

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie
und dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktoren: Univ.-Prof. Dr. med. Karl-Stefan Delank und Prof. Dr. med. Heike Kielstein

**Untersuchung von Immunparametern im Blut bei Patienten vor und nach
Primärendoprothetik des Hüft- und Kniegelenkes in Abhängigkeit vom
Körpergewicht**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anna-Luise Kürvers, geb. Radetzki
geboren am 07.05.1988 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. med. David Wohlrab

Prof. Dr. med. Heike Kielstein

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. David Wohlrab

2. Prof. Dr. med. Christine Stroh, Gera

3. Prof. Dr. med. Gabriela von Lewinski, Hannover

26.01.2017

13.11.2017

Wer eine Sache lebhaft im Sinn hat, macht Wirklichkeit aus ihr.

Heinrich Mann

Für Valentin

Referat

Adipositas ist ein wachsendes Gesundheitsproblem unserer aktuellen Gesellschaft. Viele Untersuchungen konnten mittlerweile nachweisen, dass es im weißen Fettgewebe zu chronisch niedrig-gradigen Entzündungsreaktionen kommt. Es soll in dieser Studie geklärt werden, ob die lokalen Entzündungsreaktionen im Fettgewebe auch systemischen Einfluss haben und Ursache für ein erhöhtes postoperatives Infektionsrisiko sind. Hierbei werden Patienten untersucht, die erstmalig eine Knie- oder Hüftendoprothese erhalten. Dabei wurden Veränderungen des Immunsystems im Rahmen der Implantation einer Knie- oder Hüftendoprothese in Abhängigkeit vom Körpergewicht analysiert. Zur Untersuchung der immunologischen Parameter erfolgte zum einen die Typisierung von Lymphozyten in B- und T-Lymphozyten (CD4+ und CD8+), sowie NK-Zellen. Hierfür wurde der Nachweis von Differenzierungsantigenen auf den Zelloberflächen herangezogen und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Des Weiteren wurden im Plasma der Patienten Zytokine, die verstärkt bei adipösen Patienten exprimiert werden, ebenso mittels Durchflusszytometrie untersucht. Insgesamt wurden 52 Patienten nach ihrem BMI in eine normalgewichtige (n=17), übergewichtige (n=18) und adipöse (n=17) Patientengruppe unterteilt. Es konnten präoperativ erhöhte IL-6, als auch CRP-Konzentrationen bei der adipösen Patientengruppe festgestellt werden. Ebenso wies diese Gruppe präoperativ erniedrigte NK- und zytotoxische T-Zell-Konzentrationen auf. Unsere präoperativen Ergebnisse bestätigen bereits bestehende Annahmen, dass adipöse Patienten entzündliche körpereigene Prozesse aufweisen. Die Ergebnisse mit einem erhöhten postoperativen Infektionsrisiko in Zusammenhang zu bringen, gelang uns allerdings nicht, da es postoperativ keine Unterschiede bezüglich des Immunstatus von adipösen zu normalgewichtigen Patienten gab. Allerdings lässt sich vermuten, dass auf Grund der veränderten immunologischen Ausgangssituation auch im weiteren Verlauf des Heilungsprozesses und der Möglichkeit von Revisionsoperationen Veränderungen bei adipösen Patienten im Vergleich zu normalgewichtigen Patienten auftreten können.

Kürvers, Anna-Luise: Untersuchung von Immunparametern im Blut bei Patienten vor und nach Primärendoprothetik des Hüft- und Kniegelenkes in Abhängigkeit vom Körpergewicht, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 67 Seiten, 2017.

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Adipositas.....	1
1.2	Das Immunsystem und Adipositas.....	2
1.2.1	Aufbau des Immunsystems.....	3
1.3	Endoprothetik in Bezug auf Adipositas und das Immunsystem.....	8
2	Zielsetzung der Arbeit.....	11
3	Material und Methoden.....	12
3.1	Material.....	12
3.1.1	Reagenzien.....	12
3.1.2	Antikörper für Durchflusszytometrie.....	13
3.1.3	Antikörper für Flowcytomix.....	13
3.1.4	Geräte und Software.....	14
3.2	Methoden.....	14
3.2.1	Studienpopulation.....	14
3.2.2	Probengewinnung.....	15
3.2.3	Probenaufarbeitung.....	16
3.2.4	Zählverfahren.....	16
3.2.5	Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper.....	17
3.2.6	Durchflusszytometrie.....	18
3.2.7	Durchflusszytometrische Messung.....	21
3.2.8	Durchflusszytometrische Auswertung.....	21
3.2.9	Flow Cytomix.....	22
3.2.10	Statistische Auswertung.....	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Alter, Körpergröße, Körpergewicht und BMI.....	24
4.2	CRP- und Leukozytenkonzentration.....	24
4.3	T- und B-Lymphozyten.....	25
4.4	NK-Zellen.....	29
4.5	Zytokine.....	35
4.5.1	Interleukin-6.....	35
4.5.2	Leptin.....	37
4.5.3	sICAM-1.....	39
4.5.4	sTNF-R.....	42
4.6	Korrelationen.....	43
5	Diskussion.....	49

6	Zusammenfassung	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Thesen	67
	Tabellarischer Lebenslauf	V
	Selbstständigkeitserklärung	VII
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	VIII
	Danksagung	IX

II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Aqua
BD	Becton Dickinson
BMI	Body Mass Index
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CCR2	chemokine receptor 2
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40 Ligand
CRP	C-reaktives Protein
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii, et aliae, et alia
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FSC	forward light scatter
g	Gramm
kg	Kilogramm
ng	Nanogramm
pg	Picogramm
g	Erdbeschleunigung
gpt	Gigapartikel
h	Stunde
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
µl	Mikroliter
LFA-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen 1
MCP	Monozyten chemoattraktives Protein
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter

MPO	Myeloperoxidase
n	Grundgesamtheit
NaN ₃	Natriumazid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
Σ	Summe
sCD40L	soluble CD40 Ligand
SD	standard deviation
SSC	side scatter
sTNF-R	soluble Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TEP	Totalendoprothese
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
usw.	und so weiter
u.v.m	und vieles mehr
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Adipositas gehört im 21. Jahrhundert zu den wichtigsten Gesundheitsproblemen der Menschheit. Die Inzidenz steigt zunehmend an (Böttner et al., 2006; Dieterle and Landgraf, 2006; Gelsinger et al., 2010). Kennzeichnend für Adipositas ist die Vermehrung von Fettgewebe, das neben den wichtigen evolutionären Aufgaben als Energiespeicher, mechanischer Schutz und Wärmeisolator auch mittlerweile als eigenständiges aktives endokrines Organ mit Produktion einer Vielzahl von Peptidhormonen (Adipozytokine) anerkannt ist (Gelsinger et al., 2010; Offermanns, 2012; Spitzweg et al., 1998; Trayhurn, 2005).

Die Zunahme der Fettgewebsmasse wird begründet durch eine zu hohe Energiezufuhr und mangelnde körperliche Bewegung (Offermanns, 2012). Die pathogenetischen Faktoren sind allerdings nur unvollständig bekannt.

Dem Fettgewebe wird eine zunehmende Rolle in der Regulation zentraler und metabolischer Prozesse zugeschrieben, wie zum Beispiel die Kontrolle von Appetit und Sättigung, körperliche Aktivität, Fettverteilung, Insulinsensitivität und –sekretion, Energieumsatz und auch Entzündungsprozessen (Gelsinger et al., 2010; Spitzweg et al., 1998).

Zur Klassifikation der Adipositas wurde der Body Mass Index (BMI) eingeführt, der sich aus dem Quotienten Körpergröße (kg) und Körpergewicht² (m²) berechnet (Tab. 1).

Tabelle 1: Klassifikation der Adipositas nach WHO 2004

Gewichtsklassifikation	BMI (kg/m ²)
Normalgewicht	18,5 – 24,9
Übergewicht	25,0 – 29,9
Adipositas Grad I	30,0 – 34,9
Adipositas Grad II	35,0 – 39,9
Adipositas Grad III	≥ 40,0

Im klinischen Alltag wird der BMI als grobes Maß für die Körperfettverteilung genutzt. Adipositas muss als bedeutendes Gesundheitsproblem angesehen werden, da es das Risiko für Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus Typ 2, Fettlebererkrankungen, Fettstoffwechselstörungen) und kardiovaskuläre Erkrankungen (arterielle Hypertonie, koronare Herzerkrankung, Schlaganfall), aber auch bestimmte Tumorerkrankungen erhöht (Lehnert and Reincke, 2015).

Die endokrine Funktion des Fettgewebes zeigt sich durch die Produktion von Adipozytokinen, die sich je nach Aufgabe in Zytokine, Chemokine und hormonähnliche Stoffe unterscheiden lassen. Dazu gehören z. B. TNF- α , IL-6, -10, -18, MCP-1, Resistin, Progranulin, Leptin, Adiponektin, Vaspin, Omentin, Lipocalin und viele mehr. In den letzten Jahren sind circa 600 Adipozytokine entdeckt wurden (Fagerer and Kullich, 2010; Gelsinger et al., 2010; Spitzweg et al., 1998).

Diese Adipozytokine haben durch ihre auto- und parakrinen, sowie endokrinen Wirkungen Bedeutung bei der Adipogenese, Fettzellfunktion und Immunzellinfiltration im Fettgewebe (Böttner et al., 2006; Gelsinger et al., 2010; Kershaw and Flier, 2004). Es konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass bei der Sekretion der Adipozytokine auch eine Vielzahl an Entzündungsmediatoren freigesetzt werden. Man geht heute davon aus, dass das weiße Fettgewebe bei adipösen Menschen durch chronische, niedriggradige Entzündungen charakterisiert wird (Cooke et al., 2016; Trayhurn, 2005).

Die sezernierten Adipozytokine zirkulieren im Serum und entfalten definierte metabolische und immunmodulierende Wirkungen. Eine Reihe hochaktiver Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-6, Faktoren des Komplementsystems, Wachstumsfaktoren u.v.m. werden von Adipozyten produziert und freigesetzt (Choe et al., 2016; Gelsinger et al., 2010). Dies wird wiederum durch Adipositas beeinflusst, wodurch wiederum weitere Entzündungsmediatoren freigesetzt werden können. Neben den Adipozyten finden sich im viszeralen Fettgewebe aber auch Immunzellen, Fibrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, die wiederum immunmodulierende Botenstoffe freisetzen (Choe et al., 2016; Cooke et al., 2016; Kintscher et al., 2008; Trayhurn, 2005).

Die Serumspiegel einiger der Adipozytokine korrelieren zur Fettgewebsmasse. Zum Beispiel steigt der Leptin-Serumspiegel mit zunehmender Körperfettmasse an, während der Adiponektinspiegel fällt. Es gibt bisher für die Adipozytokine allerdings keine verbindlichen Grenzwerte (Gelsinger et al., 2010; Schäffler et al., 2015).

Es ist davon auszugehen, dass im viszeralen Fettgewebe, welches für die Adipositasforschung das wichtigste Untersuchungsmaterial darstellt, gestörte Fettgewebefunktionen auftreten, die sich histologisch durch das vermehrte Auftreten von Immunzellen (insbesondere den sogenannten Fettgewebsmakrophagen) bemerkbar machen (Blüher, 2014).

1.2 Das Immunsystem und Adipositas

Die Freisetzung der entzündungsfördernden Mediatoren aus dem Fettgewebe lösen nicht nur lokal Inflammationsprozesse aus, sondern führen im gesamten Organismus

zu entzündlichen Prozessen, die durch das menschliche Immunsystems aufgefangen werden müssen (Trayhurn, 2005).

1.2.1 Aufbau des Immunsystems

Man unterteilt das Immunsystem in ein angeborenes und erworbenes bzw. unspezifisches und spezifisches Immunsystem.

Das Antigen-unspezifische Immunsystem wird unabhängig vom jeweiligen Erreger aktiviert. Auf zellulärer Ebene gehören Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem, sowie die Natürlichen Killer-(NK-) Zellen zum Repertoire des unspezifischen Immunsystems (Pezzutto, 2007).

Das spezifische Immunsystem besteht aus B- und T-Lymphozyten und besitzt im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem ein Gedächtnis, welches Reinfektionen verhindern kann (Rink et al., 2012a).

Zur Unterscheidung der einzelnen Zellen dient die unterschiedliche Expression von Differenzierungsantigenen. Diese Differenzierungsantigene werden als Cluster of Differentiation (CD) bezeichnet und werden zur quantitativen Analyse der Lymphozytensubpopulationen genutzt (Neumeister and Böhm, 2015).

Zur Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und Antigenerkennung der T-Lymphozyten sind der T-Zell-Rezeptor (TZR) und weitere Hilfsmoleküle nötig (Pezzutto, 2007). Die CD3 Molekülgruppe ist eng mit dem TZR assoziiert und wird zur Identifizierung von T-Lymphozyten bei laborchemischen Analysen eingesetzt (Rink et al., 2012b).

In der Peripherie werden die T-Lymphozyten nach ihrer Funktion und Ausbildung von spezifischen Oberflächenmolekülen unterschieden. Etwa 50-80% der T-Lymphozyten exprimieren CD4-Moleküle. Man unterscheidet diese weiterhin in 2 Untergruppen, die aber beide über ihren TZR Antigene auf Antigen-präsentierenden Zellen in Bindung mit MHC-Klasse-II-Molekülen erkennen. Typ 1 und Typ 2 sind klassische Helferzellen, die eine spezifische Immunantwort zentral durch Aktivierung von Makrophagen und B-Lymphozyten regulieren.

Die verbleibenden 20-50% exprimieren die Oberflächenmoleküle CD8 und sind damit zytotoxisch tätig. Ihr TZR identifiziert das mit einem Peptid beladene MHC-Klasse-I-Molekül einer infizierten Zelle und kann diese durch Freisetzung von großen Mengen entzündungsfördernder Zytokine wie TNF und $\text{INF-}\gamma$ zerstören (Pezzutto, 2007).

Es finden sich vermehrt Studien, die ein verstärktes Auftreten von T-Lymphozyten auf Grund der Zytokin- und Chemokinfreisetzung der Adipozyten im Fettgewebe feststellen konnten (Kintscher et al., 2008; Wu et al., 2007).

Auf der Oberfläche der B-Lymphozyten befinden sich Antigenstrukturen. Diese werden als Immunglobuline bezeichnet, die bei Bedarf in das Blut abgegeben werden können. Die B-Lymphozyten können auf Grund der unterschiedlichen Spezifität der Immunglobuline eine Vielzahl von Antigenen erkennen (Schütt and Bröker, 2011).

Auch B-Lymphozyten sind in der Lage durch Quervernetzung der membranständigen Immunglobuline mit einem Antigen, dieses zu phagozytieren und letztendlich auf Ihrer Oberfläche zu präsentieren (Rink et al., 2012b).

Damit sich aus einem B-Lymphozyt eine Immunglobulin-bildende Plasmazelle entwickelt, benötigen B-Lymphozyten Signale von T-Helfer-Lymphozyten, die ebenfalls das gleiche Antigen gebunden haben (gekoppelte Erkennung).

CD 19 Antigene befinden sich auf der Oberfläche aller B-Zellen und sind somit ein Marker für die B-Zellen. Sie bilden zusammen mit weiteren Molekülen einen Komplex, der die Signalübertragung am B-Zell-Rezeptor moduliert (Rink et al., 2012b).

NK-Zellen stellen ein Bindeglied zwischen erworbener und angeborener Immunabwehr dar. NK-Zellen sind in der Lage fremde, virusinfizierte oder Tumorzellen ohne Aktivierung zu töten (Rink et al., 2012a).

Unreife NK-Zellen exprimieren lediglich CD 161, reife NK-Zellen hingegen besitzen CD 94, das Adhäsionsmolekül CD 56 und CD 16 (Pezzutto, 2007). Einen spezifischen Marker besitzen sie allerdings nicht. Man charakterisiert sie durch das Vorhandensein von CD56 und CD 16 und das Fehlen von CD3. Durch das Fehlen von CD3 lässt sich eine Unterscheidung zu den NKT-Zellen nachvollziehen (Rink et al., 2012b).

NK-Zellen setzen lytische Granula frei und können über Ligandenbindung apoptotische Vorgänge auslösen. Die zytotoxische Granula ist für den ausführenden zytolytischen Mechanismus der NK-Zellen verantwortlich (Rink et al., 2012c).

NK-Zellen können durch Signale an Ihren Rezeptoren aktiviert oder inhibiert werden (Pezzutto, 2007). Die Aktivität der NK-Zellen wird durch die Balance der Signale der beiden Rezeptorgruppen (aktivierend oder inhibierend) erzeugt.

Humane NK-Zellen kann man in mindestens 2 Subpopulationen untergliedern. Im Blut exprimieren mindestens 90% der zirkulierenden NK-Zellen nur wenig CD56 (CD56dim CD16+). Allerdings findet man auch Zellen, die wesentlich mehr CD56 auf Ihrer Oberfläche exprimieren als CD16 (CD56 bright CD16-). Die Mehrzahl der NK-Zellen (CD56 dim) ist verantwortlich für die klassische Funktion der Zytotoxizität. Der kleinere Anteil (CD56 bright) kann durch Zytokine mit Immunzellen kommunizieren und so Einfluss auf das spezifische Immunsystem nehmen (Rink et al., 2012c).

Verschiedene Gruppen haben den Einfluss von Adipositas und Adipokinen, insbesondere Leptin, auf die Funktion und Differenzierung von NK-Zellen untersucht (Spitzweg et al., 1998; Tian et al., 2002; Wrann et al., 2012).

Zytokine werden als eine Gruppe von Proteinen und Glykoproteinen betrachtet, die die Zelldifferenzierung und –proliferation modulieren können. Vorwiegend werden sie von Zellen des retikuloendothelialen Systems zur Immunmodulation, Regulation entzündlicher Prozesse und als Reaktion auf eine lokale Schädigung gebildet.

Die Wirkung von Zytokinen ist hormonähnlich und ihre Sezernierung erfolgt meist erst nach Stimulation der sezernierenden Zelle. Das Wirkspektrum reicht von Entzündungsbekämpfung, Immunabwehr über Gewebsreparatur, Kontraktilität von Herz und Gefäßen bis hin zur Aufrechterhaltung von Körperfunktionen und Aktivierung von Apoptose und Zelltod. Die Klassifikation der Zytokine orientiert sich an ihrer Funktion im menschlichen Körper (Pezzutto, 2007).

Im Folgenden werden die für die vorliegende Untersuchung relevanten Zytokine, assoziierten Rezeptoren und andere auf das Immunsystem Einfluss nehmende Enzyme näher erläutert.

CD40 Liganden (CD40L) gehört zu den Tumornekrosefaktoren. CD40L werden auf der Oberfläche von aktivierten CD4+-T-Lymphozyten, basophilen Granulozyten und Mastzellen exprimiert. Es findet sich in der Blutzirkulation ein löslicher CD40L (sCD40L). Dieses lösliche Molekül ist in der Lage B-Lymphozyten vor der Apoptose zu schützen (Apple et al., 2005). sCD40L in erhöhter Konzentration wurde bei Autoimmunerkrankungen, Multiple Sklerose, entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes, Schlaganfall und Hypercholesterinämie gefunden (Fu et al., 2013).

ICAM-1 ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Es dient als Ligand für das Lymphozytenfunktion-assoziierte Antigen 1 (LFA 1). Dieses ist ein Integrin, welches die Lymphozyten-Adhäsion vermittelt. ICAM-1 scheint ein initialer Marker für Entzündungsreaktionen zu sein. Es ist in die Lipidsynthese involviert und wird von humanen Adipozyten bei Stimulation der Lipolyse exprimiert (Brake et al., 2006, 2006, p. -1; Byun et al., 2014; Christoph et al., 2016; Kvasnicka et al., 2003; Wang et al., 2005; Witkowska, 2005).

Interleukin-6 wird von einer Vielzahl von Immunzellen gebildet wie z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen, Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Muskelzellen. Dabei hat es eine proinflammatorische Funktion. Es ist ein Vermittler der Akute-Phase-Reaktion. Erhöhte IL-6 Konzentrationen weisen auf ein entzündliches Geschehen hin. Ein chirurgisches Trauma und die verwendete Anästhesie bewirken beim Patienten eine transiente Immunsuppression, die postoperativ zu einer Infektion führen kann. Es wurde gezeigt, dass sich die IL-6 Konzentration postoperativ proportional zum chirurgischen Stress verhält. Je höher die Gewebsschädigung desto höher auch die IL-6 Konzentration (Brand et al., 1998; Lahat et al., 1992; Sweed et al., 1992). Außerdem ist IL-6 ein Mediator der niedriggradigen chronischen Entzündungsreaktionen bei

Adipositas. Viszerales Fett produziert mehr IL-6 als subkutanes, so dass Patienten mit Adipositas und einem erhöhten Hüftumfang auch erhöhte IL-6 Serumspiegel haben (White and Stephens, 2011).

Leptin spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung von Energieaufnahme und –verbrauch. Es ist den Zytokinen ein strukturell ähnliches Protein. Sezerniert und produziert wird Leptin von Adipozyten. Die Konzentration im Serum korreliert mit der Fettgewebssmasse und dem Ernährungsstatus. Während der Pubertät verändert sich der Leptinspiegel. Testosteron inhibiert die Produktion von Leptin, so dass die Konzentration bei Jungen niedriger ist als bei Mädchen (Fischer-Posovszky, 2010). Kommt es zur Reduktion der Körperfettdepots (insbesondere des abdominellen viszeralen), kommt es auch zur Senkung des zirkulierenden Leptinspiegels, was daraufhin wiederum zu einer Zunahme des Appetites führt. Aufgrund der beschriebenen Funktion wurde Leptin als Medikament gegen Adipositas eingesetzt, führte aber nicht zu den erhofften Ergebnissen. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sich bei adipösen Menschen eine Leptinresistenz entwickelt hat (Bouret et al., 2004; Clément et al., 1998; Koistinen et al., 1998). Es gibt diesbezüglich unterschiedliche Theorien. Zum einen wird vermutet, dass der Transporter, der das Leptin über die Blut-Hirn-Schranke befördert, sättigbar ist und deshalb nicht genügend Leptin im Hypothalamus wirken kann (Koistinen et al., 1998). Zum anderen wird über eine verminderte Zahl leptinsensitiver Neurone im Hypothalamus (Bouret et al., 2004), Mutationen des Leptinrezeptors (Clément et al., 1998) oder des Leptintransporters diskutiert. Einen direkten Einfluss von Leptin auf Aktivierung, Proliferation, Reifung und Produktion von Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten konnte in vitro gezeigt werden (Fantuzzi, 2009; Lam and Lu, 2007). Es wurde weiterhin festgestellt, dass bei Infekten erhöhte Leptinspiegel gemessen werden (Fagerer and Kullich, 2010).

Resistin wird von Monozyten/Makrophagen, Knochenmark und Adipozyten exprimiert. Als hochmolekulares Hexamer zirkuliert es im Plasma, obwohl der niedrigmolekulare Komplex als die aktivere Form gilt. Proinflammatorische Zytokine (wie z.B. IL-6) steigern die Expression von Resistin (Kaser et al., 2003). Der Serumspiegel ist im Tiermodell bei Adipositas erhöht (Steppan et al., 2001). Im menschlichen Fettgewebe ist es im Gegensatz zur Maus kaum nachweisbar. Es wird angenommen, dass Resistin ein potenter Aktivator von Endothelzellen ist. Somit kann Resistin eine mechanistische Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen spielen (Gelsinger et al., 2010).

Das Monozyten Chemoattraktive Protein 1 (MCP-1) ist auf Grund seines Namens nicht nur chemoattraktiv auf Monozyten, sondern auch auf T-Lymphozyten und NK-Zellen

wirkend. Es gehört zur Chemokin-Familie. Zum Großteil wird MCP-1 durch Makrophagen in Reaktion auf Zytokine wie IL-6 oder TNF- α freigesetzt, aber auch durch Fibroblasten, Endothelzellen, bestimmten Tumorzellen und Adipozyten (Sartipy and Loskutoff, 2003). Der Hauptrezeptor für MCP-1 ist CCR2, der von verschiedenen Zelltypen einschließlich Adipozyten exprimiert wird (Takahashi et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MCP-1 im weißen Fettgewebe in Tierversuchen bei adipösen Individuen im Vergleich zu normalgewichtigen hochreguliert wird. Bei fettleibigen Nagern wurde festgestellt, dass mit höherer MCP-1 Konzentration eine umso höhere Monozytenkonzentration im Fettgewebe einhergeht (Takahashi et al., 2003). Weiterhin geht man davon aus, dass MCP-1 einen Einfluss auf die Reifung und Differenzierung von Adipozyten hat. MCP-1 mit der Hauptaufgabe der Rekrutierung von Monozyten trägt zur Initiierung und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktionen im Fettgewebe bei (Sartipy and Loskutoff, 2003).

