemistry: 1:50-1:150.</p> <p>Immunoblotting (25 ng of goat, mouse or rabbit immunoglobulin): 1:2.500-1:10.000.</p> <p>ELISA: 1:250-1:10.000.</p> <p>Unless the stability in the actual test system has been established, it is recommended to dilute the reagent immediately before use.</p>