Der Tumornekrosefaktor ist ein Zytokin, das von Makrophagen und Monozyten im Gewebe und Blut freigesetzt wird. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Initiierung der Immunantwort. TNF-Rezeptoren wurden auf einer Vielzahl menschlicher Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Adipozyten, Granulozyten und verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen (Pezutto, 2007). Das extrazelluläre also lösliche Fragment des TNF-Rezeptors ist vom intakten Molekül durch proteolytische Spaltung abgespalten. Hohe Serumlevel von löslichen TNF-Rezeptor (sTNF-R) wurden bei Patienten mit Tumorerkrankungen, Sepsis und Autoimmunerkrankungen festgestellt. sTNF-R wird als guter Marker für die Schwere einer Sepsis angesehen (Fraunberger et al., 1996). Die pathophysiologische Rolle der sTNF-R ist bislang noch ungeklärt. In vitro wurde gezeigt, dass sie TNF binden können. Die Serumspiegel löslicher TNF-Rezeptoren korrelieren auch mit dem Stadium von verschiedenen Tumorerkrankungen (Fraunberger et al., 2001). Es gibt unterschiedliche Studien in Bezug auf sTNF-R und Adipositas. In einigen zeigte sich kein Unterschied in der Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht (Olszanecka-Glinianowicz et al., 2004), in anderen weisen adipöse Probanden einen höheren Serumspiegel auf (Dzienis-Straczowska et al., 2003).

Osteoprotegerin (OPG) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, das von Osteoblasten exprimiert wird. OPG übernimmt Aufgaben im Knochenstoffwechsel z.B. bei der Hemmung der Knochenresorption. Außerdem übernimmt OPG eine Rolle innerhalb des Immunsystems, in dem es die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten reguliert. OPG wird vermehrt in glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen exprimiert (Ashley et al., 2011). In Tierstudien zeigte sich bei OPG-defizienten Mäusen eine schwere Aorten- und Nierenverkalkung, die Bedeutung von

OPG im Gefäßsystem ist noch nicht vollständig verstanden (Bucay et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass adipöse Patienten niedrigere OPG Spiegel aufweisen als Normalgewichtige (Ashley et al., 2011). Die Rolle von Adipositas bezüglich der Regulation der zirkulierenden Serumspiegel von OPG ist noch unklar. Es gibt Studien, die keinen Zusammenhang zwischen Adipositas und OPG zeigen (Gannagé-Yared et al., 2008, 2006).

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Glykoprotein, das in allen Zellen der myeloiden Abstammungslinie exprimiert wird. Man findet es vermehrt in den Granula von neutrophilen Granulozyten (Nijhuis et al., 2009). MPO erzeugt eine Vielzahl an Radikalen und Oxidantien, die oxidative Schäden an Proteinen, Lipoproteinen, Lipiden und der DNA der Zielzellen verursachen. Es wird davon ausgegangen, dass das Ergebnis der von MPO gesteuerten Katalyse eine zentrale Rolle in der Ätiologie der Atherosklerose spielt (Anatoliotakis et al., 2013). In Zusammenhang mit Adipositas wurde gezeigt, dass es zu erhöhten Plasmaspiegeln von MPO kommt, wodurch auszugehen ist, dass das angeborene Immunsystem verstärkt aktiviert wird und auch MPO zu einer chronischen Entzündungsreaktion bei adipösen Menschen beiträgt (Nijhuis et al., 2009).

1.3 Endoprothetik in Bezug auf Adipositas und das Immunsystem

Das Immunsystem besitzt die Aufgabe den Organismus vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen (Pezzutto, 2007).

Auch ein künstliches Gelenk stellt einen Fremdkörper dar, der zu immunologischen Konsequenzen führen kann. Die Oberflächen einer Endoprothese sind anfällig für eine bakterielle Besiedlung. Bakterielle Erreger haben eine hohe Adhärenz an die verwendeten Implantatmaterialien (Pap and Meinecke, 2011). Zum einen besteht die Gefahr eines bakteriellen Befalls des Implantates und zum anderen stellt das Einsetzen eines Kunstgelenkes einen Eingriff in das immunologische Gleichgewicht des Körpers dar (Nordström et al., 1994). Der Erfolg des Immunsystems ist abhängig von dem Zusammenspiel verschiedener mobiler Immunzellen, Botenstoffe, Antikörper und modulierender Proteine (Rink et al., 2012a).

Die Gesamtzahl der endoprothetischen Hüft- als auch Kniegelenkeingriffe hat in den zurückliegenden Jahren weltweit zugenommen. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes wurden in Deutschland im Jahr 2013 210.384 Hüftendoprothesen erstmalig implantiert, sowie 138.506 Knieendoprothesen. Die Hüfttotalendoprothesen-Implantation zählt auf Platz 8 zu den 20 häufigsten Operationen in deutschen Kliniken (Halder et al., 2012).

Die häufigste Ursache, die zu einer Endoprothesenimplantation am Knie- oder Hüftgelenk führt, ist die Arthrose (Halder et al., 2012; Pap and Meinecke, 2011). Als Arthrose wird eine progrediente, primär nicht entzündliche, degenerative Gelenkerkrankung bezeichnet, bei der es zur Zerstörung des Gelenkknorpels, anderer Gelenkanteile und sekundärer Knochenläsion kommen kann (Herold, 2013).

Es wird zwischen einer primären und einer sekundären Arthrose unterschieden. Die primäre Arthrose oder auch idiopathische Arthrose weist keine erkennbare Ursache auf, meist liegt eine anlagebedingte Minderwertigkeit des Gelenkknorpels vor. In Fällen, bei denen eine andere Erkrankung der Arthroseentstehung zugrunde liegt, spricht man von sekundärer Arthrose. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass die Arthrose das Ergebnis eines auf der einen Seite destruktiven auf der anderen Seite reparativen Prozesses ist, der durch eine große Anzahl von biochemischen und physikalischen Faktoren beeinflusst wird.

Einer der Hauptrisikofaktoren für eine Arthrose ist Adipositas. Die Assoziation zwischen Osteoarthrose in den gewichttragenden Gelenken und dem BMI konnte in zahlreichen Studien belegt werden (Conde et al., 2013; Griffin and Guilak, 2008; Koonce and Bravman, 2013). Früher wurde vermutet, dass allein die verstärkte Belastung des Gelenkes und die biomechanischen Veränderungen die Ursache für die gehäuft bei adipösen Menschen auftretende Arthrose ist. Gerade gewichttragende Gelenke wie Hüfte und Knie zeigen einen vermehrten Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Osteoarthrose und des BMI. Die biomechanischen Veränderungen schließen Probleme der Gelenkstabilität und Auftreten von Lastenverschiebungen ein. Allerdings wird immer mehr eine Interaktion zwischen mechanischen und Entzündungsfaktoren diskutiert. Denn auch das Risiko zur Entwicklung einer Arthrose in nicht-gewichttragenden Gelenken wie das Handgelenk ist bei adipösen Menschen erhöht (King et al., 2015). Es wurde in den letzten Jahren in vielen Studien gezeigt, dass das Fettgewebe proinflammatorische Zytokine freisetzt, die bei der Arthrose eine Schlüsselrolle spielen. Adipozytokine haben Einfluss auf Zellen und Gewebe, die bei der Arthrose beteiligt sind, wie Knorpel, Synovia und Knochen. Die meisten Studien haben sich dabei auf Leptin fokussiert (Griffin and Guilak, 2008). Leptinrezeptoren werden unter anderem auf der Oberfläche von Chondrozyten und subchondralen Osteoblasten exprimiert (Figenschau et al., 2001; Simopoulou et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Chondrozyten von adipösen Arthrosepatienten ein anderes Reaktionsmuster auf Leptin aufweisen als über- oder normalgewichtige Patienten (Pallu et al., 2010). Nach Gewichtsreduktion konnte eine Veränderung der Konzentration der zirkulierenden Adipozytokinen festgestellt werden, die einhergehen mit einer Reduktion des Knorpelgewebsschadens (King et al., 2015). Auch konnte

festgestellt werden, dass erhöhte Serumkonzentrationen von Zytokinen wie IL-6 und TNF mit einer erhöhten Prävalenz für Kniearthrose in Verbindung stehen (Stannus et al., 2010). Bisher wurde allerdings das Hauptaugenmerk auf Leptin und Adipokin gelegt und sich weniger auf die im Körper zirkulierenden Immunzellen und weiteren Adipozytokine konzentriert. Hierbei sind insbesondere die Patienten von Interesse, die sich bereits im fortgeschrittenen Stadium der Arthrose befinden und denen nur die ultima ratio Therapie mittels Implantation eines Kunstgelenkes helfen kann. Es stellt sich die Frage, ob adipöse Patienten vor und nach Implantation eines künstlichen Gelenks immunologisch anders reagieren als über- oder normalgewichtige Patienten. Adipositas wird zudem als Risikofaktor für periprothetische Infektionen und das Versagen von Osteosynthesen gesehen (Winkler et al., 2014), was vermuten lässt, dass adipöse Patientinnen und Patienten demnach häufiger eine Revisionsendoprothetik benötigen müssten. Dies ist nicht alleine auf die mechanische sondern auch auf die verstärkte immunologische Belastung zurückzuführen.

2 Zielsetzung der Arbeit

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass das Fettgewebe auf Grund seiner parakrinen und endokrinen Eigenschaften zu einer chronischen Entzündung im Körper von adipösen Menschen führt.

Bisher wurde untersucht, wie sich das Immunsystem von adipösen Patienten im Vergleich zu Normalgewichtigen im „gesunden“ Zustand verhält.

Mit Hilfe dieser Studie soll untersucht werden, ob sich bei adipösen Patienten

1. das Immunsystem vor und nach operativen Eingriffen im Vergleich zu übergewichtigen und normalgewichtigen Patienten im Allgemeinen anders verhält.
2. nach einem großen chirurgischen Eingriff wie einer Knie- oder Hüfttotalendoprothetik veränderte Mengen an T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen und bestimmten proinflammatorischen Zytokinen zeigen lassen, die im Vergleich zu Normalgewichtigen auf einen verstärkten Entzündungsprozess hindeuten.
3. Operateure mit einem grundsätzlich höheren Revisionsrisiko auseinandersetzen müssen, da sie ein verändertes und damit am ehesten aktiveres Immunsystem aufweisen als normalgewichtige Patienten.

Diese Arbeit soll deshalb die Basis für weiterführende Untersuchungen bei adipösen Patienten darstellen, um in Zukunft die Gefahr einer Revisionsoperation besser einschätzen zu können und die Patienten diesbezüglich besser aufzuklären.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

<p style="text-align: center;">Schwinzer Lyse</p> <p style="text-align: center;">8,4g NH₄Cl / 0,1g EDTA / 1,0g KHCO₃</p> <p style="text-align: center;">in 1l Aqua dest.</p>
<p style="text-align: center;">PBS</p>
<p style="text-align: center;">Trypanblau</p>
<p style="text-align: center;">Waschpuffer</p> <p style="text-align: center;">9,55 g Dulbeccos 1x PBS / 10g BSA (1%) / 1g NaN₃ (0,1%)</p> <p style="text-align: center;">in 1l Aqua dest.</p>
<p style="text-align: center;">Messpuffer</p> <p style="text-align: center;">9,55g Dulbeccos 1x PBS / 1g BSA (0,1%) / 1g NaN₃ (0,1%)</p> <p style="text-align: center;">in 1l Aqua dest.</p>
<p style="text-align: center;">Flowcytomix Human Obesity 9 plex Kit</p> <p style="text-align: center;">Assay Buffer (PBS / 10% BSA)</p> <p style="text-align: center;">Streptavidin-Phycoerythrin</p> <p style="text-align: center;">Reagent Dilution Buffer</p> <p style="text-align: center;">Antikörper Beads</p> <p style="text-align: center;">Biotin-konjugierte Antikörper</p>

3.1.2 Antikörper für Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Detektierte Zellpopulation	Typ	Hersteller	Verdünnung (mit Waschpuffer)
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD3	T-Lymphozyten	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:50
APC Mouse Anti-Human CD4	T-Helferzellen	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:250
PE Mouse Anti-Human CD8	Zytotoxische T-Zellen	Mouse IgG1, κ	BD Biosciences	1:500
APC-H7 CD20	B-Lymphozyten	IgG ₁ , κ	BD Biosciences	1:50
APC CD56	NK-Zellen	IgG _{2b} , κ	BD Biosciences	1:100

3.1.3 Antikörper für Flowcytomix

Bezeichnung
sCD40L
sICAM-1
IL-6
Leptin
MCP-1

MPO
OPG
Resistin
sTNF-R

3.1.4 Geräte und Software

Durchflusszytometer LSR II

FacsScan, Becton Dickinson

FacsDiva Software

Becton Dickinson

3.2 Methoden

3.2.1 Studienpopulation

Grundsätzlich gilt für alle weiteren Abschnitte dieser Arbeit, dass zur sprachlichen Vereinfachung das Wort „Patienten“ sowohl für Patienten als auch Patientinnen verwendet wird.

Für diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die eine primäre Hüft- oder Knie totalendoprothese erhielten. Für die regelrechte Verteilung bezüglich Geschlecht, Gewicht und Lokalisation des künstlichen Gelenkes wurden die Patienten entsprechend ausgewählt.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität am 16.03.2012 genehmigt.

Innerhalb dieser Population erfolgte eine Unterteilung nach Body-Mass-Index (Gewicht/Größe² in kg/m²). Die Patienten mit einem Body-Mass-Index (BMI) von < 25 kg/m² wurden der Gruppe „normalgewichtig“ zugeteilt, Patienten mit einem BMI ≥25 kg/m² und <30 kg/m² der Gruppe „übergewichtig“ und Patienten mit einem BMI ≥30 kg/m² der Gruppe „adipös“. Sowohl prä- als auch postoperativ erfolgte jeweils eine Blutentnahme.

Des Weiteren wurden die Werte für CRP und die Leukozytenanzahl bei jedem Patienten prä- und postoperativ durch die routinemäßige Blutentnahme bestimmt. Die Patientenpopulation setzt sich aus 52 Patienten zusammen. Die Gruppe umfasst 25 männliche und 27 weibliche Patienten. Es sind darin sowohl 26 Hüft- als auch 26 Knie totalendoprothesen eingeschlossen.

Tabelle 2: Verteilung der Probanden nach Geschlecht und BMI-Gruppe

	Normalgewichtig	Übergewichtig	Adipös	
Männer	10	9	6	25
Frauen	7	9	11	27
	17	18	17	

Die Patienten wurden nach den folgenden genannten Einschlusskriterien und dem Fehlen der Ausschlusskriterien ausgewählt.

Einschlusskriterien

- Vorliegen der Einverständniserklärung zur Studienteilnahme
- Alter 40-80 Jahre

Ausschlusskriterien

- Ablehnung der Studienteilnahme
- nachgewiesene gelenkferne (akute oder chronische) Infektionsherde
- Erkrankungen des Stoffwechsels (z.B. Diabetes mellitus)
- Erkrankungen des Endokriniums (z.B. schwere Hyper-/Hypothyreose)
- bestehende Immunsuppression (angeboren oder erworben)

3.2.2 Probengewinnung

Es wurde peripheres, venöses Blut aus den Kubitalvenen der Patienten mit gewöhnlichen Kanülen in Heparin-Lithium-Röhrchen entnommen. Die Patienten waren dabei nüchtern. Bei der präoperativen routinemäßigen Blutentnahme 3 ± 2 Tage vor der Operation wurde den Patienten zusätzlich circa 2,7ml Blut entnommen und ebenso einmalig 5 ± 2 Tage postoperativ. Die Blutentnahme erfolgte jeweils in ein Heparinröhrchen. Es konnte bei der Untersuchung kein standardisierter Zeitpunkt der Blutentnahmen festgelegt werden, so dass die Entnahmen um ± 3 Tage schwankten, was in Hinblick auf CRP und Leukozytenmessung, aber auch bezüglich Lymphozytendifferenzierung und Zytokinmessung Schwankungen erklären und eine absolut einheitliche Betrachtung der Ergebnisse erschweren kann.

Das Blut wurde möglichst unmittelbar, spätestens aber 6h nach Blutentnahme bearbeitet, da danach die Vitalität der Zellen rasch abnimmt.

3.2.3 Probenaufarbeitung

Zur Herstellung von Plasma wurden 500ml des entnommenen Blutes pipettiert und bei 4°C und 1000g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C bis zur Verarbeitung für das Flowcytomix gelagert. Das restliche Vollblut (2,2ml) wurde mit Schwinzer Lyse 1:20 verdünnt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, um die Erythrozytenlyse zu erzielen.

Die Erythrozytenlyse ist notwendig, damit es zu keiner Behinderung bei der durchflusszytometrischen Messung auf Grund einer hohen Erythrozytenzahl in den Proben kommt. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (400g/4°C/10min). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Es erfolgt wiederum eine Zentrifugation (400g/4°C/10min) und danach ein weiterer Waschschrift mit PBS. Bei noch nicht vollständiger Entfärbung des Zellpellets konnte der Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt werden. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das entfärbte Zellpellet mit 1ml PBS resuspendiert.

3.2.4 Zählverfahren

Zur Festlegung standardisierter Bedingungen am Durchflusszytometer wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Der unter 3.2.3 beschriebenen Verdünnung werden 2µl entnommen und mit 198µl Trypanblau angefärbt. Der Farbstoff färbt tote Zellen an, da ihre Zellmembran permeabilisiert ist. Danach erfolgt die Befüllung der Neubauer Zählkammer. Dies geschieht durch Ansetzen der Pipettenspitze an der Kante der Zählkammer, wobei die Suspension durch Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Objektträger gesaugt wird. Unter dem Mikroskop wird die Einteilungskammer sichtbar. Anschließend werden 4 der Quadrate der Neubauer-Kammer ausgezählt.

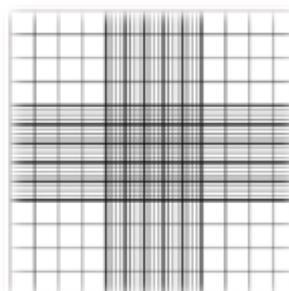


Abbildung 1: Neubauer Zählkammer

Es werden die ungefärbten lebenden Zellen ausgezählt. Die genaue Zellzahl kann dann mit folgender Formel berechnet werden(Schmitz, 2011):

$$\Sigma \text{Zellzahl der 4 Quadrate} / 4 = \text{Mittelwert der Zellzahl / Quadrat}$$

Mittelwert der Zellzahl / Quadrat x Kammerfaktor x Verdünnung = Zellen / ml

Kammerfaktor = 10^4

(Fläche des Quadrates 1mm^2 und Tiefe des Quadrates 0,1 mm)

Verdünnung = $2\mu\text{l}$ Zellsuspension / $198\mu\text{l}$ Trypanblau = 10^2

Mittelwert der Zellzahl / Quadrat x 10^6 = Zellen / ml

3.2.5 Markierung von Oberflächenantigenen mit Hilfe monoklonaler Antikörper

Die Markierung von Antigenstrukturen mittels monoklonaler Antikörper erlaubt das Erkennen der einzelnen Zellpopulationen. Jede Zellpopulation weist andere Antigenstrukturen auf ihren Zelloberflächen auf. Die verschiedenen Antigenstrukturen werden in Cluster von Differenzierungsantigenen (Cluster of Differentiation) eingeteilt und bestimmten Nummern zugeordnet. So werden die Antikörper, die dasselbe Antigen erkennen, unter der gleichen Clusternummer zusammengefasst. Dieses System ermöglicht eine international gültige Nomenklatur.

Es wurden jeweils eine Million Zellen aus der mit PBS verdünnten Zellsuspension auf 2 BD FACS-Röhrchen verteilt. Die Menge an Zellsuspension, die eine Million Zellen enthält, wurde durch die vorangegangenen Berechnungsschritte ermittelt.

In Tube 1 als T-/B-Lymphozyten Tube bezeichnet werden zu den 1 000 000 Zellen die Antikörpermixe für CD 3, CD 4, CD 8 und CD 20 hinzugegeben. Es werden jeweils $50\mu\text{l}$ Antikörpermix hinzugegeben. Tube 2 als Natürliche Killerzellen Tube bezeichnet, enthält neben den Zellen $50\mu\text{l}$ Antikörpermix sowohl von Antikörpern gegen CD 3 und CD 56. CD 3 wird eingesetzt um eine Unterscheidung zwischen natürlichen Killer-T-Zellen und NK-Zellen zu erreichen. NKT-Zellen sind CD 3 und CD 56 positiv. NK-Zellen sind nur CD 56 positiv.

Tabelle 3: Tubeinhalte

Tube 1 T-/B-Lymphozyten	Tube 2 Natürliche Killerzellen
CD 3 PE – Cy 7	CD 3 PE – Cy 7
CD 4 APC	CD 56 APC
CD 8 PE	
CD 20 APC - H7	

Es folgt eine kurze Charakterisierung der einzelnen Antigenstrukturen, die durch die benutzten Antikörper detektiert wurden.

CD 3: Es wird von reifen T-Zellen und Thymozyten exprimiert und ist Teil des T-Zell-Rezeptors. Es eignet sich in Kombination mit Anti-CD 4 und Anti-CD 8 als Marker von T-Lymphozyten.

CD 4: Das Antigen CD 4 stellt ein T-Zell-Antigen dar und wird von T-Helferzellen, aber auch von Monozyten exprimiert.

CD 8: Das T-Zell-Antigen CD 8 wird von zytotoxischen T-Lymphozyten und Suppressorzellen exprimiert.

CD 20: Das CD 20-Antigen ist das als erstes durch monoklonale Antikörper nachgewiesenes humanes Antigen. Es wird auf reifen B-Lymphozyten und deren Vorstufen exprimiert. Es wird nicht mehr auf der Plasmazelle exprimiert.

CD 56: CD 56 wird auf natürlichen Killerzellen exprimiert.

Nach Zugabe der Antikörpermixtur erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C. Da die Antikörper nicht lichtstabil sind, erfolgt die Inkubation im Dunkeln und die nachfolgenden Schritte lichtisoliert. Sobald die Inkubation abgeschlossen war, wurde eine Zentrifugation (400g / 4°C / 2min) durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit 100µl Waschpuffer resuspendiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (400g / 4°C / 2min) und der Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation erfolgt das Dekantieren und das Resuspendieren der Probe mit 300µl Messpuffer.

3.2.6 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer ist ein Gerät, das spezielle Zellmerkmale wie Größe, Granularität und verschiedene Fluoreszenzen messen kann. Das Leitungssystem nimmt die Zellsuspension auf und leitet dann einzeln die Zellen an einem Laserstrahl vorbei. Die Zellen werden hydrodynamisch fokussiert. Dem schnellen Transportstrom wird der langsam fließende Probenstrom zugemischt. Dies sichert, dass auch jede einzelne Zelle am Laser vorbeigeleitet wird. Das benutzte Gerät FACS LSR II besitzt 4 luftgekühlte Laser. Licht kann damit bei 355nm, 409nm, 488nm und 633nm emittiert werden. Damit besteht eine große Bandbreite für anregbare Fluoreszenzen.

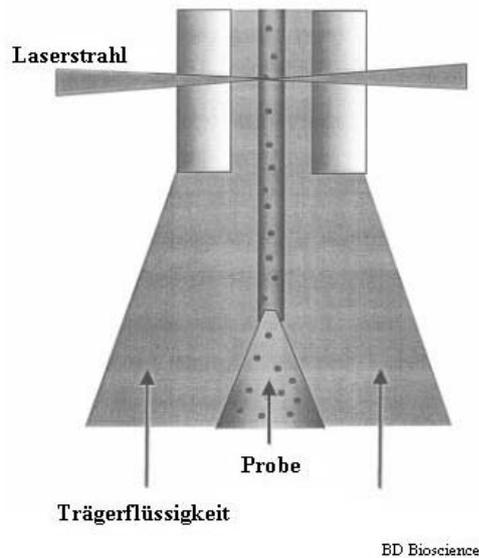


Abbildung 2: Durchflusszytometrisches Messprinzip

Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut. Man unterscheidet das Vorwärtsstreulicht von dem Seitwärtsstreulicht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward light scatter) hängt von der Größe der Zelle ab. Es entspricht dem gebeugten Licht und wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes mittels einer Photodiode detektiert. Kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulicht und große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) ist proportional zu der zellinternen Komplexität (Zellgranularität). Es entsteht aus der Messung des gebrochenen und des reflektierten Lichtes. Die Messung erfolgt im etwa 90° Winkel zum ursprünglichen Laserstrahl.

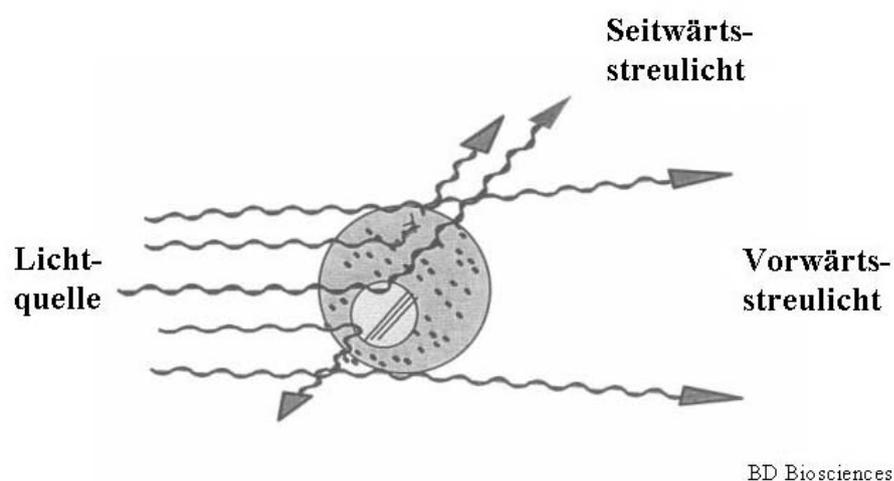


Abbildung 3: Streulichtverhalten an einer Zelle

Durch diese Streulichtparameter kann man einzelne Populationen durch deren Größe und Granularität identifizieren. Es lassen sich die drei Leukozytengruppen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten voneinander abgrenzen. Das sogenannte „Gating“ beschreibt das Eingrenzen und damit die Selektion einer spezifischen Zellpopulation wie den Lymphozyten. Das ausgewählte Gate wird als PBMC bezeichnet, ein Akronym für peripheral blood mononuclear cells.

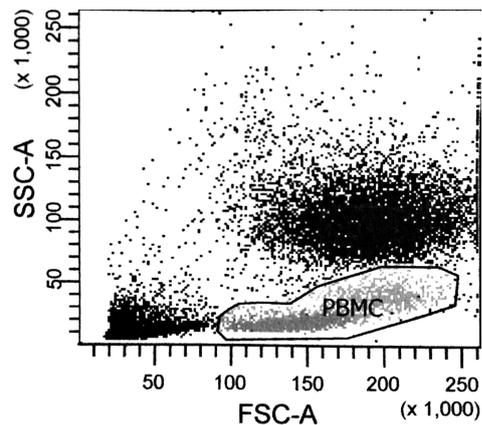


Abbildung 4: Lymphozyten-Gating Tube 1

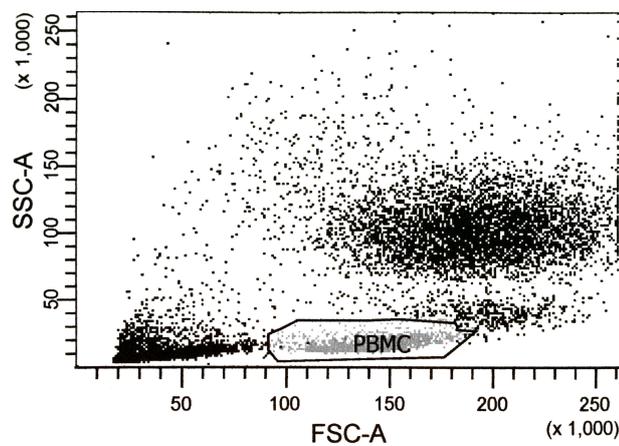


Abbildung 5: Lymphozyten-Gating Tube 2

Das Durchflusszytometer ist aber gleichzeitig auch in der Lage Fluoreszenzlicht zu messen und damit eine Vielzahl von Eigenschaften der einzelnen Zellen zu untersuchen. Hierbei werden die bereits erwähnten monoklonalen Antikörper verwendet, die sich gegen ganz bestimmte Antigene auf den Zelloberflächen richten. Durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an diese Antikörper ist dann eine Detektierung des Signals möglich. Wenn eine Zelle eine Fluoreszenzmarkierung besitzt, dann kommt es zu einer Absorption von Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff festgelegten Wellenbereich. Dabei werden Elektronen in ein

höheres Energieniveau gehoben, fallen danach in ihr Ausgangsniveau zurück und emittieren Licht höherer Wellenlänge. Als Fluoreszenz benennt man diesen Strahlenübergang.

3.2.7 Durchflusszytometrische Messung

Bevor die Messungen mit dem Durchflusszytometer durchgeführt werden konnten, musste die Geräteempfindlichkeit optimiert und kalibriert werden. Hierfür wurden Beads mit den Fluoreszenzfarbstoffen PE-Cy 7, APC, PE und APC-H7 markiert. Mit diesen markierten Beads konnte dann die Justierung der optischen Bank zur Optimierung der Parameter Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität erfolgen.

Es wurde weiterhin eine Kompensation mit Anti-CD3-PE-Cy7, Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PE und Anti-CD20-APC-H7 durchgeführt, um ein durch das breite Emissionsspektrum der Fluorochrome bedingtes Einstrahlen in den Fluoreszenzbereich anderer Fluorochrome zu vermeiden. Für die Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Darstellung wurde ein Schwellenwert festgelegt, welcher Messungen darunter ausschließt, um Verunreinigungen oder tote Zellen nicht darzustellen. Diese Einstellungen wurden nach dem Ansetzen neuer Antikörpermixe wiederholt, heißt aller 2-3 Wochen durchgeführt.

Es wurden bei den Patienten jeweils 2 Probenröhrchen prä- und 2 Röhrchen postoperativ gemessen. Dabei enthielten die Probenröhrchen einmal B-/T-Lymphozyten spezifische Antikörper und einmal NK-Zell spezifische Antikörper. Es wurden pro Röhrchen zwischen 200 000 und 250 000 Zellen gemessen. Die Durchflussrate variierte zwischen 2000 bis 7000 Zellen pro Sekunde. Es erfolgte die Speicherung und Auswertung der Daten mittels der BD FACS DIVA™ Software.

3.2.8 Durchflusszytometrische Auswertung

Durch die Messwerte des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes konnte die Lymphozytenpopulation durch das Setzen eines Gates eingegrenzt werden. Deshalb konnten in der weiteren Auswertung und Bestimmung der Antigenexpression nur die in diesem Gate eingeschlossenen Lymphozyten berücksichtigt werden. Die Software „DIVA“ von Becton Dickinson wurde zu weiterführenden quantitativen Analyse herangezogen. Es ermöglicht das Erstellen von Quadranten- und Histogrammstatistiken. Die Differenzierung einzelner Zellpopulationen und die Berechnung der prozentualen Verteilung der Subpopulationen wurden damit ermöglicht.

3.2.9 Flow Cytomix

Die eingefrorenen Plasmaproben wurden mit der Flow Cytomix Methode zur Messung von Zytokinen und Chemokinen verwendet. Auf Grund von Verschmutzungen konnten nur 49 der 52 eingefrorenen Plasmaproben zur weiteren Verarbeitung benutzt werden. Für die Messung wurde ein Human Obesity 9plex Kit für Flow Cytomix von der Firma eBioscience benutzt. Dieses Kit ermöglichte die Bestimmung von den folgenden Zytokinen: sCD40L, sICAM-1, IL-6, Leptin, MCP-1, MPO, OPG, Resistin und sTNF-R. Die Bestimmung der Zytokine erfolgt mit Hilfe von Antikörpern, die gegen die Zytokine konjugiert sind und als Beads bezeichnet werden. Es wird weiterhin ein Biotin-konjugierter Antikörper hinzugegeben, der die an die Beads gebundenen Zytokine spezifisch bindet.

An diesen Biotin-konjugierten Antikörper kann wiederum Streptavidin-Phycoerythrin binden, welcher als Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion dient. Die Durchführung erfolgte mit zwei 96er Wellplatten, auf die jeweils 25µl Probe bzw. Standard, 25µl des Bead-Mixes und 50µl des Konjugat-Biotin-Mixes aufgetragen und gemischt wurden.

Nach 2h Inkubationszeit bei Raumtemperatur und mehreren Waschvorgängen mit einem Assay-Buffer wurden 50µl Streptavidin-Phycoerythrin auf die Wells gegeben. Danach erfolgte eine einstündige Inkubationszeit und weitere Waschschritte. Daraufhin wurde das Volumen der einzelnen Wells in Facs-Röhrchen überführt. Die Facs-Röhrchen wurden bei 4°C 15h gelagert und am nächsten Morgen erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel und des Statistikprogrammes SPSS 16.0. Die Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichungen angegeben.

Die Signifikanzniveaus wurden mittels independent samples t-Test berechnet und das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Im Rahmen des t-Testes wurde auch der Levene-Test zur Prüfung auf Varianzhomogenität durchgeführt. Dieser Test prüft die Behauptung der Gleichheit der Grundgesamtheitsstreuungen. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 6.0.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Auf Grund der exprimierten Oberflächenantigene erfolgt eine Zuordnung zu den benannten Zellpopulationen. Im Anschluss wurde das Flowcytomixverfahren mit den eingefrorenen Plasmaproben der Patienten durchgeführt. Nach Zusammenfassung der erhaltenen Messwerte und Gruppierung der Patienten nach BMI, Geschlecht und prä- und postoperative Messergebnissen erfolgte die weitergehende Auswertung.

Insgesamt erfolgte ein Einschluss von 52 Patienten, die eine Knie- oder Hüftendoprothetik erhalten haben, davon 25 männliche und 27 weibliche Patienten.

Die 25 männlichen Patienten setzen sich aus 10 normalgewichtigen, 9 übergewichtigen und 6 adipösen zusammen. Bei den Frauen zeigt sich eine Verteilung auf 7 normalgewichtige, 9 übergewichtige und 11 adipöse Patientinnen. Tabelle 4 zeigt außerdem eine Verteilung der Gewichtsklassen in Hinblick auf die Lokalisation des Eingriffes. Auf Grund der fehlenden Unterschiede zwischen den Implantationsorten Knie- und Hüftgelenk werden im Folgenden die Ergebnisse zusammengenommen betrachtet.

Durch Verunreinigungen der eingefrorenen Plasmaproben mussten 3 Patientinnen für die Untersuchung mittels Flowcytomix ausgeschlossen werden.

Es ergab für diese Untersuchung damit eine Gesamtpopulation von 49. Die Frauen verringerten sich auf eine Gesamtzahl von 24, mit einer Verteilung von 7 normalgewichtigen, 8 übergewichtigen und 9 adipösen Patientinnen.

Tabelle 4: Verteilung der Probanden nach Lokalisation der Totalendoprothese und Gewicht

	Normalgewichtig	Übergewichtig	Adipös	
Knie-TEP	8	9	9	26
Hüfte-TEP	9	9	8	26
	17	18	17	

4.1 Alter, Körpergröße, Körpergewicht und BMI

Die Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 42 und 79 Jahre alt. Das Durchschnittsalter liegt bei 66,92 Jahren mit einer Standardabweichung von 9,6 Jahren. Etwa 21 % der Patienten waren jünger als 60 Jahre. Mit etwa 79% der Patienten ist der größte Teil der eingeschlossenen Probanden, die von einer Knie- oder Hüftendoprothetik betroffen sind, über 60 Jahre alt.

Die Patienten wurden in 3 Untergruppen differenziert. Zu der Gruppe normalgewichtig konnten 17 Patienten zugeordnet werden, davon 7 weibliche und 10 männliche. Die mittlere Körpergröße innerhalb dieser Gruppe beträgt 1,7 m, das mittlere Körpergewicht 69,7 kg, damit ergibt sich ein mittlerer BMI von 23,7 kg/m².

Die Werte Körpergewicht und BMI der übergewichtigen und adipösen Gruppe unterscheiden sich signifikant von der normalgewichtigen Kontrollgruppe, mit mittleren BMI-Werten von 27,4 kg/m² innerhalb der übergewichtigen Gruppe, von 35,2 kg/m² innerhalb der adipösen Gruppe und 23,7 kg/m² in der Kontrollgruppe.

Tabelle 5: Geschlecht, Körpergröße, Körpergewicht und BMI in Abhängigkeit von der Gewichtsklasse; signifikante Unterschiede zwischen übergewichtig/adipös und normalgewichtig als * gekennzeichnet

	Normalgewichtig (n=17)	Übergewichtig (n=18)	Adipös (n=17)
Weiblich/männlich, n	7/10	9/9	6/11
Körpergröße (m)	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1
Körpergewicht (kg)	69,7 ± 7,8	80,4 ± 9,5 *	98,1 ± 9,2 *
BMI (kg/m ²)	23,7 ± 0,9	27,4 ± 1,8 *	35,2 ± 3,2 *

4.2 CRP- und Leukozytenkonzentration

Der Normwertbereich für CRP liegt bei < 5 mg/l und für Leukozyten zwischen 3,8 gpt/l und 10,5 gpt/l. Präoperativ zeigen sich bei den normal- und übergewichtigen Gruppen mittlere CRP-Konzentrationen im Normwertbereich. Die mittlere CRP-Konzentration innerhalb der adipösen Patientengruppe ist leicht über den Normwert erhöht. Es gibt aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen.

Die postoperativen mittleren CRP-Konzentrationen sind in jeder Gruppe signifikant höher als präoperativ. Auch postoperativ sind die mittleren CRP-Konzentrationen der adipösen Gruppe höher im Vergleich der beiden anderen Gewichtsklassen, allerdings zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Die mittleren Leukozytenkonzentrationen liegen sowohl prä- als auch postoperativ in allen Gewichtsklassen immer im Normbereich. Es gibt diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 6: CRP- und Leukozytenkonzentration in Abhängigkeit von der Gewichtsklasse; signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Gewichtsklassen zwischen prä- und postoperativer Messung mit * gekennzeichnet

		Normalgewichtig (n=17)	Übergewichtig (n=18)	Adipös (n=17)
CRP (mg/l)	präoperativ	4,7 ± 9,5	3,8 ± 6,5	7,7 ± 6,6
	postoperativ	130,8 ± 51,8 *	136,2 ± 54,9 *	148,9 ± 60,9*
Leukozyten (gpt/l)	präoperativ	6,9 ± 2,1	7,1 ± 1,3	6,9 ± 1,9
	postoperativ	7,6 ± 2,3	7,7 ± 2,1	7,1 ± 2,6

4.3 T- und B-Lymphozyten

Innerhalb der gesamten Studienpopulation zeigt sich ein mittlerer Anteil der B-Lymphozyten an PBMC von 6,1% ± 3,1% präoperativ und 6,4% ± 3,8% postoperativ. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung des Geschlechts, des BMI und des Untersuchungszeitpunktes.

Bei Betrachtung der T-Lymphozyten kann ein Anteil von 34,0% ± 12,7% präoperativ und 37,1% ± 16,5% postoperativ bestimmt werden. Es zeigt sich keine Signifikanz bezüglich des Untersuchungszeitpunktes wie in Abbildung 6 erkennbar ist. Ein diskreter Anstieg des prozentualen Anteils der T-Lymphozyten postoperativ ist bei Betrachtung der Abbildung ersichtlich.

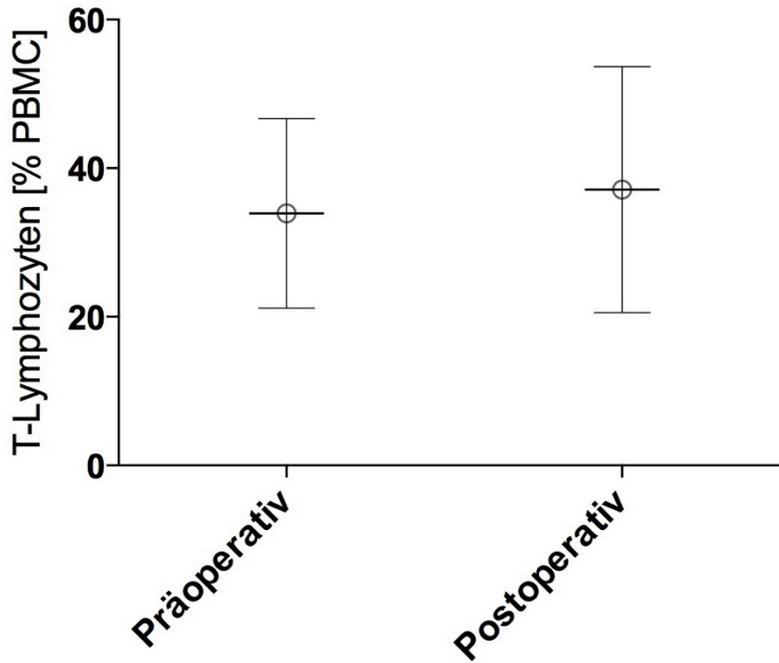


Abbildung 6: Prozentualer Anteil von T-Lymphozyten in der Population der PBMCs prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=52 (Männer und Frauen)

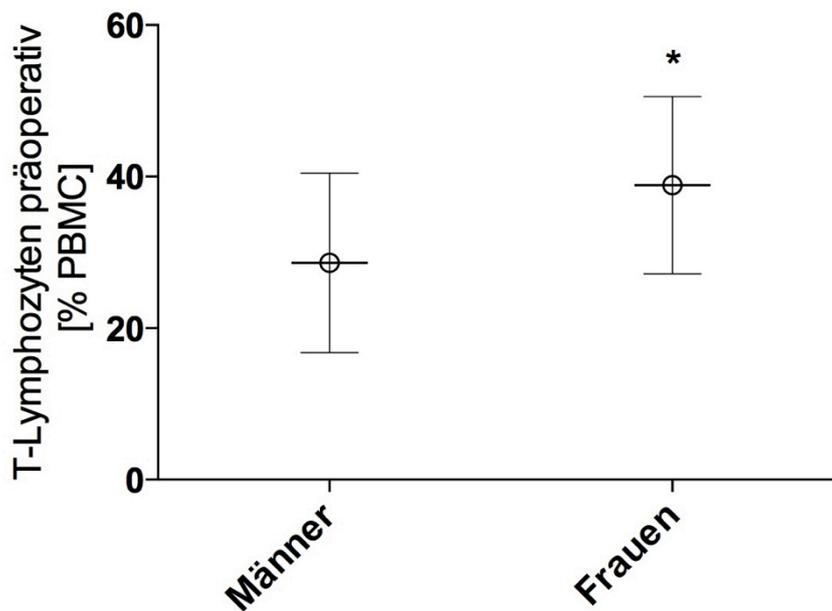


Abbildung 7: Prozentualer Anteil von T-Lymphozyten in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-27; signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern mit * gekennzeichnet

Präoperativ kann ein signifikanter Unterschied des Anteils an T-Lymphozyten zwischen Männern und Frauen festgestellt werden. Bei einem Signifikanzwert von 0,003 zeigen die Frauen einen deutlichen höheren Anteil an T-Lymphozyten mit 38,9% ± 11,7% im Gegensatz zu den Männern mit 28,6% ± 11,9% wie in Abbildung 7 dargestellt. Es

findet sich allerdings kein Unterschied bei Betrachtung der Gewichtsgruppe auch im Geschlechtervergleich wie in Abbildung 8 präoperativ dargestellt.

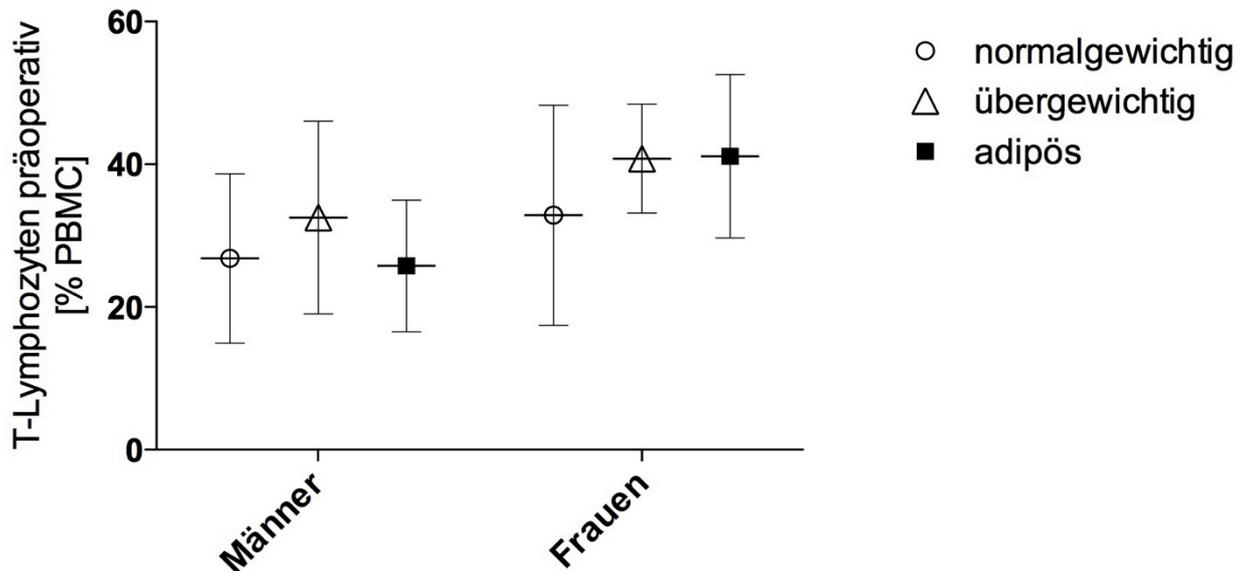


Abbildung 8: Prozentualer Anteil von T-Lymphozyten in der Population der PBMCs präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsgruppe; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-9-11

Die weiteren Untersuchungen zeigen die Subpopulationen von T-Lymphozyten.

T-Helferzellen haben sich innerhalb der Gesamtpopulation von prä- zu postoperativ nicht signifikant von $42,0\% \pm 25,3\%$ zu $50,1\% \pm 24,7\%$ an der Gesamtmenge der PBMC erhöht. Es wurden bei weiteren Untersuchungen keine Unterschiede bezüglich Geschlecht und BMI festgestellt.

Zytotoxische T-Zellen zeigen kaum eine Veränderung bei der zeitlichen Betrachtung prä- und postoperativ wie Abbildung 9 zeigt.

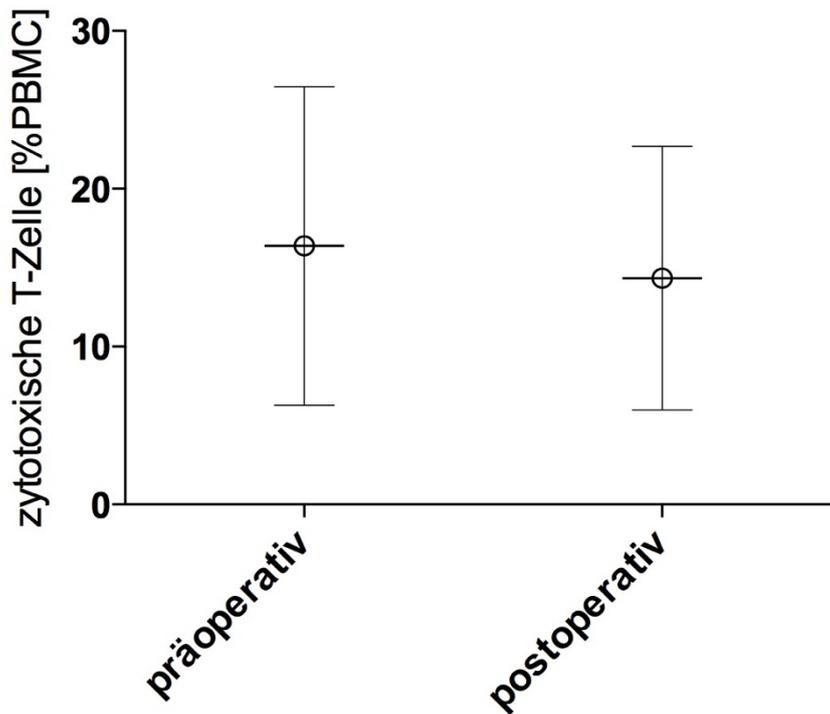


Abbildung 9: Prozentualer Anteil von zytotoxischen T-Lymphozyten in der Population der PBMCs prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=52

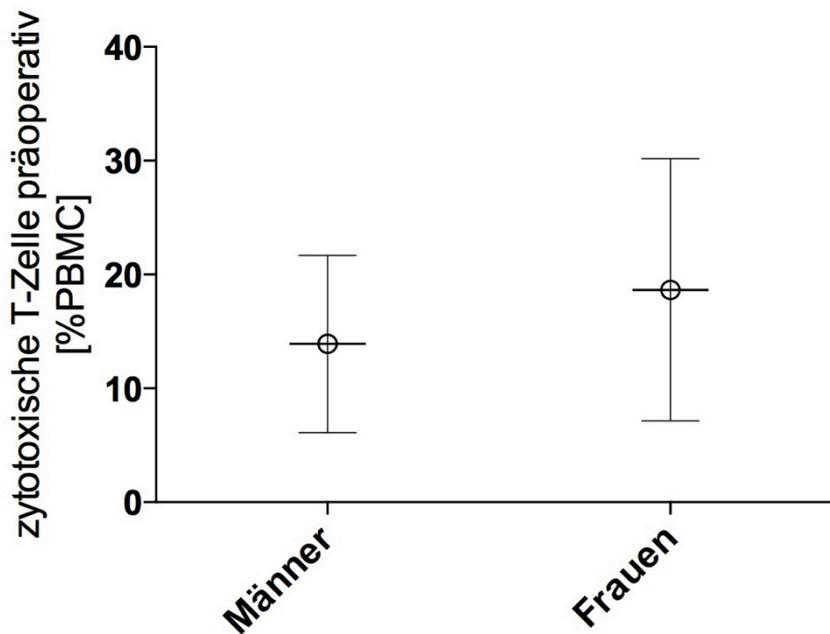


Abbildung 10: Prozentualer Anteil von zytotoxischen T-Lymphozyten in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-27

Auch der Vergleich zwischen Männern und Frauen weist unabhängig vom Zeitpunkt kaum einen Unterschied auf wie Abbildung 10 hier präoperativ darstellt.

Bei Betrachtung des Gewichtsverhältnisses zeigt sich eine deutliche Abnahme der zytotoxischen T-Zellen anhand des Mittelwertes von normalgewichtig zu adipös sowohl

bei Frauen als auch bei Männern. Beim männlichen Geschlecht ist dies signifikant sowohl beim Vergleich von normalgewichtig ($18,0\% \pm 8,5\%$) zu adipös ($7,2\% \pm 3,4\%$) mit $p=0,003$ als auch von übergewichtig ($13,9\% \pm 6,2\%$) zu adipös mit $p=0,034$. Bei der postoperativen Untersuchung spiegeln sich diese signifikanten Unterschiede nicht wieder.

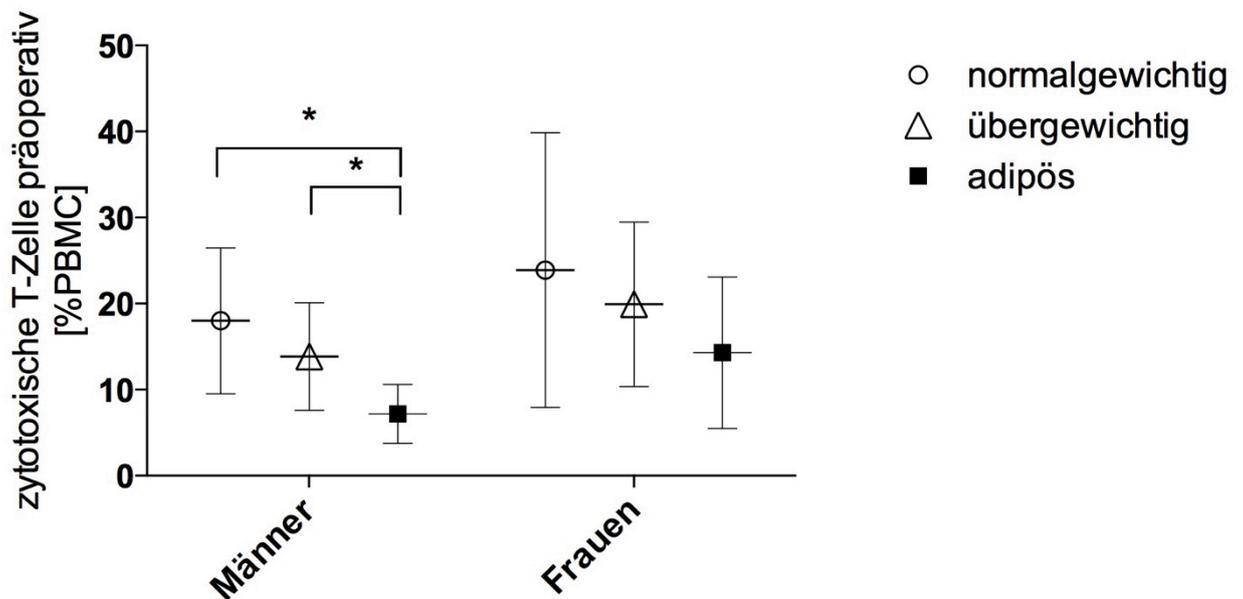


Abbildung 11: Prozentualer Anteil von zytotoxischen T-Lymphozyten in der Population der PBMCs präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert \pm SD; $n=10-9-6-7-9-11$; signifikante Unterschiede zwischen normalgewichtig/übergewichtig zu adipös bei Männern mit * gekennzeichnet

4.4 NK-Zellen

NK-Zellen verringern sich wie in Abbildung 12 dargestellt signifikant von prä- zu postoperativ. Präoperativ liegt der Anteil von NK-Zellen an PBMC bei $23,0\% \pm 8,5\%$, postoperativ nur bei $13,9\% \pm 6,9\%$. Der Referenzbereich für NK-Zellen liegt bei Gesunden zwischen 2-35% (Gressner and Arndt, 2013). Die vorliegenden Patienten befinden sich im oberen Referenzbereich, dabei ist davon auszugehen, dass es sich aus medizinischer Sicht um erkrankte Patienten handelt.

Weiterhin zeigt sich, dass die männlichen Patienten präoperativ einen signifikant höheren Anteil an NK-Zellen haben mit $26,0\% \pm 7,9\%$ als Frauen mit $20,2\% \pm 8,4\%$ ($p=0,012$). Postoperativ gleichen sich beide Geschlechter allerdings wieder aneinander an.

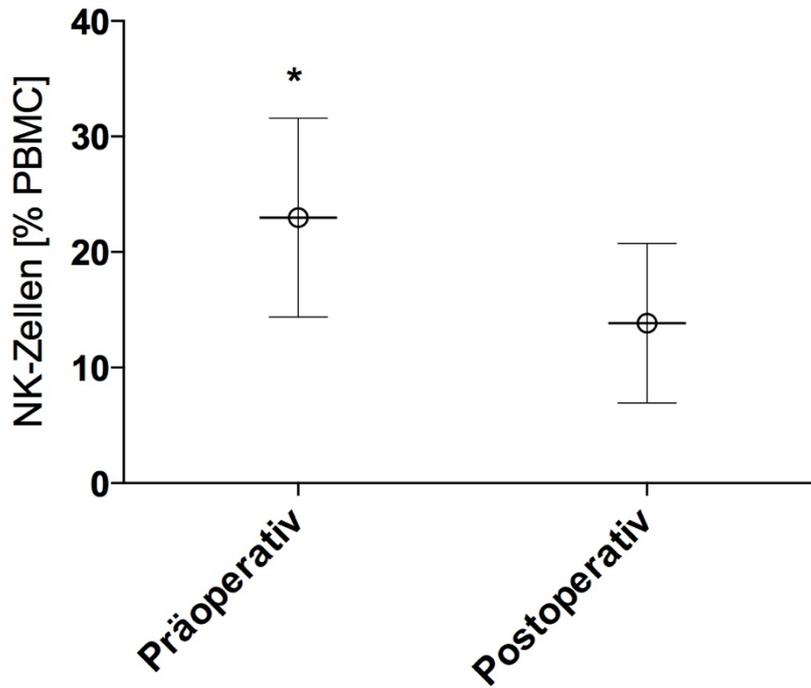


Abbildung 12: Prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=52, signifikanter Unterschied zwischen prä- und postoperativ mit * gekennzeichnet

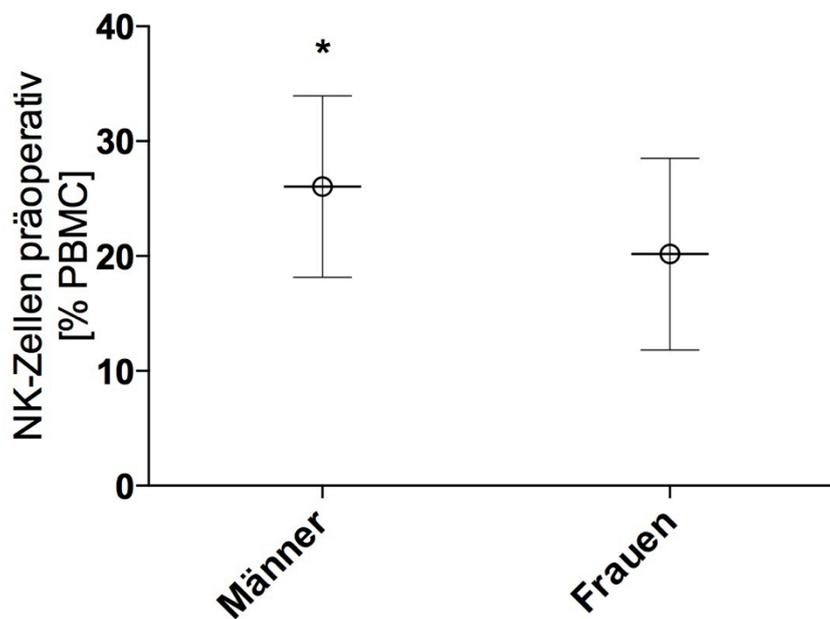


Abbildung 13: Prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-27; signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen mit * gekennzeichnet

Bezüglich des Einflusses des Gewichtes zeigen sich weder prä- noch postoperativ signifikante Unterschiede. Tendenziell erschienen die adipösen Patienten egal ob männlich oder weiblich generell niedrigere prozentuale Anteile der NK-Zellen

aufzuweisen als normal- bzw. übergewichtige Patienten. Diese Tendenz stellt sich nur präoperativ dar.

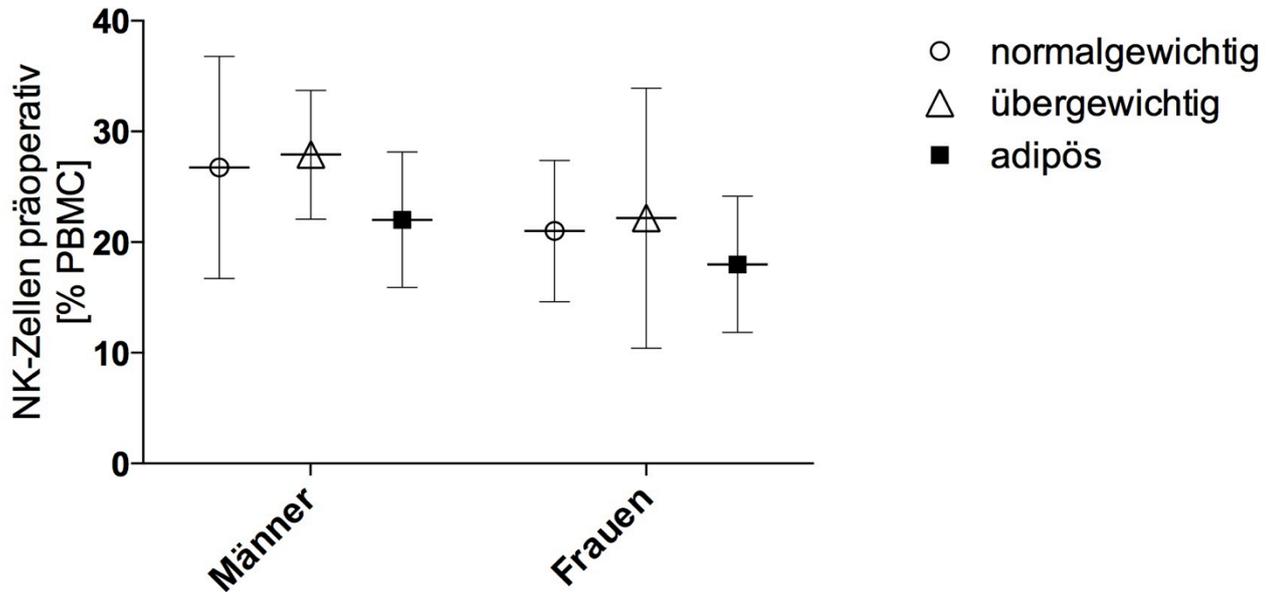


Abbildung 14: Prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-9-11

Differenziert man NK-Zellen in ihre Subpopulationen, so muss man NK-Zellen mit einer hohen Expression des Oberflächenmoleküls CD56 (CD56 bright) von NK-Zellen mit einer deutlich geringeren CD56 Expression (CD56 dim) unterscheiden. Der Großteil der NK-Zellen findet sich auch in dieser Untersuchung bei der Population der CD56 dim Zellen. Über 90% der NK-Zellen sind CD56 dim. Dies verändert sich auch nicht bei der Betrachtung prä- und postoperativ wie Abbildung 15 darstellt.

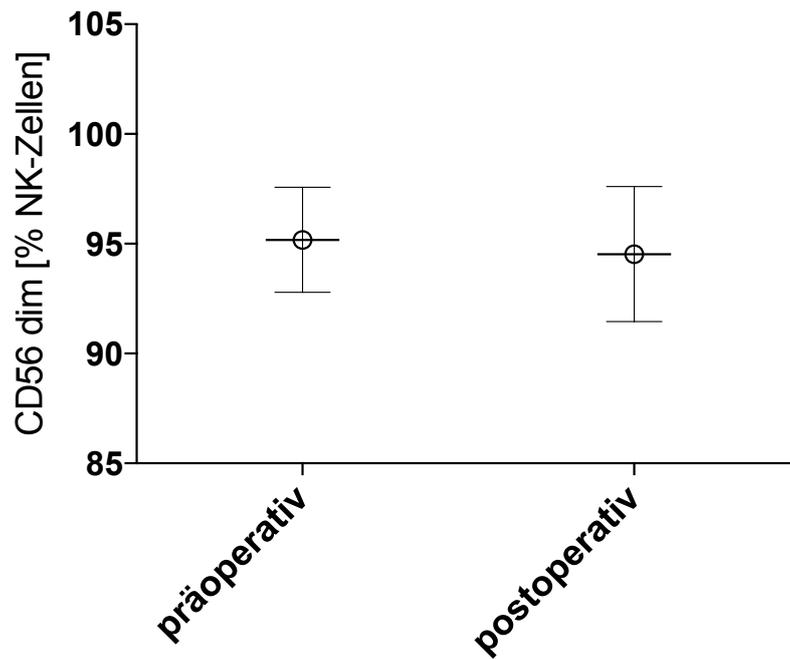


Abbildung 15: Prozentualer Anteil von CD56 dim Zellen in der Population der PBMCs prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=52

Männer haben präoperativ einen signifikant höheren Anteil an CD56 dim Zellen mit $96,0\% \pm 2,3\%$ als Frauen mit $94,4\% \pm 2,2\%$ ($p=0,012$). Dies nähert sich postoperativ an.

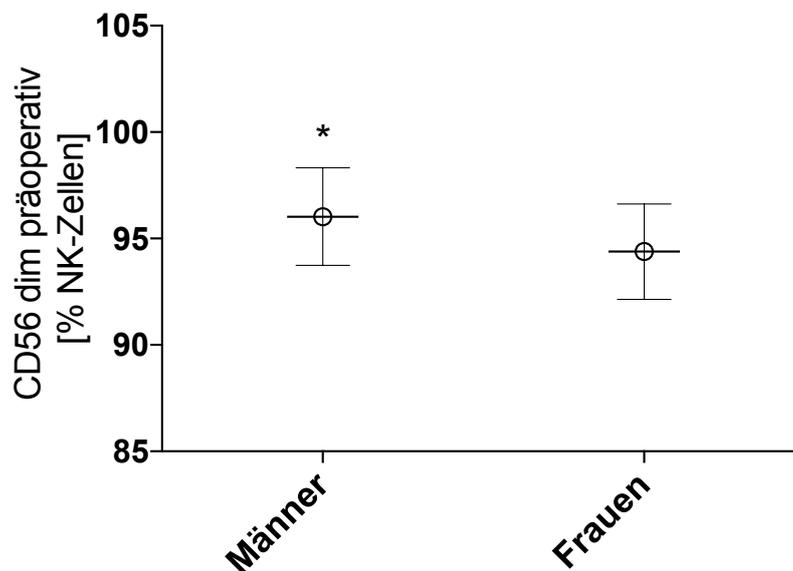


Abbildung 16: Prozentualer Anteil von CD56 dim Zellen in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-27; signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen mit * gekennzeichnet

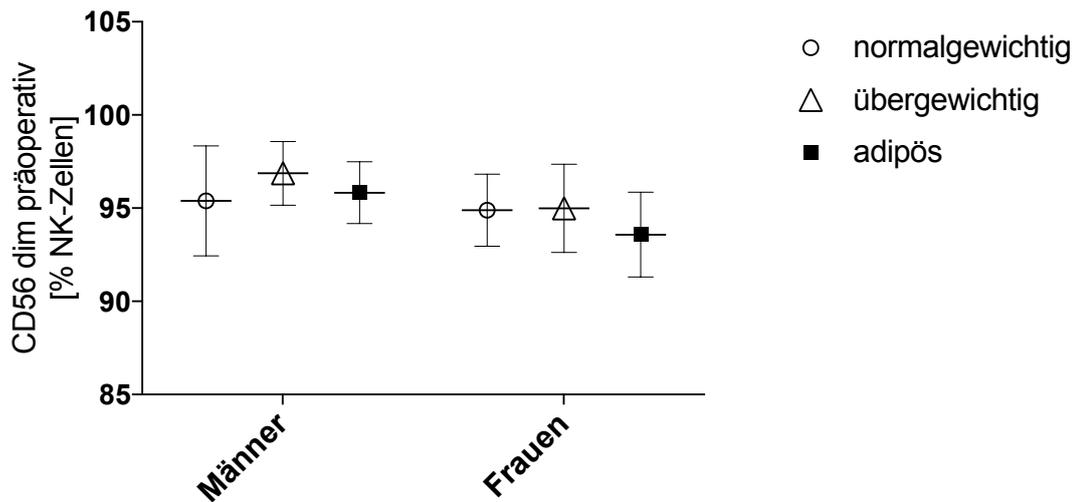


Abbildung 17: Prozentualer Anteil von CD56 dim Zellen in der Population der PBMCs präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-9-11

Auch CD56 bright NK-Zellen zeigen trotz ihres im Vergleich zu den CD56 dim Zellen viel geringeren Anteils an NK-Zellen weder prä- noch postoperativ einen deutlichen Unterschied. Es finden sich im Mittel präoperativ $4,8\% \pm 2,4\%$ und postoperativ $5,5\% \pm 3,1\%$.

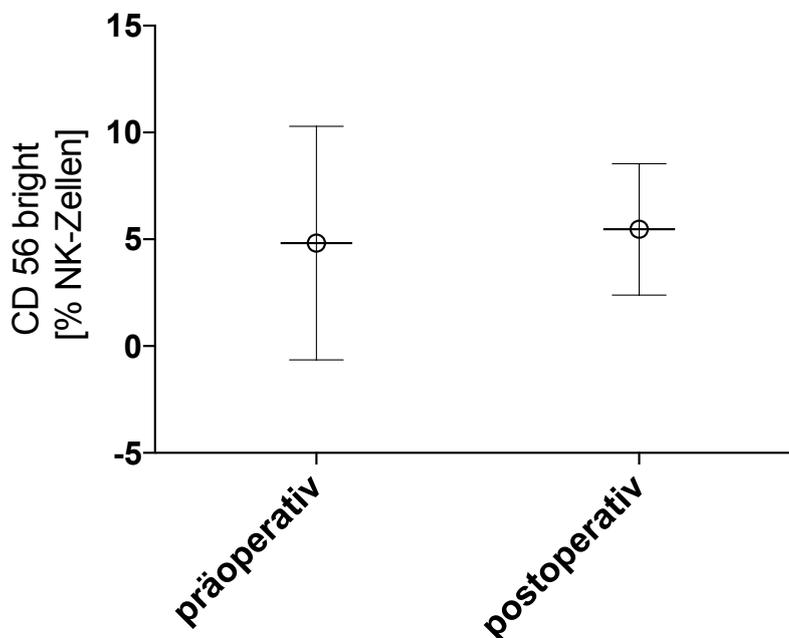


Abbildung 18: Prozentualer Anteil von CD56 bright Zellen in der Population der PBMCs prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=52

Wie nach Betrachtung der CD56 dim zu erwarten, unterscheiden sich CD56 bright NK-Zellen bei den Frauen präoperativ signifikant von den Männern mit mittleren Werten von $5,6\% \pm 2,2\%$ ($p=0,012$), welche sich postoperativ wiederum annähern.

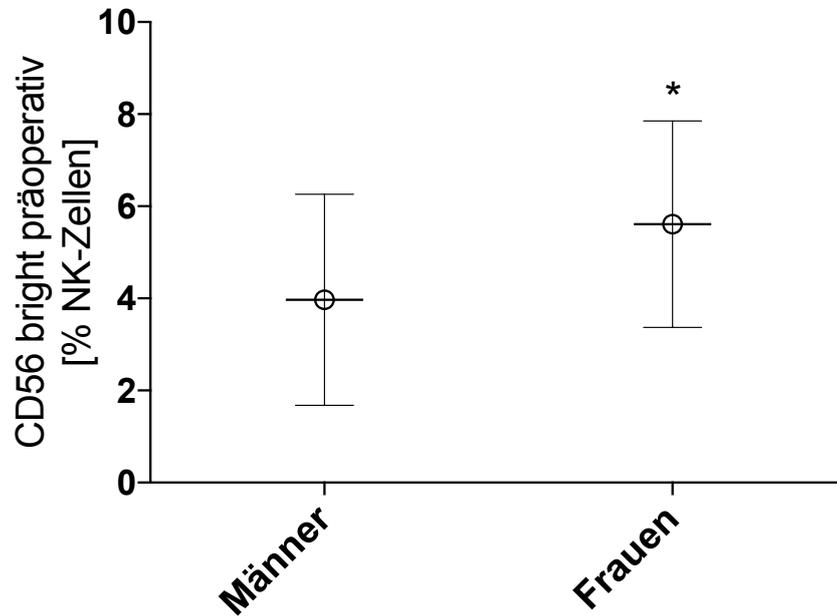


Abbildung 19: Prozentualer Anteil von CD56 bright Zellen in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-27; signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern mit * gekennzeichnet

Die Betrachtung der Gewichtsklassen zeigt keinen signifikanten Unterschied.

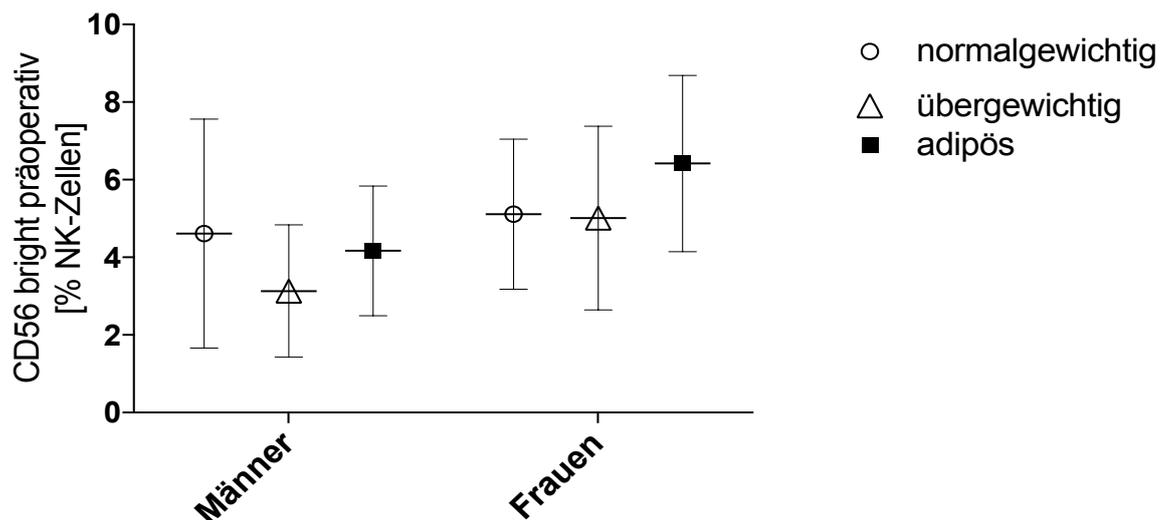


Abbildung 20: Prozentualer Anteil von CD56 bright Zellen in der Population der PBMCs präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=52

4.5 Zytokine

Es wurden folgende Zytokine untersucht: sCD40L, sICAM-1, IL-6, Leptin, MCP-1, MPO, OPG, Resistin und sTNF-R.

Bei Betrachtung von MCP-1, MPO, OPG, sCD40L und Resistin konnten weder im Geschlechtervergleich, Gewichts- oder Zeitvergleich tendenzielle oder signifikante Veränderungen festgestellt werden, so dass sich die weiteren Ausführungen auf die Zytokine IL-6, Leptin, sICAM-1 und sTNF-R beschränken.

4.5.1 Interleukin-6

Das Interleukin-6 zeigt bei zeitlicher Betrachtung eine signifikante Zunahme postoperativ mit einem Mittelwert von $12,0 \text{ pg/ml} \pm 13,4 \text{ pg/ml}$ im Vergleich zu präoperativ $2,9 \text{ pg/ml} \pm 1,3 \text{ pg/ml}$ ($p=0,000$).

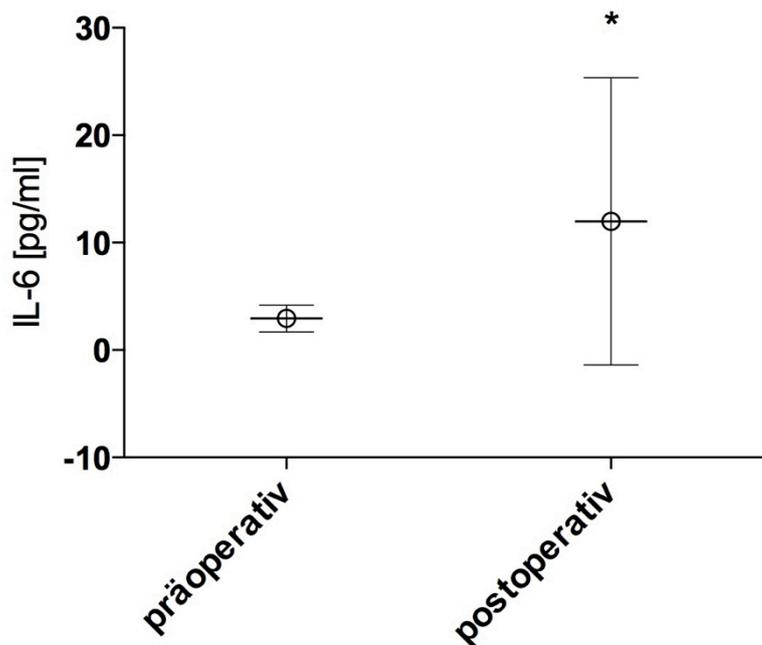


Abbildung 21: Serumkonzentration von IL-6 in pg/ml prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=49; signifikanter Unterschied zwischen post- und präoperativ mit * gekennzeichnet

Sowohl prä- als auch postoperativ konnte kein Geschlechterunterschied festgestellt werden.

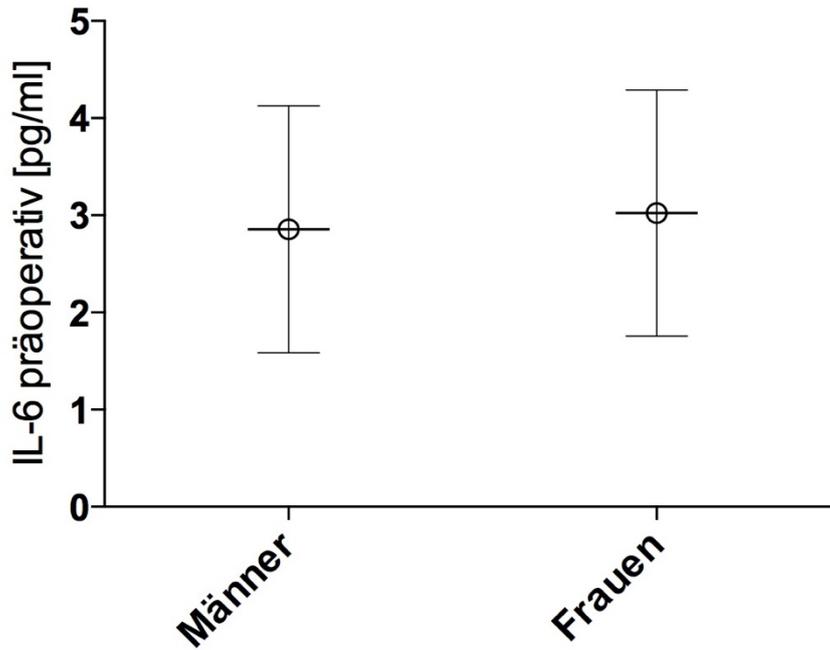


Abbildung 22: Serumkonzentration von IL-6 in pg/ml präoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-24

Es findet sich bei der präoperativen Betrachtung der Gewichtsgruppen nur bei den Männern ein signifikanter Unterschied am Plasmaspiegel von IL-6. Die adipösen Männer haben mit $4,0 \text{ pg/ml} \pm 1,4 \text{ pg/ml}$ einen signifikant höheren IL-6- Spiegel als die übergewichtigen Männer mit $2,3 \text{ pg/ml} \pm 0,9 \text{ pg/ml}$ ($p=0,012$) bei der präoperativen Messung.

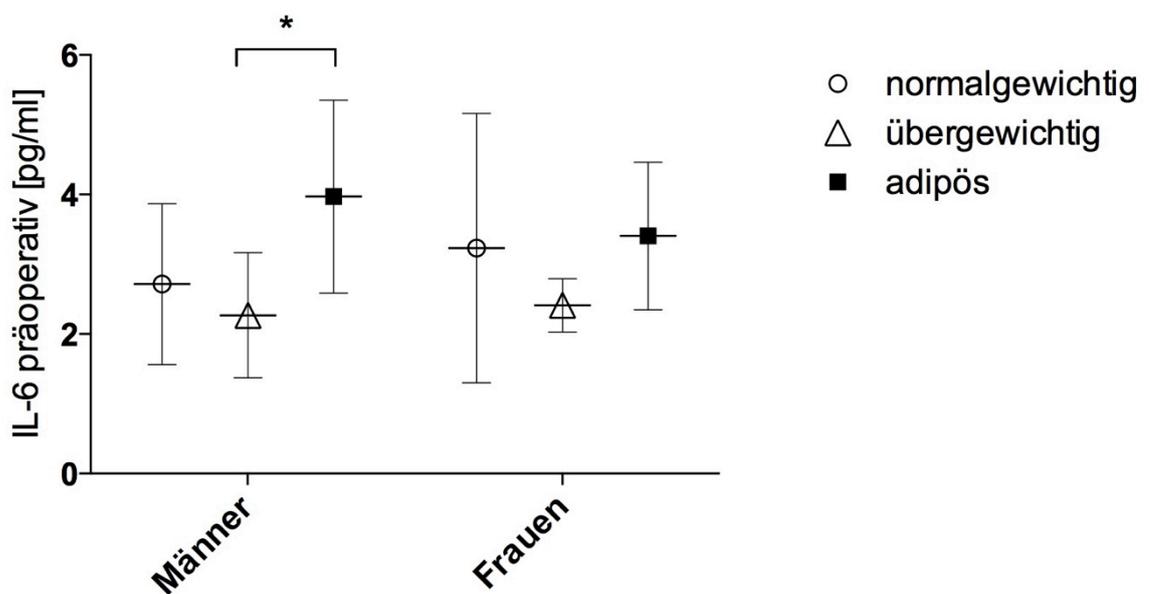


Abbildung 23: Serumkonzentration von IL-6 in pg/ml präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-8-9; signifikanter Unterschied zwischen übergewichtigen und adipösen Männern mit * gekennzeichnet

4.5.2 Leptin

Leptin als Proteohormon zeigt bei der allgemeinen prä- und postoperativen Betrachtung keine Unterschiede auf mit Mittelwerten von 25,2 ng/ml \pm 20,0 ng/ml präoperativ und 21,7 ng/ml \pm 18,4 ng/ml.

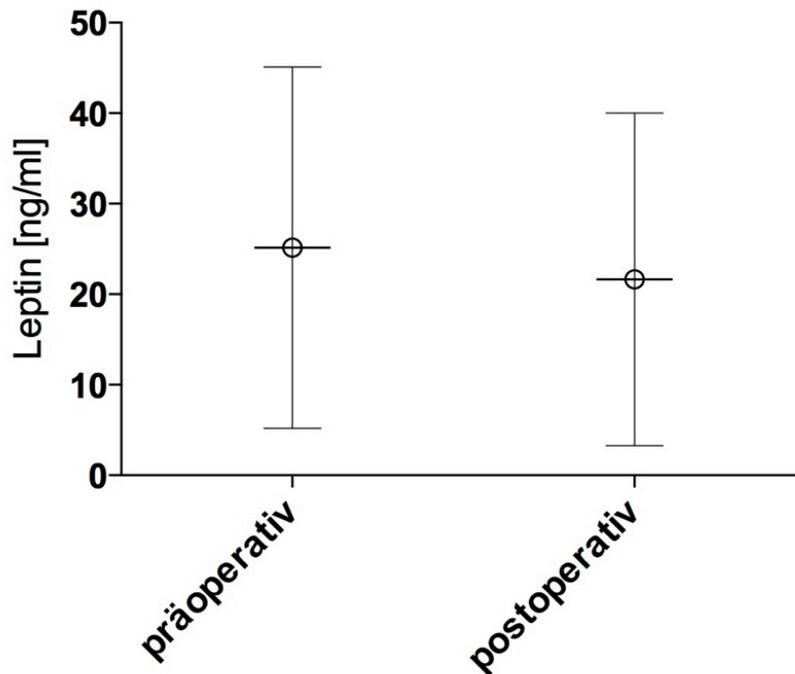


Abbildung 24: Serumkonzentration von Leptin in ng/ml prä- und postoperativ; Mittelwert +/- SD; n=49

In Abbildung 25 ist der Unterschied des Leptinspiegel im Geschlechtervergleich dargestellt. Auch in dieser Studie konnte ein bereits bekannter Fakt bestätigt werden. Frauen haben einen signifikant höheren Leptinspiegel als Männer. Sowohl prä- als auch postoperativ unterscheiden sich die weiblichen Leptinspiegel mit 36,8 ng/ml \pm 21,5 ng/ml präoperativ und 30,5 ng/ml \pm 19,1 ng/ml postoperativ signifikant von den männlichen Spiegeln mit 14,0 ng/ml \pm 9,3 ng/ml präoperativ und 13,1 ng/ml \pm 13,1 ng/ml ($p=0,000$ präoperativ, $p= 0,001$ postoperativ).

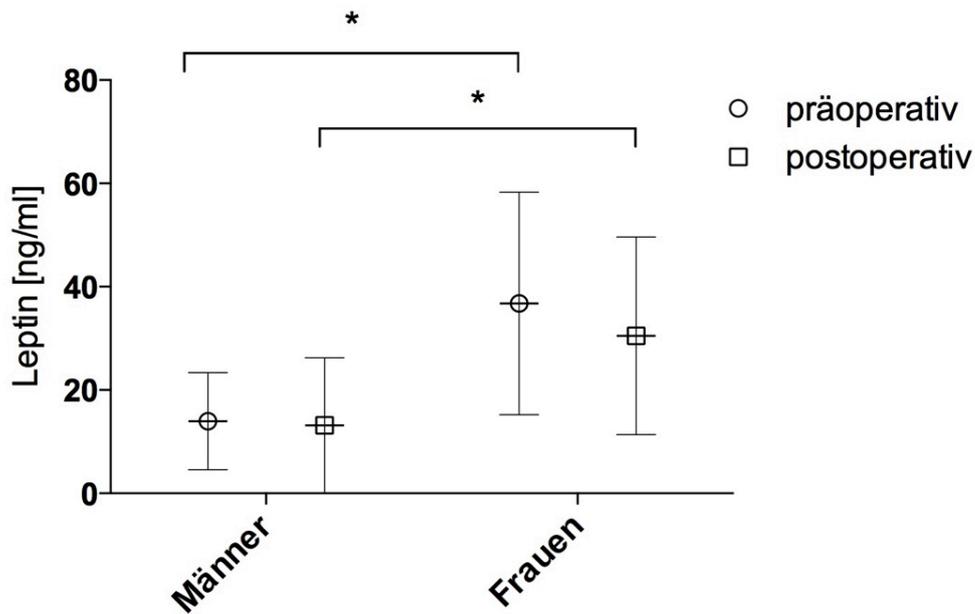


Abbildung 25: Serumkonzentration von Leptin in ng/ml prä- und postoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-24; signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen prä- und postoperativ mit * gekennzeichnet

Im abschließenden Vergleich bezüglich der einzelnen Gewichtsklassen zeigt sich sowohl bei Männern als auch bei Frauen eine Zunahme des Leptinspiegels mit dem Körpergewicht. Dies ist präoperativ allerdings nur als signifikant zu bezeichnen zwischen normalgewichtigen und adipösen Männern ($p=0,009$).

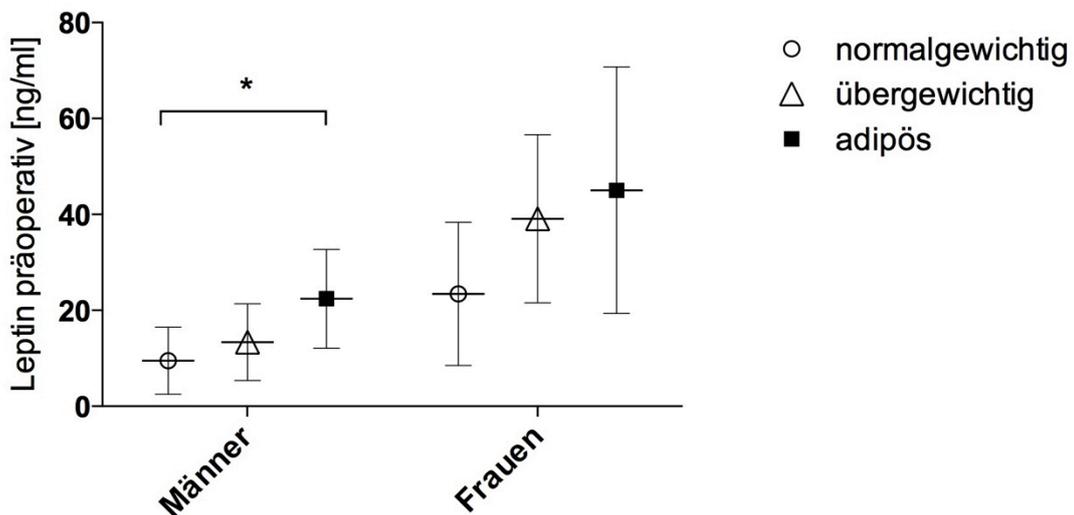


Abbildung 26: Serumkonzentration von Leptin in ng/ml präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-8-9; signifikanter Unterschied zwischen normalgewichtigen und adipösen Männern mit * gekennzeichnet

Postoperativ zeigt sich sowohl bei Männern als auch bei Frauen ein signifikanter Unterschied zwischen adipösen und normalgewichtigen Probanden. Bei den Männern

unterscheiden sich die Werte der adipösen Gruppe mit $27,3 \text{ ng/ml} \pm 18,2 \text{ ng/ml}$ zu der normalgewichtigen Gruppe mit $6,3 \text{ ng/ml} \pm 5,0 \text{ ng/ml}$ bei einem p-Wert von 0,003. Bei den Frauen unterscheiden sich die beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,021.

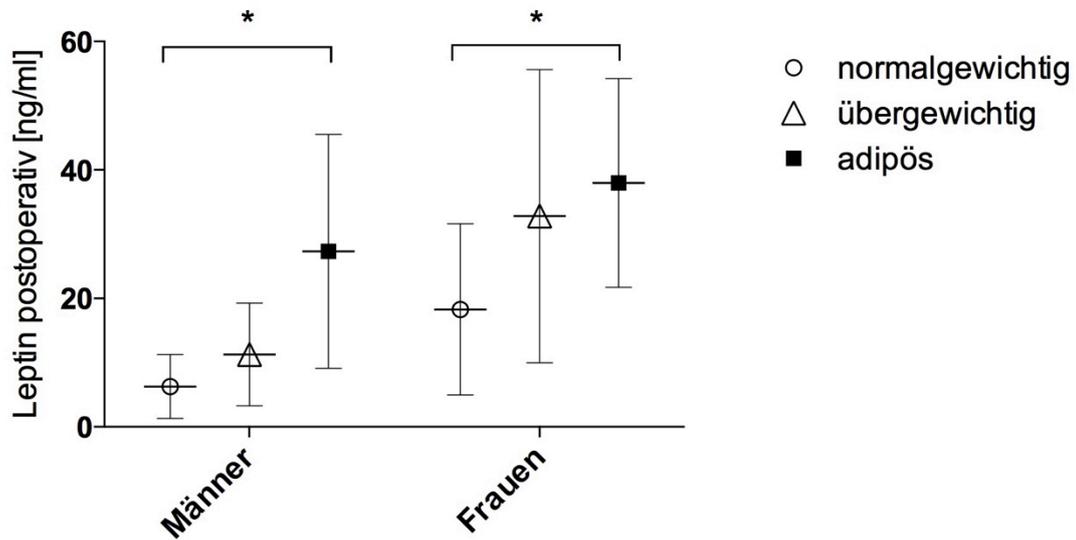


Abbildung 27: Serumkonzentration von Leptin in ng/ml postoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert \pm SD; $n=10-9-6-7-8-9$; signifikante Unterschiede zwischen normalgewichtigen und adipösen Männern/Frauen mit * gekennzeichnet

4.5.3 sICAM-1

Das lösliche Adhäsionsmolekül sICAM-1 zeigt im Verlauf von prä- zu postoperativ keine Veränderungen im Mittelwert.

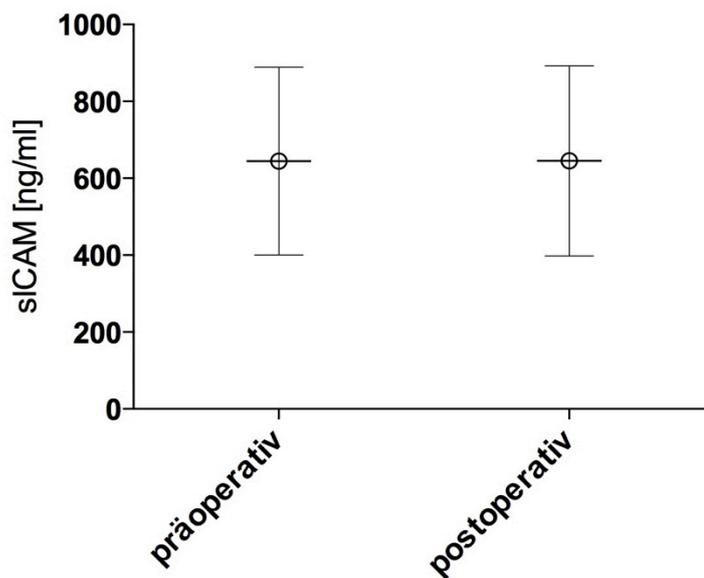


Abbildung 28: Serumkonzentration von sICAM in ng/ml prä- und postoperativ; Mittelwert \pm SD; $n=49$

Bei Betrachtung der Geschlechter zeigt sich sowohl prä- als auch postoperativ, dass sich bei Männern ein signifikant höherer Wert an sICAM-1 im Plasma findet als bei Frauen. Präoperativ haben Männer einen mittleren Plasmawert von 720,1 ng/ml \pm 287,0 ng/ml. Im Gegensatz dazu zeigen Frauen einen Wert von 566,0 ng/ml \pm 161,5 ng/ml ($p=0,025$). Postoperativ unterscheiden sich Männer mit einem Wert von 717,4 ng/ml \pm 252,0 ng/ml signifikant von Frauen mit einem Mittelwert von 570,3 ng/ml \pm 222,9 ng/ml ($p=0,036$).

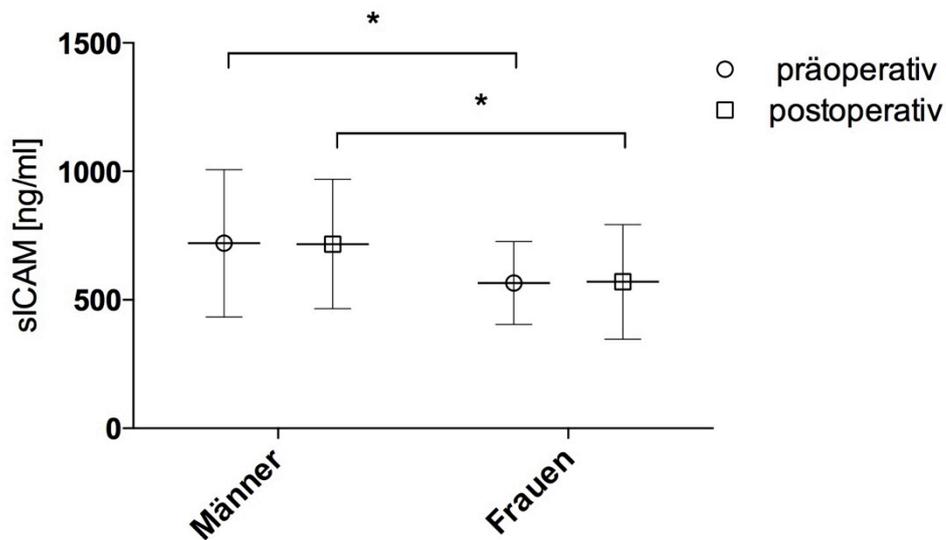


Abbildung 29: Serumkonzentration von sICAM in ng/ml prä- und postoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert +/- SD; n=25-24; signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen prä-/postoperativ mit * gekennzeichnet

Bezüglich der Gewichtsklassen kann man präoperativ keine typischen Änderungen bei höherem Gewicht im Vergleich zu niedrigeren sehen.

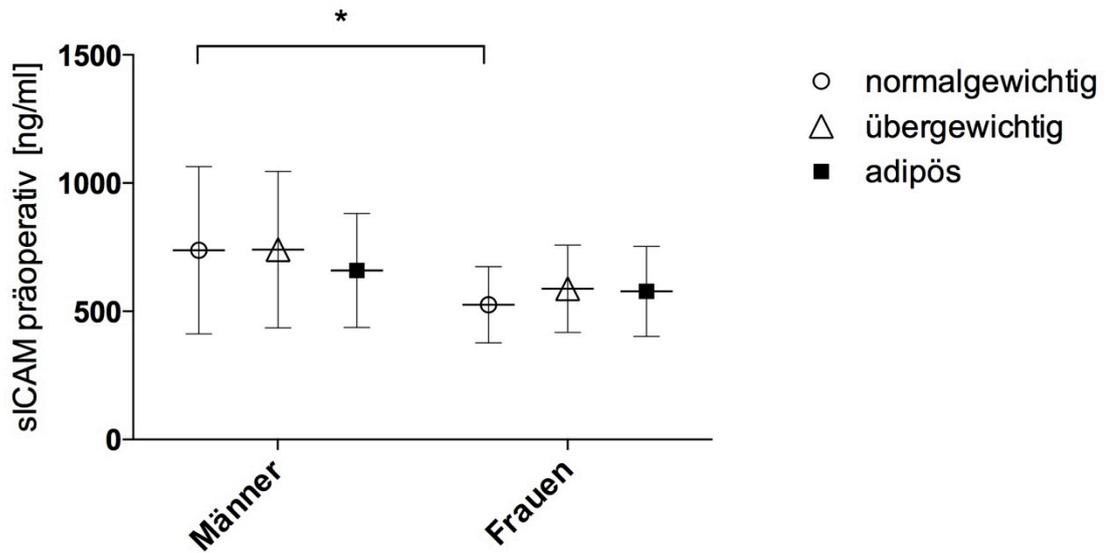


Abbildung 30: Serumkonzentration von sICAM in ng/ml präoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-8-9; signifikante Unterschiede zwischen normalgewichtigen Männern und normalgewichtigen Frauen mit * gekennzeichnet

Postoperativ lässt sich aber zeigen, dass sich bei adipösen Patienten weniger sICAM im Plasma findet als bei normal- oder übergewichtigen Patienten. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

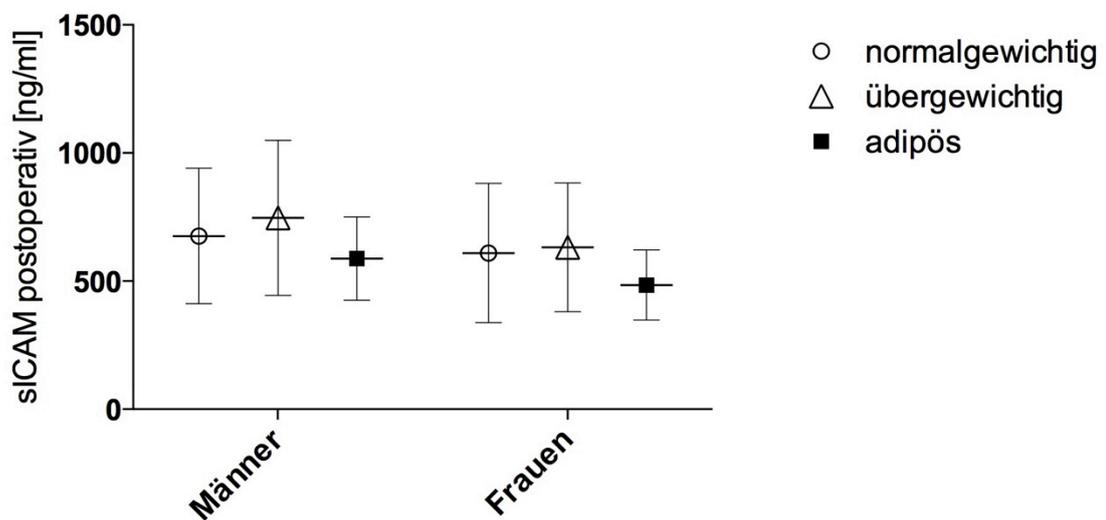


Abbildung 31: Serumkonzentration von sICAM in ng/ml postoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-8-9

4.5.4 sTNF-R

Die Plasmaspiegel des löslichen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors steigen signifikant im Verlauf von prä- zu postoperativ von $2,1 \text{ ng/ml} \pm 1,1 \text{ ng/ml}$ auf $3,6 \text{ ng/ml} \pm 1,5 \text{ ng/ml}$ ($p=0,000$).

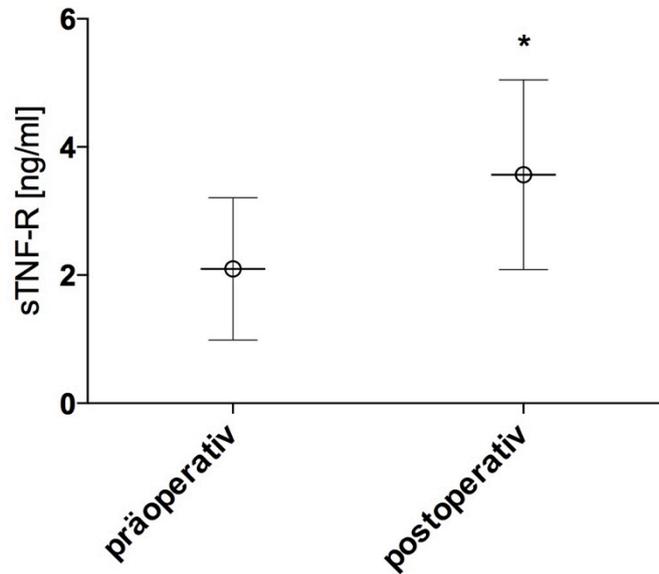


Abbildung 32: Serumkonzentration von sTNF-R in ng/ml prä- und postoperativ; Mittelwert \pm SD; $n=49$; signifikante Unterschiede zwischen prä- und postoperativ mit * gekennzeichnet

Sowohl prä- als auch postoperativ zeigt sich zwischen den Geschlechtern keine Veränderung wie Abbildung 33 exemplarisch für den postoperativen Geschlechtervergleich darstellt.

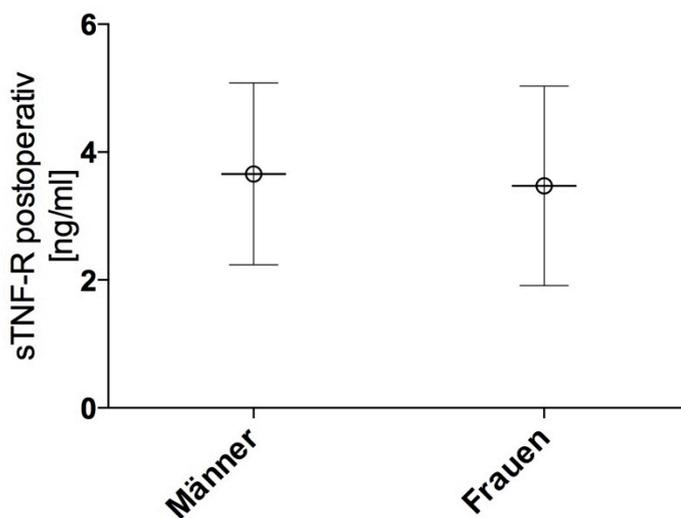


Abbildung 33: Serumkonzentration von sTNF-R in ng/ml postoperativ in Abhängigkeit vom Geschlecht; Mittelwert \pm SD; $n=25-24$

Postoperativ ist bei Männern im Vergleich der Gewichtsklassen ein signifikanter Unterschied zwischen adipösen ($5,2 \text{ ng/ml} \pm 1,3 \text{ ng/ml}$) und normalgewichtigen ($3,4 \text{ ng/ml} \pm 0,1 \text{ ng/ml}$) ($p=0,007$), sowie zwischen adipösen und übergewichtigen ($2,9 \text{ ng/ml} \pm 1,1 \text{ ng/ml}$) ($p=0,003$) Männern zu erkennen. Bei Frauen lässt sich dies nicht darstellen.

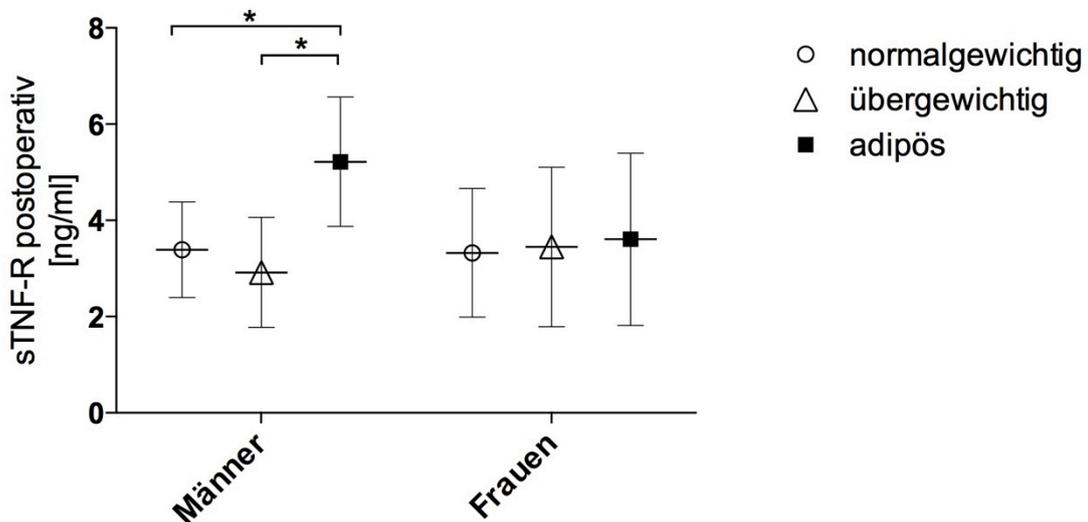


Abbildung 34: Serumkonzentration von sTNF-R in ng/ml postoperativ differenziert nach Geschlecht und Gewichtsklasse; Mittelwert +/- SD; n=10-9-6-7-8-9; signifikante Unterschiede zwischen normal-/übergewichtigen und adipösen Männern mit * gekennzeichnet

4.6 Korrelationen

Zur Darstellung der Abhängigkeiten einzelner Variablen erfolgte die Darstellung mittels linearer Regressionsgeraden. Zur Ermittlung des linearen Zusammenhangs zweier untersuchter Größen wurde mittels SPSS der Pearson Korrelationskoeffizient berechnet.

Die Abhängigkeit des CRP-Messwertes zum BMI präoperativ weist bei Betrachtung der Abbildung 35 eine positive Korrelation auf, die bei Berechnung des Korrelationskoeffizienten nur einen sehr schwachen Zusammenhang zwischen den beiden Variablen wiedergibt ($r=0,18$). Postoperativ wird dieser sehr schwache Zusammenhang nicht mehr sichtbar, sondern es zeigt sich eine statistische Unabhängigkeit zwischen CRP und BMI.

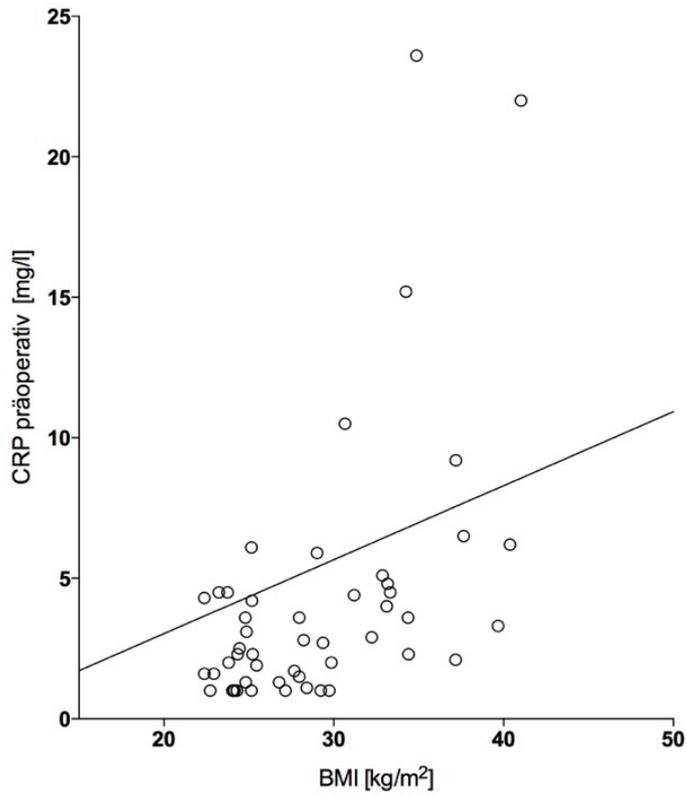


Abbildung 35: Lineare Regressionsgerade CRP präoperativ in mg/l in Abhängigkeit vom BMI; $Y = 0,2633 \cdot X - 2,239$; $r = 0,18$; $n = 52$

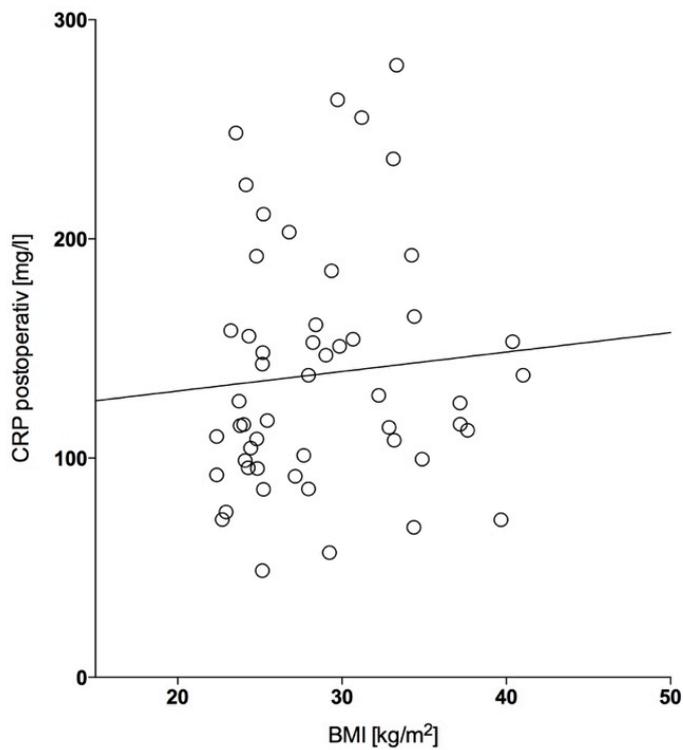


Abbildung 36: Lineare Regressionsgerade CRP postoperativ in mg/l in Abhängigkeit vom BMI; $Y = 0,8881 \cdot X + 112,9$; $r = 0,08$; $n = 52$

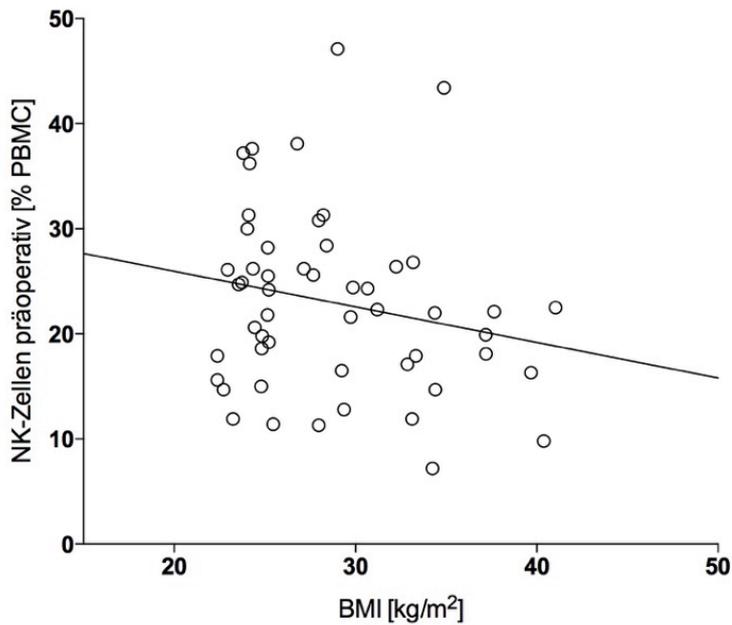


Abbildung 37: Lineare Regressionsgerade prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit vom BMI; $Y = -0,3387 \cdot X + 32,73$; $r = -0,2$; $n = 52$

Ein mittelstarker negativer Zusammenhang ergibt sich zwischen den beiden Variablen NK-Zellen präoperativ und BMI ($r = -0,2$). Postoperativ kann auch weiterhin ein negativer allerdings schwacher Zusammenhang zwischen diesen beiden erfasst werden ($r = -0,11$).

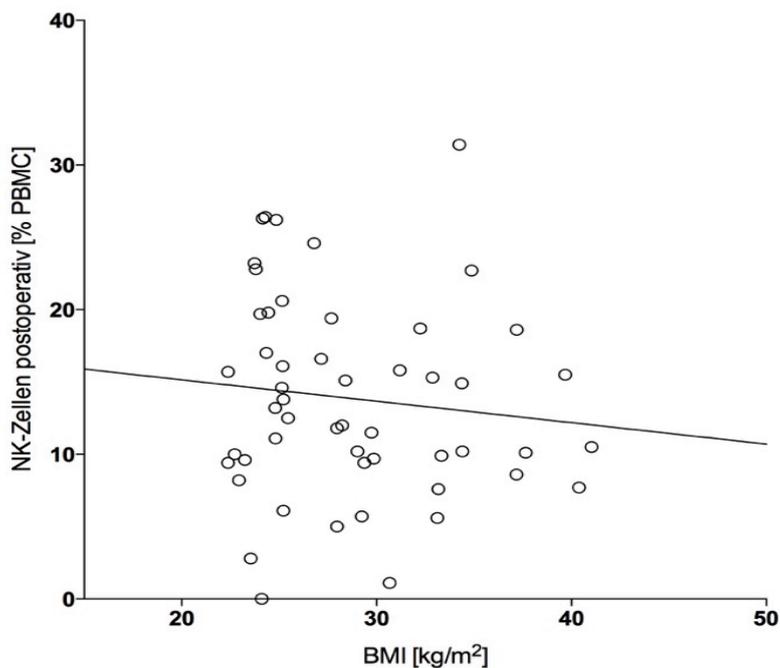


Abbildung 38: Lineare Regressionsgerade prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs postoperativ in Abhängigkeit vom BMI; $Y = -0,148 \cdot X + 18,11$; $r = -0,11$; $n = 52$

NK-Zellen und sICAM-1 lassen bereits bei Betrachtung der Regressionsgeraden präoperativ auf einen positiven Zusammenhang schließen. Dies bestätigt sich mittels Berechnung des Korrelationskoeffizienten signifikant ($p = 0,01$) als mittelstarke Beziehung beider ($r = 0,36$). Postoperativ sind beide Variablen unabhängig voneinander.

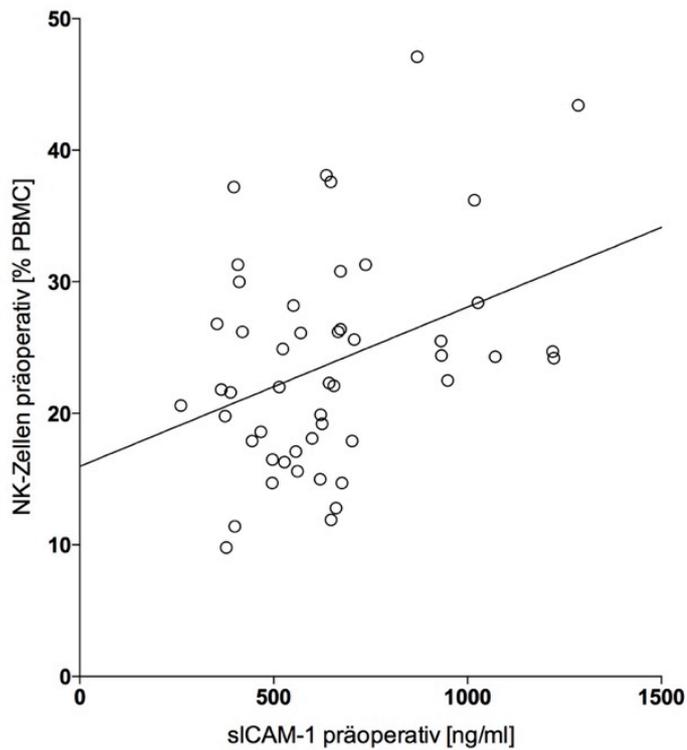


Abbildung 39: Lineare Regressionsgerade prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs präoperativ in Abhängigkeit von sICAM-1 in ng/ml präoperativ; $Y = 0,01211 \cdot X + 15,97$; $r=0,36$; $n=49$

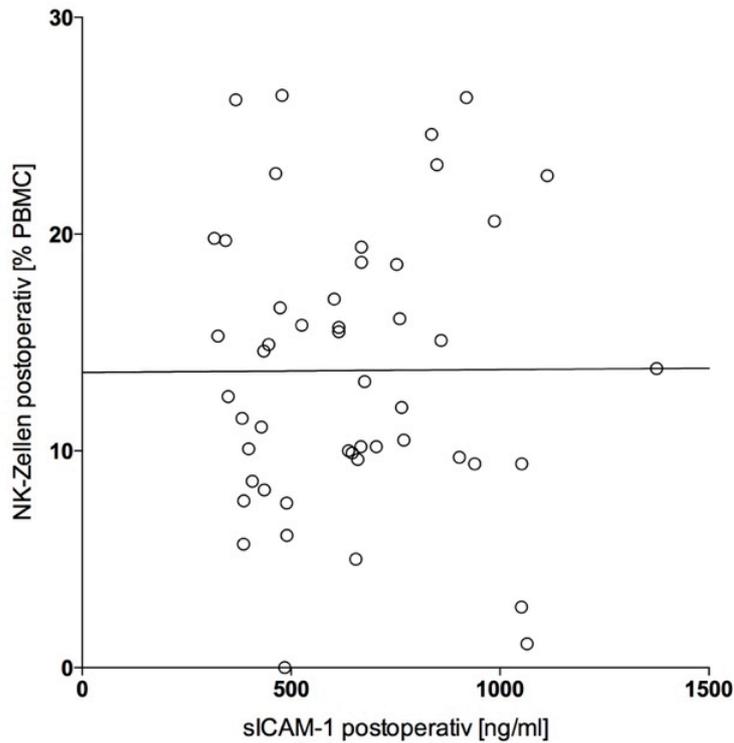


Abbildung 40: Lineare Regressionsgerade prozentualer Anteil von NK-Zellen in der Population der PBMCs postoperativ in Abhängigkeit von sICAM-1 in ng/ml postoperativ; $Y = 0,0001297 \cdot X + 13,62$; $r=0,005$; $n=49$

Auch zwischen Leptin und IL-6 erscheint sowohl graphisch als auch in der Berechnung des Korrelationskoeffizienten ein schwacher aber positiver Zusammenhang präoperativ ($r = 0,22$). Postoperativ zeigen sich beide Variablen wiederum unabhängig.

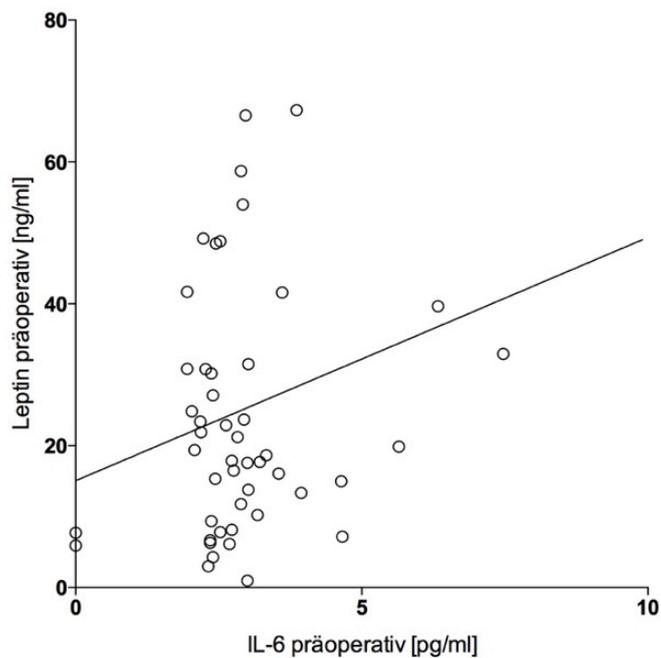


Abbildung 41: Lineare Regressionsgerade Leptin in ng/ml präoperativ in Abhängigkeit von IL-6 in pg/ml präoperativ; $Y = 3,43 \cdot X + 15,07$; $r=0,22$; $n=49$

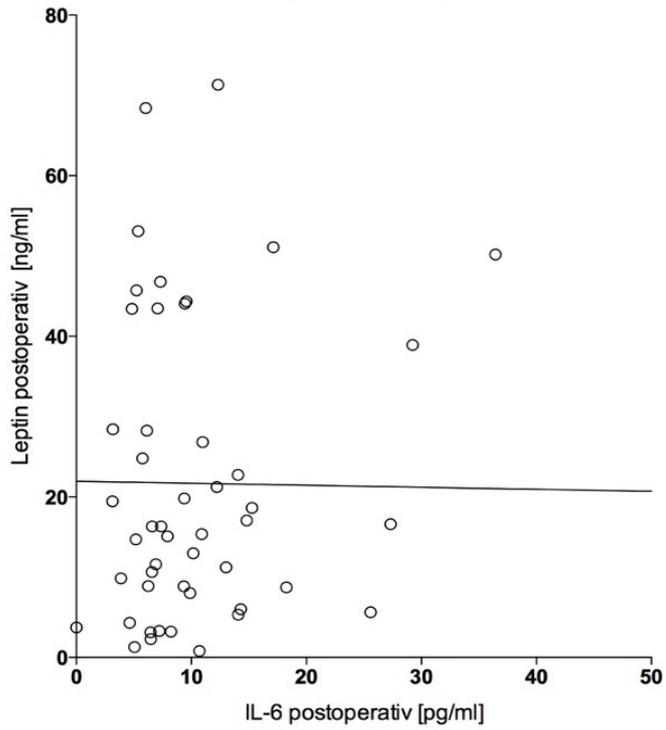


Abbildung 42: Lineare Regressionsgerade Leptin in ng/ml präoperativ in Abhängigkeit von IL-6 in pg/ml präoperativ; $Y = -0,02498 \cdot X + 21,95$; $r = -0,018$; $n = 49$

5 Diskussion

Adipositas ist eine durch starkes Übergewicht gekennzeichnete Erkrankung, die verschiedenste Folgen nach sich ziehen kann. Eine Vielzahl von Erkrankungen wie zum Beispiel Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Apoplex treten bei adipösen Patienten wesentlich häufiger als bei Normalgewichtigen auf (Lehnert and Reincke, 2015; Offermanns, 2012; Trayhurn, 2005).

Der Einfluss von Adipositas auf das Immunsystem wird in verschiedenen wissenschaftlichen Zusammenhängen untersucht. Auf Grund der exkretorischen Funktion des Fettgewebes ist davon auszugehen, dass es im Rahmen einer Adipositas durch eine Zunahme des Fettgewebes und der damit verbundenen Zunahme an Fettgewebsmediatoren (wie z.B. pro-inflammatorischen Zytokinen) zu einer chronischen, sub-klinischen Entzündung im Körper kommt (Trayhurn, 2005).

Die Zielsetzung dieser Arbeit galt der Erforschung der Veränderung einiger Parameter des Immunsystems im Rahmen einer Knie- oder Hüftendoprothese in Abhängigkeit vom Körpergewicht. Diese Ergebnisse können auf ein erhöhtes postoperatives Infektionsrisiko und daraus möglicherweise resultierende Revisionen hinweisen.

Zur Untersuchung der immunologischen Parameter erfolgte zum einen die Typisierung von Lymphozyten. Hierfür wurde der Nachweis von Differenzierungsantigenen auf den Zelloberflächen herangezogen und mittels Durchflusszytometrie ausgewertet. Des Weiteren wurden im Plasma der Patienten Zytokine, die verstärkt bei adipösen Patienten exprimiert werden, ebenso mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Es wurden für diese Studie 52 Patienten untersucht, die erstmals eine Hüft- bzw. Knieendoprothese erhalten haben. Bei der Auswahl der Patienten wurde auf die regelrechten Verteilungsverhältnisse bzgl. Geschlecht, Gewicht und Lokalisation des künstlichen Gelenkersatzes geachtet.

Es konnte bezüglich der Lokalisation des Eingriffes kein Unterschied bei der Betrachtung immunologischer Prozesse festgestellt werden. Betrachtet man die Häufigkeit von postoperativen Infektionen, so zeigen sich auch hier in der Häufigkeit des Auftretens keine Unterschiede zwischen Knie- und Hüftgelenk (Gorenoi et al., 2010; Winkler et al., 2014). Es finden sich des Weiteren keine Abhängigkeiten der Lokalisation des Gelenkersatzes zu Geschlecht oder Gewicht der Patienten.

In dieser Untersuchung zeigt sich, dass die CRP-Konzentrationen von adipösen Patienten sowohl prä- als auch postoperativ im Vergleich zu den normal- und übergewichtigen Patienten ohne signifikanten Unterschied erhöht waren.

Unek et al. veröffentlichten bereits 2010 eine Studie, die CRP-Konzentrationen in Abhängigkeit vom Körpergewicht untersuchte. Dabei stellte sich dar, dass adipöse Patienten ($\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) eine signifikante Erhöhung des CRP-Spiegels im Vergleich

zu Normalgewichtigen ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) aufweisen. Es wurden insgesamt 148 nicht-diabetische Patienten untersucht und ebenso wie in dieser Studie nach dem Body-Mass-Index in 3 Subklassen unterteilt. Eine positive Korrelation zwischen BMI und CRP bestätigt sich ebenso (Unek et al., 2010).

Guldiken et al. haben 2007 die Korrelation zwischen CRP und BMI in einer Gruppe von 80 Patienten untersucht. Hierbei wurde ebenso eine Unterscheidung nach BMI in 3 Subklassen durchgeführt. Es ergab sich eine starke positive Korrelation zwischen BMI und CRP (Guldiken et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse publizierten auch Festa et al. im Jahr 2001 (Festa et al., 2001).

Obwohl sich in der hier durchgeführten Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den BMI-Klassen bezüglich der CRP-Messergebnisse ergab, kann die positive Korrelation zwischen beiden Werten zumindest eine schwache Beziehung darstellen. Die kleine Studienpopulation begründet am ehesten diese vorhandene Tendenz. Dies ist damit wie auch in vielen anderen Studien ein Indiz und eine Bestätigung der Annahme, dass das Fettgewebe als endokrines Organ entzündliche Prozesse im Körper erzeugt, die sich wiederum in der Erhöhung von Entzündungsmarkern wie CRP widerspiegeln.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen wurde bei Betrachtung der T-Lymphozyten deutlich. Frauen zeigten einen signifikant höheren Anteil an T-Lymphozyten bei der präoperativen Messung. Dies ist die erste Studie, die diesen Geschlechtsunterschied nachweisen konnte.

Die zytotoxischen T-Zellen (CD3+CD8+) waren bei den adipösen Patienten deutlich verringert im Vergleich zu den normalgewichtigen Patienten in der präoperativen Betrachtung. O'Rourke et al. haben 2005 eine Untersuchung bezüglich peripherer Lymphozytensubpopulationen bei adipösen Menschen im Blut durchgeführt und konnten ähnliche Erkenntnisse gewinnen. Bei einer kleinen Studienpopulation von 10 adipösen und 10 normalgewichtigen Patienten wurde ebenfalls ein signifikant geringerer Anteil an CD3+CD8+ Zellen bei der adipösen Untersuchungsgruppe festgestellt. Weiterhin konnte man einen signifikanten Anstieg der CD3+CD4+ T-Lymphozyten bei Adipösen nachweisen (O'Rourke et al., 2005). Dies zeigte sich bei der vorliegenden Untersuchung nicht. Zytotoxische T-Zellen sind nach Aktivierung durch Freisetzung einer lytischen Granula in der Lage in Zielzellen (Erreger usw.) die Apoptose zu induzieren. Bei niedrigeren Konzentrationen kommt es zur Verringerung dieser Funktion und damit in Folge zum Verlust einer unspezifischen Abwehrreaktion, so dass sich Erreger vorerst vermehrt ausbreiten können. Ebenso ist bekannt, dass CD8+ T-Lymphozyten eine wichtige Funktion in der Tumorüberwachung übernehmen. Die Konsequenz von niedrigen Serumkonzentrationen würde auch auf ein erhöhtes

Tumorrisiko, welches bei adipösen Patienten bekannt ist, hinweisen (Lehnert and Reincke, 2015; Ungefroren et al., 2015).

Auf der anderen Seite finden sich Studien, die eine Erhöhung der zytotoxischen T-Lymphozyten bei adipösen Patienten beschreiben wie beispielsweise Womack et al. aus dem Jahr 2007. Hier wurden 322 Frauen untersucht, die auf Grund des BMI in 4 Gruppen unterteilt wurden. Es zeigte sich auch hier eine signifikante Erhöhung der CD3+CD4+ Zellen bei den übergewichtigen, adipösen und hochadipösen (BMI > 35 kg/m²) Frauen. Zusätzlich fand man eine Erhöhung der CD3+CD8+ Zellen bei den hochadipösen Patientinnen (Womack et al., 2007). In dieser untersuchten Population lag der Altersdurchschnitt bei 38 ± 8 Jahren, so dass es sich um circa 20 Jahre jüngere Patientinnen als in der hier vorgelegten Untersuchung handelt. Der ethnische Hintergrund der Probandinnen war zu über der Hälfte afro-amerikanisch. Nur circa 11% der untersuchten Frauen waren weiß und entsprachen damit der ethnischen Gruppierung unserer Studie. Es wäre demnach möglich, dass sich innerhalb unterschiedlicher ethnischer Gruppen auch Unterschiede bezüglich des Immunsystems und dessen Verhalten bei Adipositas ergeben. Bereits Rizzardini et al. haben Unterschiede in den Serumspiegeln von Zytokinen bei HIV Patienten afrikanischer zu europäischer Herkunft festgestellt (Rizzardini et al., 1996). Auch Köhler et al. konnten bei der Untersuchung Neugeborener aus Gabun und Österreich Unterschiede im Immunstatus bezogen auf T- und B-Lymphozyten feststellen (Köhler et al., 2008).

Die Analyse der Natürlichen Killerzellen (CD3-CD56+) erbrachte eine signifikante Abnahme von prä- zu postoperativ. Bereits 1998 haben Brand et al. bei der Untersuchung von Patienten nach Operationen am Bewegungsapparat einen Abfall der NK-Zellen von prä- über intra- zu postoperativ festgestellt. Sie begründeten dies mit einem Einfluss der Anästhetika auf das Immunsystem (Brand et al., 1998). Des Weiteren wurde mehrfach beschrieben, dass gerade NK-Zellen durch den operativen Stress vermehrt in das umliegende Gewebe aus dem Blutkreislauf einwandern, um ihrer Aufgabe der unspezifischen Immunabwehr nachzukommen, so dass auch dies die Begründung für die Verminderung der NK-Zellen im Blut postoperativ sein kann.

Männliche Patienten zeigten in der vorliegenden Arbeit einen signifikant höheren Anteil an NK-Zellen als weibliche. Dies konnte erstmalig nachgewiesen werden. Allerdings existieren Studien, die den Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl und Aktivierung von Monozyten und T-Zellen eingehen. So konnten Tollerud et al. zeigen, dass Frauen einen höheren Anteil an CD4+ T-Lymphozyten (T-Helferzellen) haben (Tollerud et al., 1989). Im Gegenzug konnten Iwatani et al. darlegen, dass zytotoxische T-Zellen bei Frauen in niedrigeren Konzentrationen auftreten als bei Männern (Iwatani et al., 1982). Auf der anderen Seite haben Smith et al. und auch Rinder et al. keine

geschlechtsabhängigen Unterschiede finden können (Rinder et al., 1997; Smith et al., 1974).

Es wurde weiterhin in dieser Untersuchung festgestellt, dass tendenziell ein höheres Körpergewicht mit niedrigeren NK-Spiegeln assoziiert ist. 2010 wurde von Gelsing et al. beschrieben, dass Leptin einen regulatorischen Effekt auf die Bildung von NK-Zellen hat. Tian et al. haben 2002 über eine Untersuchung von Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen festgestellt, dass deren NK-Zellzahl zurückging (Tian et al., 2002). Dies bedeutet, dass das Leptin über Bindung an den Leptinrezeptor, der von NK-Zellen exprimiert wird, die Proliferation von NK-Zellen stimuliert.

Bei der vorliegenden Untersuchung konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der NK-Zellzahl und der Leptinkonzentration im Blut festgestellt werden. Dennoch zeigte sich bei beiden eine Konzentrationsab- bzw. zunahme bei zusätzlicher Betrachtung des Körpergewichtes der Patienten.

Bei steigendem Körpergewicht kommt es zur Zunahme der Leptinkonzentration, die ab einem bestimmten Punkt mit einem Funktionsverlust des Leptins und letztendlich einer Leptinresistenz einhergeht. Auch weiterhin wird eine Leptinrezeptordefekt beim Menschen diskutiert (Spitzweg et al., 1998). Würde man davon ausgehen, dass der Leptinrezeptor auf NK-Zellen nicht funktionsfähig ist und es zu keiner Bindung kommt, so würde weiterhin die Proliferation von NK-Zellen nicht erfolgen. Damit wäre die Ursache des geringeren NK-Zellspiegels auf Grund der fehlenden Wirkung von Leptin bedingt. Wrann et al. haben 2012 nachgewiesen, dass eine über längere Zeit stattfindende Stimulation mit Leptin zu einer Erniedrigung der NK-Zellzahl führt (Wrann et al., 2012) und auch hier wird die periphere Leptinresistenz als Ursache dafür gesehen. Eine niedrigere NK-Zellzahl konnte bereits mit einem vermehrten Auftreten von Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und chronisch-rezidivierenden Virusinfektionen in Verbindung gebracht werden (Huebner et al., 2013; Trinchieri, 1995; Wrann et al., 2012).

Innerhalb der vorliegenden Studie konnte eine signifikante Erhöhung des IL-6-Spiegels postoperativ beobachtet werden. Interleukin 6 als ein pro-inflammatorisches Zytokin, das bei akuten und chronischen Entzündungen im Blut nachgewiesen werden kann, zeigt nach einem operativen Eingriff einen physiologischen Konzentrationsanstieg (Heinrich et al., 2007). Minetto et al. konnten im Jahre 2006 einen verstärkten Anstieg von IL-6 nach einem Hüftgelenksaustausch feststellen. Der Anstieg war umso größer je älter die Patienten waren (Minetto et al., 2006). Auch Sha et al. hatten 2008 IL-6 als einen entzündlichen Marker nach Hüft- oder Kniearthroplastie identifiziert, der einen schnelleren Anstieg als CRP zeigte (Shah et al., 2009).

Eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration beim männlichen Geschlecht in Abhängigkeit vom Körpergewicht konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls nachgewiesen werden. Bei den Frauen wurde dies nur durch eine steigende Tendenz aufgezeigt. Bruun et al. haben 2003 bei adipösen Patienten einen 30-40% höheren Serumspiegel an IL-6 gemessen im Vergleich zu den Normalgewichtigen (Bruun et al., 2003). Nach einer Gewichtsreduktion sank der Serumspiegel wiederum. Sha et al. konnte keine Korrelation zwischen BMI und IL-6 nachweisen (Shah et al., 2009). Es ist mittlerweile bekannt, dass das Fettgewebe in der Lage ist eine Vielzahl an Proteinen und Zytokinen selbst zu produzieren. Deshalb wird auch davon ausgegangen, dass adipöse Menschen sich stetig in einem chronisch niedriggradigen Entzündungsprozess befinden.

In dieser Studie konnte dies weiterhin bestätigt werden. Kershaw und Flier beschrieben 2004 IL-6 als ein von Adipozyten freigesetztes Zytokin, welches im viszeralen Fettgewebe doppelt bis dreifach höher exprimiert wird als im subkutanen Fettgewebe. Die Expression und Zirkulation von IL-6 sinkt bei Gewichtsverlust (Kershaw and Flier, 2004). Mit dieser Untersuchung schließen wir uns den bereits bekannten Studien an.

Der Geschlechtervergleich erbrachte in der vorliegenden Arbeit einen signifikant höheren Leptinspiegel bei den Frauen. Teichthal et al. haben bereits 2005 festgestellt, dass Frauen auf Grund eines größeren Körperfettanteils und geringeren Muskelvolumen gegenüber Männern einen signifikant höheren Serumspiegel an Leptin aufweisen (Teichtahl et al., 2005). Hierbei wurde der Einfluss von Leptin auf die Erkrankung Osteoarthritis untersucht. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der höhere Leptinspiegel bei Frauen auch dazu führt, dass dieser verstärkt einen negativen Einfluss auf den Knorpelstoffwechsel nimmt. Denn Dumond et al. haben bereits 2003 Leptin als einen Hauptregulator des Metabolismus von Chondrozyten erkannt (Dumond et al., 2003). Die Menge an Leptin, die in der Synovialflüssigkeit gefunden wurde, korrelierten zum einen mit dem BMI der Patienten, als auch mit der Zerstörung des Knorpelgewebes.

Weiterhin wurde herausgefunden, dass Leptin einen stimulierenden Einfluss auf den weiblichen Reproduktionstrakt hat und abhängig vom Menstruationszyklus der Frau wechselnde Serumspiegel aufweist (Löffler and Spanel-Borowski, 2014). Da wir die weiblichen Patientinnen nicht bzgl. ihres Zykluses befragt und kategorisiert haben, könnte dadurch ein verzerrtes Ergebnis ermittelt wurden sein.

Leptin wurde zunächst bei Entdeckung als schlankmachendes Peptid behandelt, das die Esslust hemmt. Zur Verwunderung wurden aber bei adipösen Menschen erhöhte Leptinspiegel gemessen. Dies führte zur Annahme, dass sich bei Adipösen eine Leptinresistenz entwickelt hat, die nicht mehr zur Hemmung der Esslust führt, sondern

das Gegenteil vermittelt. Bereits 1996 haben Considine et al. die Korrelation zwischen Leptinspiegel und BMI erkannt und eine Insensitivität der Adipösen zur endogenen Leptinproduktion postuliert (Considine et al., 1996). Auch in unserer vorliegenden Untersuchung wurde eindeutig die Zunahme des Leptinspiegels bei Zunahme des BMI festgestellt. Gelsinger et al. beschreiben Leptin ebenso als ein Adipokin, das durch Hemmung des Appetites die Nahrungsaufnahme unterdrücken soll. Wenn es zum Funktionsverlust von Leptin und seiner Rezeptoren kommt, führt das zu unkontrollierter Nahrungsaufnahme, die im weiteren zu Adipositas führen kann (Gelsinger et al., 2010). Weitere genauere Zusammenhänge ließen sich mit Ermittlung des Körperfettanteils und –verteilung (waist to hip ratio) ziehen, auf die in dieser Untersuchung verzichtet wurden.

Lam et Lu haben 2007 die Abhängigkeit der Leptinexpression von inflammatorischen Immunmediatoren beschrieben wie zum Beispiel IL-6 (Lam and Lu, 2007). Es wird weiterhin beschrieben, dass aber auch Leptin die Expression von IL-6 unterstützt, so dass die positive Korrelation aus unserer Studie hierbei bestätigt wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch der Einfluss von Leptin auf das Immunsystem, bestätigt werden kann.

Der sTNF-R zeigte in unserer Untersuchung eine signifikante Zunahme nach dem operativen Eingriff. TNF-R spielt eine wichtige Rolle in der Reaktion des Körpers auf einen chirurgischen Eingriff wie auch IL-6. Es zeigte sich bei Pilz et al. 1996, dass bei herzchirurgischen Risikopatienten ein höherer sTNF-R Spiegel mit dem Schweregrad des postoperativen Krankheitsverlauf positiv korrelierte (Pilz et al., 1996). Der TNF-Rezeptor wurde mittlerweile auch als Prognosemarker für die Sepsis anerkannt (Fraunberger et al., 1996).

Bisher gibt es unterschiedliche Studienergebnisse bei Betrachtung der sTNF-R Serumkonzentration in Abhängigkeit vom Körpergewicht. Diese Studie zeigte postoperativ einen signifikanten Unterschied zwischen normalgewichtigen und adipösen Patienten. Dies zeigte sich auch bei der Untersuchung von Dzienis-Straczkowska et al aus dem Jahr 2003, die bei jungen Adipösen mit normaler und gestörter Glukosetoleranz erhöhte sTNR-R Konzentrationen festgestellt haben (Dzienis-Straczkowska et al., 2003). Ebenso konnten Bullo et al 2003 einer Erhöhung der sTNF-R Serumkonzentration bei erhöhten BMI feststellen (Bulló et al., 2003). Auf Grund der bereits mehrfach gezeigten niedriggradigen chronischen Entzündung bei Adipösen wird davon ausgegangen, dass auch sTNF-R zu diesem Zustand verstärkt beiträgt.

In dieser Studie kann ein Großteil bereits bekannter Aspekte bzgl. des Immunsystems von adipösen Patienten im Vergleich zu normalgewichtigen oder übergewichtigen Patienten bestätigt werden.

Kritisch zu betrachten ist trotzdem die relativ geringe Anzahl an untersuchten Patienten (n=52). Dies verdeutlicht sich vor allem bei der Untersuchung und der Vergleiche der Subgruppen. Aber auf Grund der sehr engen Einschlusskriterien bezüglich der Vorerkrankungen war eine größere Population im angegebenen Zeitraum nicht möglich.

Die Unterteilung der Patienten nach Body-Mass-Index muss auf Grund neuester Erkenntnisse verstärkt diskutiert werden. Der Body-Mass-Index erfasst nur Körpergröße und Körpergewicht. Die Körperfettverteilung und der Körperfettanteil werden hierbei nicht betrachtet, obwohl gerade das viszerale intraabdominelle Fett als endokrines Organ einen entscheidenden Einfluss auf den Stoffwechsel des einzelnen nimmt. (Gelsing et al., 2010; Kopelman, 2000)

Zur Ermittlung von Körperfettanteil und Körperfettverteilung wäre es deshalb sinnvoller gewesen die Waist to Hip Ratio (WHR) oder sogar eine Körperimpedanzmessung durchzuführen, um den Bezug zum Immunsystem und der gemessenen Ergebnisse genauer diskutieren zu können.

Bekannte Entzündungsparameter wie CRP und IL-6 zeigen sich in erhöhter Konzentration bei der adipösen Untersuchungsgruppe. Dies lässt die mehrfach beschriebene und anerkannte Aussage, dass das Fettgewebe zu chronisch niedriggradigen inflammatorischen Prozessen beiträgt, erneut bestätigen. Die zum Teil erstmalige Feststellung erniedrigter Zellzahlen von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen bei adipösen Patienten muss in Zukunft weiterhin untersucht werden, denn eine Vielzahl von Folgeerkrankungen der Adipositas im Besonderen Tumorerkrankungen sind zwar aktuell bekannt, doch lässt sich häufig noch kein Zusammenhang mit dem im Körper ablaufenden Prozessen herstellen. Die ursprüngliche Überlegung hinter dieser Studie, dass adipöse Patienten im postoperativen Verlauf einen abweichenden Immunstatus von normalgewichtigen oder übergewichtigen Patienten aufweisen, ließ sich nicht beobachten. Es ist zu vermuten, dass die Größe des operativen Eingriffes bei den Patienten gleichsam das immunologische Gleichgewicht kurz nach der Operation stört, so dass eventuell etwas später durchgeführte Untersuchungen einen anderweitigen Verlauf erbracht hätten. Deshalb ist es notwendig postoperative Untersuchungen später durchzuführen, um die Einschätzung der Häufigkeit von Revisionsoperationen oder periprothetischen Infektionen ebenso im Zusammenhang mit dem Immunstatus des einzelnen in Abhängigkeit zu seinem Körpergewicht zu bringen.

Erst, wenn der Mensch Adipositas und seinen Auswirkungen auf das Immunsystem vollständig verstanden hat, werden wir auch in der Lage sein, Folgeerkrankungen und Komplikationen nach Operationen besser behandeln zu können.

6 Zusammenfassung

Auf Grund unseres aktuellen Lebensstandards wird das Gesundheitsproblem Adipositas in den kommenden Jahren weiterhin in den Fokus von medizinischen Untersuchungen rücken. Bereits heute ist bekannt, dass Adipositas ein Risikofaktor für eine Vielzahl an Erkrankungen ist. Arthrose, oder auch im allgemeinen Sprachgebrauch als Gelenkverschleiß bekannt, tritt vermehrt bei adipösen Patienten auf. Hierfür verantwortlich sah man viele Jahre nur das Übergewicht, dass die gewichtstragenden Gelenken auf Grund von biomechanischen Prozessen nicht tragen konnten. Doch diese relativ einfache Erklärung lässt außer Acht, dass Adipositas im Körper des Patienten Entzündungsprozesse, durch Freisetzung von immunmodulierenden Substanzen aus dem weißen Fettgewebe, auslöst, die auch Einfluss auf die Auslösung einer Arthrose haben. Zum aktuellen Zeitpunkt ist davon auszugehen, dass die Kombination aus biomechanischer Überlastung und Entzündungsprozessen zum Entstehen der Arthrose beitragen.

In der hier durchgeführten Untersuchung wurde die Immunzellzahl, sowie Zytokinkonzentrationen von normalgewichtigen, übergewichtigen und adipösen Patienten vor und nach Einsetzen einer Knie- oder Hüfttotalendoprothese gemessen. Bereits vorbekannte Ergebnisse, die das Auftreten niedriggradiger chronischer Entzündungsprozesse bei Adipösen begründen, konnten auch hier bestätigt werden. Dazu gehört zum einen die erhöhte CRP-Konzentration bei adipösen Patienten, sowie auch die hohe IL-6 Konzentration. Diese beiden Aspekte sind bereits mehrfach in Studien vorbeschrieben und konnten durch diese weiterhin bestätigt werden.

Die erniedrigte NK-Zellzahl bei adipösen Patienten wurde auch bereits vorbeschrieben und ist am ehesten auf Grund des Einflusses von Leptin bedingt. Leptin als Adipokin wurde auch in der vorliegenden Untersuchung bei Patienten mit einem hohen BMI in hoher Konzentration nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fettgewebe durch Produktion und Sekretion einer Vielzahl an Zytokinen, das gesamte Immunsystem beeinflusst. Das viszerale Fettgewebe wird mittlerweile als inflammatorisches Organ bezeichnet, dass durch seine gute Innervation und Durchblutung neben den Adipozyten eine Vielzahl an Immunzellen enthält. Die zusätzlich freigesetzten Adipozytokine können im gesamten Organismus wirken. Dies bestätigt die bereits bestehenden Theorien, dass die freigesetzten Adipozytokine Erkrankungen, die mit entzündlichen Prozessen einhergehen verstärken und auslösen (z.B. Atherosklerose, Tumorerkrankungen usw.). Gerade deshalb wäre davon auszugehen gewesen, dass sich postoperativ bei den adipösen Patienten Änderungen im Hinblick auf die Konzentrationen der Zytokine als auch der Immunzellen zeigt. Die Unterschiede zwischen den adipösen und

normalgewichtigen Patienten in der postoperativen Betrachtung waren allerdings nicht zu sehen.

Zur Weiterführung der ursprünglichen Zielsetzung sollten Untersuchungen der Patienten im Verlauf bezüglich des Auftretens von Revisionsoperationen durchgeführt werden. Hierbei können die vorliegenden Ergebnisse für weitere Vergleiche herangezogen werden. Auch wären erneute Analysen im Verlauf nach der Operation zu empfehlen, um die eigentliche Hypothese dieser Arbeit vielleicht doch bestätigen oder gänzlich verwerfen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Anatoliotakis, N., Deftereos, S., Bouras, G., Giannopoulos, G., Tsounis, D., Angelidis, C., Kaoukis, A., Stefanadis, C., 2013. Myeloperoxidase: Expressing Inflammation and Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 13, 115–138. doi:10.2174/1568026611313020004

Apple, F.S., Wu, A.H.B., Mair, J., Ravkilde, J., Panteghini, M., Tate, J., Pagani, F., Christenson, R.H., Mockel, M., Danne, O., Jaffe, A.S., Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC, 2005. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin. Chem.* 51, 810–824. doi:10.1373/clinchem.2004.046292

Ashley, D.T., O'Sullivan, E.P., Davenport, C., Devlin, N., Crowley, R.K., McCaffrey, N., Moyna, N.M., Smith, D., O'Gorman, D.J., 2011. Similar to adiponectin, serum levels of osteoprotegerin are associated with obesity in healthy subjects. *Metabolism.* 60, 994–1000. doi:10.1016/j.metabol.2010.10.001

Blüher, P.D.M., 2014. Das Fettgewebe – ein endokrines Organ. *Internist* 55, 687–698. doi:10.1007/s00108-014-3456-3

Böttner, D.A., Kratzsch, P.D.J., Beck-Sickinger, P.D.A.G., Stumvoll, P.D.M., Kiess, P.D.W., 2006. Rolle von endokrinen und metabolischen Faktoren des Fettgewebes in der Pathophysiologie des metabolischen Syndroms, in: Ganten, P.D. med D., Ruckpaul, P.D.K., Köhrle, P.D.J. (Eds.), *Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen, Molekulare Medizin.* Springer Berlin Heidelberg, pp. 411–443.

Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2797–2805. doi:10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004

Brake, D.K., Smith, E.O., Mersmann, H., Smith, C.W., Robker, R.L., 2006. ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C1232–1239. doi:10.1152/ajpcell.00008.2006

Brand, J.-M., Kirchner, H., Poppe, C., Schmucker, P., 1998. Zytokinfreisetzung und Verteilung mononukleärer Zellen im peripheren Blut unter dem Einfluß der Allgemeinnarkose. *Anaesthesist* 47, 379–386. doi:10.1007/s001010050573

Bruun, J.M., Verdich, C., Toubro, S., Astrup, A., Richelsen, B., 2003. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. Effect of weight loss in obese men. *Eur. J. Endocrinol.* 148, 535–542. doi:10.1530/eje.0.1480535

Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J., Simonet, W.S., 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 12, 1260–1268.

Bulló, M., García-Lorda, P., Megias, I., Salas-Salvadó, J., 2003. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes. Res.* 11, 525–531. doi:10.1038/oby.2003.74

Byun, S.H., Kwon, E.B., Kim, S.Y., 2014. The relationship between serum adiponectin and inflammatory cytokines in obese Korean juveniles. *Korean J. Pediatr.* 57, 533–537. doi:10.3345/kjp.2014.57.12.533

Choe, S.S., Huh, J.Y., Hwang, I.J., Kim, J.I., Kim, J.B., 2016. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front. Endocrinol.* 7. doi:10.3389/fendo.2016.00030

Christoph, M.J., Allison, M.A., Pankow, J.S., Decker, P.A., Kirsch, P.S., Tsai, M.Y., Sale, M.M., de Andrade, M., Sicotte, H., Tang, W., Hanson, N.Q., Berardi, C., Wassel, C.L., Larson, N.B., Bielinski, S.J., 2016. Impact of adiposity on cellular adhesion: The Multi-Ethnic Study of atherosclerosis (MESA). *Obes. Silver Spring Md* 24, 223–230. doi:10.1002/oby.21245

Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougnères, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B., 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392, 398–401. doi:10.1038/32911

Conde, J., Scotece, M., López, V., Gómez, R., Lago, F., Pino, J., Gómez-Reino, J.J., Gualillo, O., 2013. Adipokines: novel players in rheumatic diseases. *Discov. Med.* 15, 73–83.

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., 1996. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295. doi:10.1056/NEJM199602013340503

Cooke, A.A., Connaughton, R.M., Lyons, C.L., McMorrow, A.M., Roche, H.M., 2016. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.021

Dieterle, D.C., Landgraf, R., 2006. Folgeerkrankungen und Komplikationen der Adipositas. *Internist* 47, 141–149. doi:10.1007/s00108-005-1552-0

Dumond, H., Presle, N., Terlain, B., Mainard, D., Loeuille, D., Netter, P., Pottie, P., 2003. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 3118–3129. doi:10.1002/art.11303

Dzienis-Straczowska, S., Straczowski, M., Szelachowska, M., Stepień, A., Kowalska, I., Kinalska, I., 2003. Soluble Tumor Necrosis Factor- α Receptors in Young Obese Subjects With Normal and Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care* 26, 875–880. doi:10.2337/diacare.26.3.875

Fagerer, N., Kullich, W., 2010. Adipozytokine bei Rheumatoider Arthritis und Adipositas. *Wien. Med. Wochenschr.* 160, 391–398. doi:10.1007/s10354-010-0808-z
Fantuzzi, G., 2009. Three questions about leptin and immunity. *Brain. Behav. Immun.* 23, 405–410. doi:10.1016/j.bbi.2008.10.007

Festa, A., D'Agostino, R., Williams, K., Karter, A.J., Mayer-Davis, E.J., Tracy, R.P., Haffner, S.M., 2001. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25, 1407–1415. doi:10.1038/sj.ijo.0801792

- Figenschau, Y., Knutsen, G., Shahazeydi, S., Johansen, O., Sveinbjörnsson, B., 2001. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 190–197. doi:10.1006/bbrc.2001.5543
- Fischer-Posovszky, D. rer nat P., 2010. Das Fettgewebe als endokrines Organ, in: *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 235–243.
- Fraunberger, P., Walli, A.K., Seidel, D., 2001. Zytokinanalytik Was ist machbar – was ist sinnvoll? *Internist* 42, 35–46. doi:10.1007/s001080050722
- Fraunberger, P., Walli, A.K., Seidel, D., 1996. Stellenwert von Zytokinen in der Sepsis-Diagnostik. *Transfus. Med. Hemotherapy* 23, 109–116. doi:10.1159/000223357
- Fu, C.-P., Sheu, W.H.-H., Lee, I.-T., Tsai, I.-C., Lee, W.-J., Liang, K.-W., Lee, W.-L., Lin, S.-Y., 2013. Effects of weight loss on epicardial adipose tissue thickness and its relationship between serum soluble CD40 ligand levels in obese men. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 421, 98–103. doi:10.1016/j.cca.2013.03.005
- Gannagé-Yared, M.-H., Fares, F., Semaan, M., Khalife, S., Jambart, S., 2006. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 64, 652–658. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02522.x
- Gannagé-Yared, M.-H., Yaghi, C., Habre, B., Khalife, S., Noun, R., Germanos-Haddad, M., Trak-Smayra, V., 2008. Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 158, 353–359. doi:10.1530/EJE-07-0797
- Gelsinger, C., Tschoner, A., Kaser, S., Ebenbichler, C.F., 2010. Adipokine update – neue Moleküle, neue Funktionen. *Wien. Med. Wochenschr.* 160, 377–390. doi:10.1007/s10354-010-0781-6
- Gorenoi, V., Schönermark, M., Hagen, A., 2010. Infektionsschutz in der Knieendoprothetik.
- Gressner, A.M., Arndt, T., 2013. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer-Verlag.
- Griffin, T.M., Guilak, F., 2008. Why is obesity associated with osteoarthritis? Insights from mouse models of obesity. *Biorheology* 45, 387–398.
- Guldiken, S., Demir, M., Arikan, E., Turgut, B., Azcan, S., Gerenli, M., Tugrul, A., 2007. The levels of circulating markers of atherosclerosis and inflammation in subjects with different degrees of body mass index: Soluble CD40 ligand and high-sensitivity C-reactive protein. *Thromb. Res.* 119, 79–84. doi:10.1016/j.thromres.2005.12.019
- Halder, P.-D.D. med A.M., Stiehler, D. med M., Günther, P.D. med K.-P., 2012. Historie und Epidemiologie, in: Claes, L., Kirschner, P., Perka, C., Rudert, M. (Eds.), *AE-Manual der Endoprothetik*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–20.

Heinrich, P.D.P.C., Haan, P.D.S., Hermanns, D.H.M., Löffler, P.D.G., Müller-Newen, P.D.G., Schaper, P.D.F., 2007. Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion, in: Löffler, P.D.G., Petrides, P.D.P.E., Heinrich, P.D.P.C. (Eds.), *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, pp. 755–808.

Herold, G., 2013. *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. Herold, Köln.

Huebner, L., Engeli, S., Wrann, C.D., Goudeva, L., Laue, T., Kielstein, H., 2013. Human NK cell subset functions are differentially affected by adipokines. *PloS One* 8, e75703. doi:10.1371/journal.pone.0075703

Iwatani, Y., Amino, N., Mori, H., Asari, S., Ina, K., Ennyu, K., Miyai, K., 1982. Effects of various isolation methods for human peripheral lymphocytes on T cell subsets determined in a fluorescence activated cell sorter (FACS), and demonstration of a sex difference of suppressor/cytotoxic T cells. *J. Immunol. Methods* 54, 31–42.

Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C.F., Tilg, H., Patsch, J.R., 2003. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 286–290. doi:10.1016/j.bbrc.2003.07.003

Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556. doi:10.1210/jc.2004-0395

King, L.K., Henneicke, H., Seibel, M.J., March, L., Anandacoomarasmy, A., 2015. Association of adipokines and joint biomarkers with cartilage-modifying effects of weight loss in obese subjects. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 23, 397–404. doi:10.1016/j.joca.2014.11.020

Kintscher, U., Hartge, M., Hess, K., Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Wabitsch, M., Fischer-Posovszky, P., Barth, T.F.E., Dragun, D., Skurk, T., Hauner, H., Blüher, M., Unger, T., Wolf, A.-M., Knippschild, U., Hombach, V., Marx, N., 2008. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1304–1310. doi:10.1161/ATVBAHA.108.165100

Köhler, C., Adegnik, A.A., Van Der Linden, R., Agnandji, S.T., Chai, S.K., Luty, A.J.F., Szepfalusi, Z., Kreamsner, P.G., Yazdanbakhsh, M., 2008. Comparison of Immunological Status of African and European Cord Blood Mononuclear Cells. *Pediatr. Res.* 64, 631–636. doi:10.1203/PDR.0b013e31818718ba

Koistinen, H.A., Karonen, S.L., Iivanainen, M., Koivisto, V.A., 1998. Circulating leptin has saturable transport into intrathecal space in humans. *Eur. J. Clin. Invest.* 28, 894–897.

Koonce, R.C., Bravman, J.T., 2013. Obesity and osteoarthritis: more than just wear and tear. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 21, 161–169. doi:10.5435/JAAOS-21-03-161
Kopelman, P.G., 2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635–643. doi:10.1038/35007508

Kvasnicka, T., Kvasnicka, J., Ceska, R., Vrablik, M., 2003. Increase of inflammatory state in overweight adults with combined hyperlipidemia. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* 13, 227–231.

- Lahat, N., Zlotnick, A.Y., Shtiller, R., Bar, I., Merin, G., 1992. Serum levels of IL-1, IL-6 and tumour necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin. Exp. Immunol.* 89, 255–260.
- Lam, Q.L.K., Lu, L., 2007. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 1–13.
- Lehnert, H., Reincke, P.D.M., 2015. Adipositas. *Internist* 56, 109–110.
doi:10.1007/s00108-014-3531-9
- Löffler, D.S., Spanel-Borowski, K., 2014. Leptin — Befunde über seine Lokalisation und Überlegungen zu seiner Funktion im weiblichen Reproduktionstrakt. *Reproduktionsmedizin* 18, 283–288. doi:10.1007/s00444-002-0364-0
- Minetto, M.A., Oprandi, G., Saba, L., Mussino, S., Aprato, A., Massè, A., Angeli, A., Gallinaro, P., 2006. Serum interleukin-6 response to elective total hip replacement surgery. *Int. Orthop.* 30, 172–176. doi:10.1007/s00264-006-0073-3
- Neumeister, B., Böhm, B.O., 2015. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*, 5th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München.
- Nijhuis, J., Rensen, S.S., Slaats, Y., van Dielen, F.M.H., Buurman, W.A., Greve, J.W.M., 2009. Neutrophil Activation in Morbid Obesity, Chronic Activation of Acute Inflammation. *Obesity* 17, 2014–2018. doi:10.1038/oby.2009.113
- Nordström, D., Santavirta, S., Antti-Poika, I., Kontinen, Y.T., 1994. Local immune inflammatory response to infected total hip and knee replacements. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 113, 159–163.
- Offermanns, S., 2012. Adipositas, in: *Pharmakologie & Toxikologie*, Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, pp. 623–627.
- Olszanecka-Glinianowicz, M., Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Zurakowski, A., 2004. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism.* 53, 1268–1273.
- O'Rourke, R.W., Kay, T., Scholz, M.H., Diggs, B., Jobe, B.A., Lewinsohn, D.M., Bakke, A.C., 2005. Alterations in T-Cell Subset Frequency in Peripheral Blood in Obesity. *Obes. Surg.* 15, 1463–1468. doi:10.1381/096089205774859308
- Pallu, S., Francin, P.-J., Guillaume, C., Gegout-Pottie, P., Netter, P., Mainard, D., Terlain, B., Presle, N., 2010. Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R112. doi:10.1186/ar3048
- Pap, G., Meinecke, I., 2011. Ätiologie und Pathogenese der Gonarthrose, in: Wirtz, D.C. (Ed.), *AE-Manual der Endoprothetik*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 33–46.
- Pezzutto, A. Ulrichs, Timo, Burmester, Gerd-Rüdiger, Wirth, Jürgen, 2007. *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen - Labor - Klinik*. Thieme, Stuttgart; New York.
- Pilz, G., Fraunberger, P., Appel, R., Kreuzer, E., Werdan, K., Walli, A., Seidel, D., 1996. Bedeutung erhöhter TNF-Rezeptorspiegel bei herzchirurgischen Risikopatienten. *Infusionsther Transfusionsmed* 1996 23 Suppl 4 29-34.

- Rinder, C.S., Mathew, J.P., Rinder, H.M., Tracey, J.B., Davis, E., Smith, B.R., 1997. Lymphocyte and monocyte subset changes during cardiopulmonary bypass: effects of aging and gender. *J. Lab. Clin. Med.* 129, 592–602.
- Rink, P.D. rer nat L., Kruse, P.D. rer nat A., Haase, D. rer nat H., 2012a. Das Immunsystem: Eine Übersicht, in: *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 1–17.
- Rink, P.D. rer nat L., Kruse, P.D. rer nat A., Haase, D. rer nat H., 2012b. Die Immunantwort durch Lymphocyten, in: *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 75–104.
- Rink, P.D. rer nat L., Kruse, P.D. rer nat A., Haase, D. rer nat H., 2012c. Molekulare Immunologie, in: *Immunologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 105–118.
- Rizzardini, G., Piconi, S., Ruzzante, S., Fusi, M.L., Lukwiya, M., Declich, S., Tamburini, M., Villa, M.L., Fabiani, M., Milazzo, F., Clerici, M., 1996. Immunological activation markers in the serum of African and European HIV-seropositive and seronegative individuals. *AIDS Lond. Engl.* 10, 1535–1542.
- Sartipy, P., Loskutoff, D.J., 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7265–7270. doi:10.1073/pnas.1133870100
- Schäffler, P.D. med A., Bollheimer, P.-D.D. med C., Büttner, P.-D.D. med R., Girlich, D. med C., Aslanidis, P.D. rer nat C., Dietmaier, P.-D.D. rer nat W., Bala, D. med M., Guralnik, D. med V., Karrasch, P.D. med T., Schneider, D. med S., 2015. Fettgewebisdysfunktion, in: Schäffler, A. (Ed.), *Funktionsdiagnostik in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 185–190.
- Schmitz, S., 2011. Zellbiologische und Routinemethoden, in: *Der Experimentator: Zellkultur, Experimentator*. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 205–222.
- Schütt, C., Bröker, B., 2011. Was gehört zum Immunsystem?, in: *Grundwissen Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, pp. 2–21.
- Shah, K., Mohammed, A., Patil, S., McFadyen, A., Meek, R.M.D., 2009. Circulating Cytokines after Hip and Knee Arthroplasty: A Preliminary Study. *Clin. Orthop.* 467, 946–951. doi:10.1007/s11999-008-0562-3
- Simopoulou, T., Malizos, K.N., Iliopoulos, D., Stefanou, N., Papatheodorou, L., Ioannou, M., Tsezou, A., 2007. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 15, 872–883. doi:10.1016/j.joca.2007.01.018
- Smith, M., Evans, J., Steel, C.M., 1974. Age-related VARIATION IN PROPORTION OF CIRCULATING T CELLS. *The Lancet* 304, 922–924. doi:10.1016/S0140-6736(74)91130-1
- Spitzweg, C., Joba, W., Heufelder, A.E., 1998. Leptin — Neue Erkenntnisse zur Pathogenese der Adipositas. *Med. Klin.* 93, 478–485. doi:10.1007/BF03042597

- Stannus, O., Jones, G., Cicuttini, F., Parameswaran, V., Quinn, S., Burgess, J., Ding, C., 2010. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 18, 1441–1447. doi:10.1016/j.joca.2010.08.016
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., Lazar, M.A., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312. doi:10.1038/35053000
- Sweed, Y., Puri, P., Reen, D.J., 1992. Papers Presented at the 43rd Annual Meeting of the Surgical Section of the American Academy of Pediatrics Early induction of IL-6 in infants undergoing major abdominal surgery. *J. Pediatr. Surg.* 27, 1033–1037. doi:10.1016/0022-3468(92)90553-J
- Takahashi, K., Mizuarai, S., Araki, H., Mashiko, S., Ishihara, A., Kanatani, A., Itadani, H., Kotani, H., 2003. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J. Biol. Chem.* 278, 46654–46660. doi:10.1074/jbc.M309895200
- Teichtahl, A.J., Wluka, A.E., Proietto, J., Cicuttini, F.M., 2005. Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. *Med. Hypotheses* 65, 312–315. doi:10.1016/j.mehy.2005.02.026
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H., Gao, B., 2002. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 297–302. doi:10.1016/S0006-291X(02)02462-2
- Tollerud, D.J., Clark, J.W., Brown, L.M., Neuland, C.Y., Pankiw-Trost, L.K., Blattner, W.A., Hoover, R.N., 1989. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *J. Clin. Immunol.* 9, 214–222.
- Trayhurn, P., 2005. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. *Endocrinology* 146, 1003–1005. doi:10.1210/en.2004-1597
- Trinchieri, G., 1995. Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin. Immunol.* 7, 83–88. doi:10.1006/smim.1995.0012
- Unek, I.T., Bayraktar, F., Solmaz, D., Ellidokuz, H., Sisman, A.R., Yuksel, F., Yesil, S., 2010. The levels of soluble CD40 ligand and C-reactive protein in normal weight, overweight and obese people. *Clin. Med. Res.* 8, 89–95. doi:10.3121/cmr.2010.889
- Ungefroren, H., Gieseler, F., Lehnert, H., 2015. Adipositas und Krebs. *Internist* 56, 127–136. doi:10.1007/s00108-014-3536-4
- Wang, H.-W., Babic, A.M., Mitchell, H.A., Liu, K., Wagner, D.D., 2005. Elevated soluble ICAM-1 levels induce immune deficiency and increase adiposity in mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1018–1020. doi:10.1096/fj.04-3094fje
- White, U.A., Stephens, J.M., 2011. The gp130 receptor cytokine family: regulators of adipocyte development and function. *Curr. Pharm. Des.* 17, 340–346.

Winkler, T., Trampuz, A., Hardt, S., Janz, V., Kleber, C., Perka, C., 2014. Periprothetische Infektion nach Hüftendoprothetik. *Orthop.* 43, 70–78. doi:10.1007/s00132-013-2132-y

Witkowska, A.M., 2005. Soluble ICAM-1: a marker of vascular inflammation and lifestyle. *Cytokine* 31, 127–134. doi:10.1016/j.cyto.2005.04.007

Womack, J., Tien, P.C., Feldman, J., Shin, J.H., Fennie, K., Anastos, K., Cohen, M.H., Bacon, M.C., Minkoff, H., 2007. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* 56, 998–1004. doi:10.1016/j.metabol.2007.03.008

Wrann, C.D., Laue, T., Hübner, L., Kuhlmann, S., Jacobs, R., Goudeva, L., Nave, H., 2012. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E108–116. doi:10.1152/ajpendo.00057.2011

Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W., Ballantyne, C.M., 2007. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115, 1029–1038. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638379

8 Thesen

1. Adipositas ist eines der wichtigsten Gesundheitsprobleme des 21. Jahrhunderts.
2. Adipositas ist mit dem Auftreten von chronisch niedriggradigen Entzündungsprozessen im weißen Fettgewebe assoziiert, da Adipozytokine in der Lage sind metabolisch und immunmodulierend systemisch zu wirken.
3. Die Entstehung der Arthrose, welche als ultima ratio den Einsatz eines künstlichen Gelenkes vorsieht, wird auch durch die Wirkung von Adipozytokinen beeinflusst.
4. Adipöse Patienten weisen eine andere Zusammensetzung ihres immunologischen Systems auf als normal- oder übergewichtige Patienten.
5. 52 Patientinnen und Patienten wurden in Abhängigkeit ihres Körpergewichts mittels Durchflusszytometrie auf die Serumkonzentrationen von B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen, sowie Zytokinen untersucht.
6. Die adipöse Untersuchungsgruppe weist im Vergleich zur normalgewichtigen und übergewichtigen Untersuchungsgruppe erhöhte CRP Konzentrationen im Serum auf, die ebenso wie die erhöhten IL-6 Konzentrationen, auf einen inflammatorischen Prozess hinweisen.
7. Sowohl die Zellzahl der NK-Zellen, als auch der zytotoxischen T-Zellen ist bei adipösen Patientinnen und Patienten erniedrigt.
8. Die Leptinserumkonzentrationen sind bei adipösen Patientinnen und Patienten erhöht.
9. Es finden sich keine Unterschiede bezüglich der Konzentrationen von Immunzellen und Zytokinen im operativen Verlauf mit zeitnaher postoperativer Untersuchung zwischen den einzelnen Gewichtsklassen.
10. Auf Grund der veränderten präoperativen immunologischen Belastung bei adipösen Patientinnen und Patienten lässt sich vermuten, dass es bei diesen gehäuft zu Revisionsendoprothesen kommt auf Grund des erhöhten Risikos für periprothetische Infektionen.

Tabellarischer Lebenslauf

Auf die Veröffentlichung des Lebenslaufes wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version verzichtet.

Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel: „Untersuchung von Immunparametern im Blut bei Patienten vor und nach Primärendoprothetik des Hüft- und Kniegelenkes in Abhängigkeit vom Körpergewicht“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit ist bisher weder im In - noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungskommission vorgelegt worden.

Düsseldorf, 12.01.2017

A.-L. Kürvers

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich keinen vorausgegangenen Promotionsversuch unternommen habe, und dass kein Promotionsversuch an einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung läuft.

Düsseldorf, 12.01.2017

A.-L. Kürvers

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen, die mich bei der Realisierung dieser Arbeit, aber auch in der gesamten Zeit meiner Ausbildung bis zur Approbation als Ärztin unterstützt haben, herzlich bedanken.

Zunächst einmal bedanke ich mich bei Frau Professorin Heike Kielstein und Herrn Professor David Wohlrab, die für mich in gemeinschaftlicher Diskussion dieses Thema ausgetüftelt haben und mich bei Rückschlägen und teilweise festgefahrenen Situationen immer wissenschaftlich beraten und unterstützt haben.

Für die immer bestehende Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit danke ich Frau Janine Jahn, die es nie Leid wurde meine endlosen Fragen zur Methodik zu beantworten und mir jeden einzelnen Bearbeitungsschritt noch so detailliert erklärte.

Außerdem möchte ich Frau Angela Rosemeier für die Betreuung im Labor und den guten praktischen Ratschlägen danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern, die mich nicht einfach nur über mein bisheriges Leben begleitet haben, sondern mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und letztendlich mit ihren investigativen Fragen diese fast nicht enden wollende Arbeit zum Abschluss gebracht haben.

Außerdem danke ich meinem Ehemann Julian, der mich bei der Bearbeitung in allen erdenklichen Gefühlslagen ertragen musste, für seine stoische Ruhe und Geduld, die mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückbrachte.