

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Walter Hermanns

**Quantitativ stereologische Analysen der mittleren Fettzellvolumina
verschiedener Fettgewebedepots
normalgewichtiger und adipöser Katzen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Lina Nagel, geb. Farhat
aus Solingen

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Weißes Fettgewebe	3
1.1.	Morphologie des weißen Fettgewebes	3
1.2.	Gefäßversorgung und Innervation des Fettgewebes	4
1.2.1.	Blutgefäßversorgung	4
1.2.2.	Lymphgefäßversorgung	5
1.2.3.	Innervation	6
1.3.	Verteilung des weißen Fettgewebes im Körper	7
1.3.1.	Fettgewebeverteilung beim Menschen.....	8
1.3.2.	Fettgewebeverteilung bei Katzen	9
1.4.	Aufgaben des weißen Fettgewebes	10
2.	Reaktionsformen des Fettgewebes auf ein länger anhaltendes Nährstoffüberangebot.....	11
2.1.	Adipozytäre Hypertrophie.....	11
2.2.	Adipozytäre Hyperplasie.....	11
2.3.	Einflussfaktoren auf die Wachstumsform von Fettgewebe.....	12
3.	Methoden zur Untersuchung von Fettzellgrößen.....	14
4.	Morphometrische Untersuchungen von Fettzellen	16
5.	Adipositas.....	18
6.	Methoden zur Bestimmung des Ernährungsgrades bei Katzen	19
7.	Komorbiditäten der Fettleibigkeit.....	21
8.	Fettzellgröße verschiedener Fettgewebedepots und ihr Zusammenhang mit fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen	22
III.	MATERIAL UND METHODEN	25
1.	Vorversuche	25
1.1.	Entnahmetechnik und Probengewinnung.....	25
1.2.	Vorversuch zur Eignung verschiedener Kunststoff-Einbettungsmedien wie Glycolmethacrylat-Methylmethacrylat (GMA-MMA) und Epoxidharz....	29

1.2.1.	Prozessierung der Fettgewebeproben für die GMA-MMA-Einbettung	29
1.2.2.	Einbettung der Fettgewebeproben in GMA-MMA, serielle Schnittherstellung, Färbung der GMA-MMA-Schnitte.....	29
1.2.3.	Prozessierung der Gewebeproben für die Einbettung in Epoxidharz.....	29
1.2.4.	Einbettung in Epoxidharz und Semidünnschnittherstellung.....	29
1.2.5.	Toluidinblau-Safraninfärbung der Epoxidharz-Semidünnschnitte.....	30
2.	Tiere, Material und Methoden	31
2.1.	Übersicht über die durchgeführten Analysen	31
2.2.	Tiere	31
2.3.	Präparation der zu untersuchenden Fettgewebelokalisationen und systematisch zufällige Fettgewebeprobenentnahme.....	33
2.4.	Prozessierung der Proben für histologische, morphometrische und quantitativ stereologische Analysen	34
2.4.1.	Fixation, Entfettung und Agareinbettung	34
2.4.2.	Einbettung der Fettgewebeproben in GMA-MMA und serielle Schnittherstellung	35
2.4.3.	Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der GMA-MMA-Schnitte	37
2.4.4.	Paraffineinbettung und Schnittherstellung.....	37
2.4.5.	Masson-Trichrom-Färbung.....	38
2.5.	Quantitativ stereologische Analysen	39
2.5.1.	Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe	40
2.5.2.	Numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe.....	42
2.5.2.1.	Prinzip des physikalischen Disektors	42
2.5.2.2.	Bestimmung der orthogonalen Linearprojektion der Fettzellkernanschnittprofile	44
2.5.2.3.	Bestimmung der nominellen Schnittdicke.....	44
2.5.2.4.	Bestimmung der Einbettungsschrumpfung der Fettgewebeproben sämtlicher zu untersuchenden Lokalisationen	45
2.5.2.5.	Bestimmung der numerischen Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe.....	47
2.5.3.	Bestimmung der mittleren Fettzellvolumina in den untersuchten Lokalisationen.....	49
2.6.	Statistische Tests.....	49
IV.	ERGEBNISSE.....	51

1.	Ergebnisse der Vorversuche.....	51
1.1.	Entnahmetechnik und Probengewinnung.....	51
1.2.	Eignung verschiedener Einbettungsmedien wie Epoxidharz und GMA-MMA zur Durchführung des physikalischen Disektorverfahrens	51
1.3.	Ergebnisse der GMA-MMA-Einbettung.....	51
1.4.	Ergebnisse der Epoxidharz-Einbettung.....	53
2.	Ergebnisse der Hauptversuche	53
2.1.	Tiere	53
2.2.	Makroskopische und histologische Befunde des Fettgewebes	55
2.3.	Ergebnisse der Einbettungsschrumpfung der untersuchten Fettgewebeprobe n	56
2.4.	Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelokalisationen	57
2.5.	Numerische Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelokalisationen	58
2.6.	Mittlere Fettzellvolumina der untersuchten Fettgewebelokalisationen aller untersuchten Tiere	59
2.7.	Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger und adipöser Tiere in den untersuchten Fettgewebelokalisationen.....	62
2.7.1.	Subkutanes Fettgewebe	65
2.7.2.	Umbilikales Fettgewebe	66
2.7.3.	Omentales Fettgewebe	67
2.7.4.	Mesenteriales Fettgewebe	68
2.7.5.	Peripankreatisches Fettgewebe	69
2.7.6.	Perirenales Fettgewebe.....	70
2.7.7.	Retrobulbäres Fettgewebe	71
2.8.	Korrelation des mittleren Fettzellvolumens mit dem BCS in der jeweiligen Fettgewebelokalisation.....	72
V.	DISKUSSION	75
1.	Probengewinnung und Prozessierung	76
2.	Fettgewebeschrumpfung bei Einbettung in GMA-MMA.....	77
3.	Experimentelles Design und Methodik	77
3.1.	Untersuchtes Tierkollektiv	77

3.2.	Verwendung des Body Condition Scores zur Beurteilung des Ernährungsgrades.....	78
3.3.	Wahl der untersuchten Fettgewebelokalisationen	79
3.4.	Wahl der Methode zur Bestimmung der mittleren Fettzellvolumina	79
4.	Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelokalisationen	81
5.	Mittleres Fettzellvolumen.....	82
5.1.	Mittlere Fettzellvolumina aller untersuchten Tiere	82
5.2.	Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger Tiere (BCS < 6 > 2)	83
5.3.	Mittlere Fettzellvolumina übergewichtiger bzw. adipöser Tiere (BCS ≥ 6)	85
5.4.	Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger und übergewichtiger bzw. adipöser Tiere im Vergleich	86
6.	Korrelation des BCS und der mittleren Fettzellvolumina in der jeweiligen Lokalisation	87
7.	Schlussfolgerungen und Ausblick	89
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	93
VII.	SUMMARY	95
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
IX.	ANHANG.....	111
1.	Verwendete Materialien für die Herstellung der Kunststoffschritte	111
1.1.	Lösungen für die GMA-MMA-Einbettung.....	111
1.1.1.	Autotechnikenspüllösung	111
1.1.2.	0,1 M Cacodylatpuffer.....	111
1.1.3.	Lösung A.....	111
1.1.4.	Lösung B.....	112
1.2.	Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der GMA-MMA-Schnitte	112
1.2.1.	1% iges HCl-Äthanol.....	112
1.2.2.	Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung	112
1.2.3.	Stammlösung Eosin	112
1.2.4.	Stammlösung Phloxin.....	112

1.2.5.	96%ige Essigsäure.....	113
1.3.	Lösung für die Herstellung der Epoxidharz-Schnitte.....	113
1.3.1.	Phosphatpuffer nach Sørensen 0,067 M, pH 4,7.....	113
1.3.2.	Lösung I.....	113
1.3.3.	Lösung II.....	113
1.3.4.	Osmiumtetroxid 1%.....	113
1.3.5.	Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3.....	114
1.3.6.	Epoxidharz-Einbettungslösung.....	114
1.3.7.	Weiche Mischung.....	114
1.3.8.	Harte Mischung.....	114
1.4.	Lösung für die Färbung der Epoxidharz-Schnitte.....	115
1.4.1.	Toluidinblau-Lösung.....	115
1.4.2.	Safranin O Lösung.....	115
2.	Verwendete Materialien für die Färbung der Paraffinschnitte.....	115
2.1.	Masson-Trichrom-Färbung der Paraffinschnitte.....	115
2.1.1.	Weigerts Eisenhämatoxylin.....	115
2.1.2.	Lösung I.....	116
2.1.3.	Lösung II.....	116
2.1.4.	Rote Farbe-Gebrauchslösung.....	116
2.1.5.	Lösung I.....	116
2.1.6.	Lösung II.....	116
2.1.7.	Azophloxin-Lösung.....	117
2.1.8.	Phosphorwolframsäure-Orange G.....	117
2.1.9.	Anilinblau.....	117
2.1.10.	0,5%ige Essigsäure.....	117
X.	DANKSAGUNG.....	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqu. dest.	Aqua destillata
BCS	Body Condition Score
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
et al.	et alii (und andere)
FZ	Fettzellen
FG	Fettgewebe
g	Gramm
GMA-MMA	Glycolmethacrylat-Methylmethacrylat
l	Liter
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
Pl	picoliter
SD	Standardabweichung
Sec.	Sekunde(n)
Std.	Stunde
u.a.	unter anderem
µl	Mikroliter
µm ²	Quadratmikrometer
µm ³	Kubikmikrometer

I. EINLEITUNG

Beim Menschen gewinnen Übergewicht, Fettleibigkeit und fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheiten und Bluthochdruck insbesondere in Wohlstandsgesellschaften epidemiologisch und wirtschaftlich immer mehr an Bedeutung (Popkin et al., 2006).

Auch Tierärzte sehen sich mit Übergewicht und Fettleibigkeit sowie den damit einhergehenden Problemen bei Haustieren konfrontiert. Bis zu einem Drittel der Katzenpopulation westlicher Haushalte ist übergewichtig oder fettleibig (Lund et al., 2005; Colliard et al., 2009), begünstigt durch unzureichende Bewegung, Wohnungshaltung, Kastration und Fehlernährung (Colliard et al., 2009). Ebenso wie beim Menschen geht auch bei Katzen Übergewicht und Adipositas mit fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus einher (Scarlett und Donoghue, 1998; Lund et al., 2005).

Untersuchungen an Labortieren und am Menschen haben gezeigt, dass Depotfett bei lang anhaltender positiver Energiebilanz sowohl mit einer Zunahme der Zellzahl, Hyperplasie, als auch mit einer Zunahme der Fettzellgröße, Hypertrophie, reagiert. Als mögliche Faktoren, welche eine adipozytäre Hypertrophie bzw. Hyperplasie beeinflussen, werden neben Adipokinen, der Vaskularisations- und Innervationsdichte der jeweiligen Körperfettdepots auch die anatomische Lokalisation der jeweiligen Fettgewebedepots diskutiert (Björntorp und Sjöström, 1971; Di Girolamo et al., 1998; Hausman et al., 2001). Beim Menschen korrelieren fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen signifikant mit der Größe der Fettzellen sowie mit der Verteilung des Fettgewebes (Wajchenberg, 2000; Tchoukalova et al., 2008; O'Connell et al., 2010). Die Masse an viszeralem Fettgewebe korreliert im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe stärker mit dem Auftreten von Komorbiditäten der Adipositas und wird daher als „pathogene Fettgewebedepot“ bezeichnet, so dass fettleibige Menschen mit überwiegend viszeraler Fettspeicherung gefährdeter sind, fettleibigkeitsassoziierte Begleit- und Folgeerkrankungen zu entwickeln (Fox et al., 2007). Es gibt Studien, die zudem auf eine pathogenetische Relevanz von hypertrophen abdominal subkutanen und viszeralen Fettzellen hinweisen (Weyer et al., 2000; Skurk et al., 2007; O'Connell et al., 2010).

Untersuchungen zur mittleren Fettzellgröße wurden bei diversen Versuchstier-, Nutztierspezies und beim Menschen durchgeführt, aber bei der Katze liegen bislang keine Untersuchungen zu mittleren Fettzellvolumina verschiedener Fettgewebedepots von übergewichtigen und normalgewichtigen Katzen vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei übergewichtigen und normalgewichtigen Katzen die mittleren Fettzellvolumina unterschiedlicher Körperfettgewebedepots mittels quantitativ stereologischer Analysen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf mögliche diagnostische und prognostische Faktoren für fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen bei der Katze.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Weißes Fettgewebe

1.1. Morphologie des weißen Fettgewebes

Das weiße univakuoläre Fettgewebe wird als Multidepotorgan beschrieben, das entweder als Depot- oder Baufett in kleineren oder größeren Gruppen in Läppchen organisiert im Bindegewebe vorliegt oder in Organen als interstitielles Fett vorkommt (Avram et al., 2005; Junqueira et al., 2005). Weißes Fettgewebe besitzt bei makroskopischer Betrachtung eine weißlich-gelbe Farbe, wobei die Gelbfärbung von unterschiedlicher Intensität und auf die Einlagerung von lipophilen Pigmenten wie beispielsweise Carotinoide zurückzuführen ist (Liebich, 2010). Fettgewebe besteht hauptsächlich aus Adipozyten (Fettzellen), spezialisierten Mesenchymzellen, die, von einer Basalmembran umgeben, eingebettet in einer Matrix aus kollagenen Fasern (Typ-III-Kollagen), von gefäßführendem Bindegewebe umgeben sind (Greenwood und Johnson, 1983; Junqueira et al., 2005; Liebich, 2010). Neben Fettzellen finden sich Fettvorläuferzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen und Leukozyten im weißen Fettgewebe (Greenwood und Johnson, 1983). Blut-, Lymphgefäße und Nerven verlaufen in Bindegewebesepten, die das Fettgewebe in Kompartimente einteilen (Greenwood und Johnson, 1983). Fettgewebe setzt sich zu 60 bis 85 % aus Lipiden, welche zu 90-99% aus Triglyzeriden bestehen, zu 5-30 % aus Wasser und zu 2-3 % aus Proteinen zusammen (Greenwood und Johnson, 1983). In weißem univakuolärem Fettgewebe werden Triglyzeride in Form eines zentralen Lipidtropfens gespeichert. Der Lipidtropfen liegt frei im Zytoplasma und wird nicht von einer Membran umgeben, sondern über Perlipine, spezielle Proteine, stabilisiert (Napolitano, 1963; Cushman, 1970; Greenwood und Johnson, 1983; Junqueira et al., 2005; Yang et al., 2012). Fettzellen besitzen einen einzelnen Zellkern und einen gelegentlich sichtbaren Nukleolus (Cushman, 1970). Das Zytoplasma und der Nukleus univakuolärer Fettzellen werden aufgrund des raumgreifenden gespeicherten Lipidtropfens an die Plasmamembran gedrängt. Dies verleiht dem Adipozyten im histologischen Schnittpräparat sein typisches, als Siegelringform bezeichnetes Aussehen (siehe Abbildung 1). Zytoplasmatische Organellen sind in dem schmalen an den Rand gedrängten Zytoplasmasaum lichtmikroskopisch kaum zu identifizieren. Elektronenmikroskopi-

sche Untersuchungen haben gezeigt, dass neben Zellorganellen einzelne kleine Lipidtropfen im Zytoplasma gespeichert sind (Cushman, 1970).

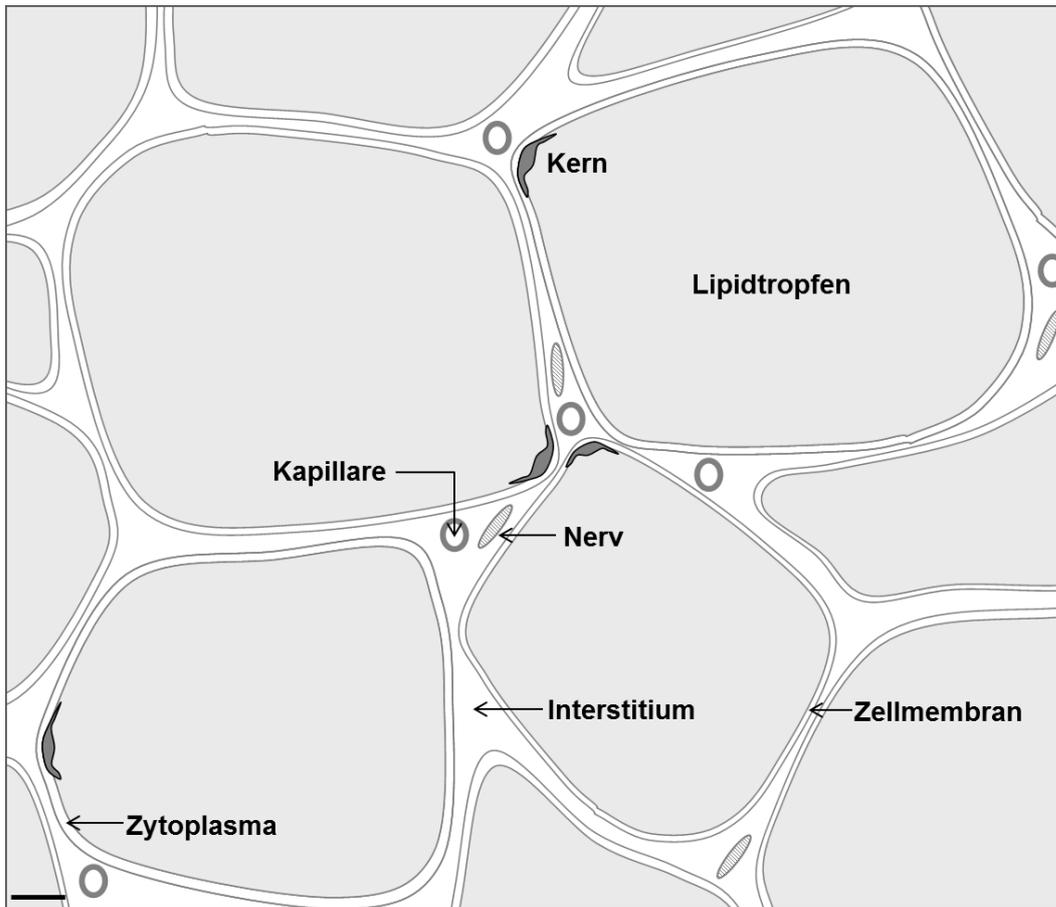


Abbildung 1: Schematische Darstellung der lichtmikroskopischen Struktur von weißem Fettgewebe, Balken $\approx 10 \mu\text{m}$, frei nach (Ellenberger, 1908).

1.2. Gefäßversorgung und Innervation des Fettgewebes

1.2.1. Blutgefäßversorgung

Die Funktion des Fettgewebes ist von dessen Vaskularisation abhängig, d.h. die Fettspeicherung, die Bereitstellung von Lipiden und anderen metabolischen Substraten setzen eine adäquate Gefäßversorgung voraus (Ballard, 1978). Es wird postuliert, dass ein Adipozyt jeweils von einer Kapillare versorgt wird (Greenwood und Johnson, 1983; Hausman et al., 2001; Junqueira et al., 2005). Neben Kapillaren finden sich ebenso kleine und größere Blutgefäße im Fettgewebe (Krölling und Grau, 1960). In den frühen 1970er Jahren bemaß man den Blutfluss in ml/min/100g Fettgewebe. Aufgrund der variierenden Größe von Adipozy-

ten kann hieraus keine Aussage über die Blutversorgung eines einzelnen Adipozyten getroffen werden, weshalb dazu übergegangen wurde, die Maßeinheit in Perfusion (gemessen in picoliter, pl), pro Fettzelle und pro Minute anzugeben (Crandall et al., 1997). Di Girolamo und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen Fettzellzahl bzw. -größe und der Durchblutung des Fettgewebes. Sie konnten zeigen, dass die Durchblutung pro Fettzelle konstant und unabhängig von der Fettzellgröße ist (Di Girolamo et al., 1971 [a]). Sie liegt im subkutanen Gewebe bei Ratten bei ca. 30 pl pro Zelle und Minute (Crandall et al., 1984), beim Menschen liegen die Werte mit 20 bis 30 pl pro Zelle und Minute in einem ähnlichen Bereich (Blaak et al., 1995). Eine hochgradige Zunahme der Fettgewebemasse wie bei Adipositas erhöht den Blutvolumenbedarf des Fettgewebes. Eine Erhöhung der Gesamtblutmenge geht mit weitreichenden hämodynamischen Konsequenzen für den Körper einher (Crandall et al., 1997). Fettgewebe von normalgewichtigen Menschen wird mit etwa 3-7% der Herzauswurfleistung versorgt, bei Fettleibigen kann dieser Wert auf 15-30% des Herzminutenvolumens steigen (Hausman et al., 2001). Der mit der Fettleibigkeit einhergehende Anstieg des Herzminutenvolumens wird als mögliche Ursache für Bluthochdruck, Kardiomegalie und kongestive Herzinsuffizienz diskutiert (Crandall et al., 1986; Hausman et al., 2001). Fettgewebe ist imstande, den Blutfluss zum Teil selbst zu regulieren (Ballard, 1978), denn Adipozyten sezernieren parakrin wirkende Faktoren wie Adenosin und Prostaglandine, welche eine Vasodilatation zur Folge haben, sowie Angiotensin II, welches eine Vasokonstriktion bewirkt (Macqueen et al., 1999).

1.2.2. Lymphgefäßversorgung

Neben der Blutgefäßversorgung wird Fettgewebe von Lymphkapillaren und -gefäßen drainiert (Ryan, 1995). Die zwischen den Fettzellen liegenden Lymphkapillaren sind durch lichtmikroskopische Untersuchung nicht zu identifizieren (Ryan, 1995). Auch in den Bindegewebesepten, die das Fettgewebe in Läppchen unterteilen, sind Lymphgefäße kaum von Venen zu unterscheiden (Ryan, 1995). Im gesamten Körper besteht eine anatomische Beziehung zwischen Lymphgefäßen sowie Lymphknoten und Fettgewebe (Harvey, 2008). Pond und Mattacks zeigten, dass das in unmittelbarer Nachbarschaft zu Lymphknoten liegende Fettgewebe eine höhere Lipolyseaktivität besitzt als das anderer Fettgewebedepots. Hieraus schlussfolgern die Autoren, dass dies der Energiebereitstellung für die immunolo-

gische Abwehrfunktion der Lymphknoten dienen könnte (Pond und Mattacks, 1998).

1.2.3. Innervation

Bereits vor über 100 Jahren gelang der histologische Nachweis von Nerven im Fettgewebe mithilfe der Methylenblau-Färbung (Dogiel, 1898). Der Nachweis der direkten als auch der indirekten Innervation über die Gefäße gelang anschließend durch Versilberung (Hausberger, 1934). Hiermit war jedoch noch nicht die Qualität der nervalen Versorgung des Fettgewebes bestimmt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten Katecholamine im Fettgewebe identifiziert werden (Wirsen, 1964; Falck et al., 1982). Weitere Arbeiten konnten unabhängig voneinander die katecholaminerge Innervation des weißen Fettgewebes, sowohl gefäßassoziiert als auch einzelner Fettzellen selbst (2-3% der Fettzellen im Fettgewebe) (Slavin und Ballard, 1978), bestätigen. Youngstrom und Mitarbeiter gelang mittels fluoreszierender Darstellung (fluorescent tract tracer) sympathischer Nervenbahnen der neuroanatomische Nachweis postganglionärer sympathischer Nerven im Fettgewebe (Youngstrom und Bartness, 1995). Es liegen nur wenige histochemische Untersuchungen zum Nachweis von Acetylcholin-Esterase als Marker zur Identifizierung der parasympathischen Innervation vor, so dass das Fehlen einer parasympathischen Innervation des Fettgewebes von mehreren Autoren postuliert wird (Greenwood und Johnson, 1983; Giordano et al., 2006). Gegensätzliche Aussagen finden sich in Untersuchungen, in denen mittels FluoroGold®, einem transneuronalen retrograden Marker, der das zentrale Nervensystem ausschließlich über präganglionäre parasympathische Motoneurone erreicht, vagale Motoneurone dargestellt werden konnten. Zudem wurden mittels sympathischer Denervation und gleichzeitigem Infektionsversuch mit Pseudorabies Virus, als retrograder transneuronaler Marker, die Effekte der vagalen Innervation untersucht (Kreier et al., 2002). Bei sympathischer Denervation wurde ein anaboler Effekt sowie eine erhöhte Glukoseaufnahme in die Fettzellen vermerkt, Effekte, die dem vagalen System zugeschrieben werden (Kreier et al., 2002). Weiterhin unklar aber bleibt, welcher parasympathische Transmitter hierbei wirkt, da bisher noch kein parasympathischer Transmitter im Fettgewebe identifiziert wurde (Kreier et al., 2002). Zusammenfassend postulieren Kreier und Buijs, dass das Fettgewebe ebenso wie alle anderen Organe sowohl sympathisch als auch parasympathisch innerviert wird (Kreier und Buijs, 2007). Die divergierenden Ergebnisse von Giordano und

Mitarbeiter (2006) sowie Kreier und Mitarbeiter (2002) wurden in einer Arbeit von Berthoud und Mitarbeiter (2006) kritisch betrachtet. In dieser Arbeit sind Ursachen für mögliche falsch positive Ergebnisse und methodische Probleme aufgeführt. Um zukünftig eine mögliche vagale Innervation zu verifizieren, werden unter anderem anterograde Markierungen vagaler Nervenfasern empfohlen (Berthoud et al., 2006).

1.3. Verteilung des weißen Fettgewebes im Körper

Das weiße Fettgewebe wird auch als Multidepot-Organ bezeichnet, da es sich aus mehreren Fettgewebedepots im Körper zusammensetzt (Cinti, 2005). Das Vorkommen und die Verteilung von weißem Fettgewebe im Körper werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Fettgewebe dient in Form von **Depotfett** beispielsweise als Substratspeicher und als Wärmeschutz. In anderen Lokalisationen nimmt es Platzhalterfunktion ein oder bietet mechanischen Schutz für Organe und wird dann als **Struktur-** oder **Baufett** bezeichnet (Krölling und Grau, 1960; Greenwood und Johnson, 1983; Junqueira et al., 2005). Typischer Vertreter des Baufettes ist das Orbitalfett (Krölling und Grau, 1960). Der retrobulbäre Fettkörper bettet innerhalb der Orbita Faszien, Muskeln, Gefäße, Nerven des Auges und den Sehnerv ein und dient der Stabilisierung des Bulbus (Nickel et al., 2004; Junqueira et al., 2005; Liebich, 2010). Weitere Vertreter der Struktur- bzw. Baufette sind das gelbe Knochenmark, das Herzkranzfett, das Nierenhilusfett sowie das Ballenfett (Krölling und Grau, 1960). Die Verteilung des Fettgewebes dient aber auch der sexuellen und sozialen Signalgebung zwischen den Individuen (Greenwood und Johnson, 1983). In der Schädelhöhle, in den Augenlidern, dem Skrotum, der Haut des Penis und der Klitoris fehlt das Fettgewebe gänzlich (Ellenberger, 1908). Das abdominale Fettgewebe wird in subkutane und viszerale bzw. intraabdominale Fettgewebedepots unterteilt (Wajchenberg, 2000; Cinti, 2005; Lee et al., 2010). Bei abdominalem subkutanem Fettgewebe handelt es sich um ein Depotfett, das neben dem Wärmeschutz, bei gut genährten Haustieren in erster Linie der Substratspeicherung dient (Ellenberger, 1908). Das Fettgewebe ist in dieser Lokalisation deutlich durch Scheidewände aus Bindegewebe in Läppchen unterteilt, die zugleich eine Verbindung mit der Umgebung herstellen (Patzelt, 1948). Cinti gliedert das intraabdominale Fettgewebe zudem in retro- und intraperitoneale Anteile (Cinti, 2005). Intraperitoneale Fettgewebedepots umfassen das omentale, das mesenteriale und das parametrale bei weiblichen und epi-

didymale Fettgewebe bei männlichen Tieren, die beiden letztgenannten sind bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich stark ausgebildet (Greenwood und Johnson, 1983).

Das Omentum ist eine hauchdünne Serosadoppellamelle mit netzartigem Aussehen, in der zahlreiche Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven, eingebettet in Fettgewebe, strangartig entlang der bindegewebigen Grundlamelle ziehen (Nickel et al., 2004). Neben der Funktion als Vergrößerung der Bauchfellfläche und der Fähigkeit Defekte zu schließen, dient das Omentum umfangreicher Fetteinlagerung, die einerseits als Wärmeschutz, andererseits im Form von Anhängseln zwischen den Bauchorganen als Füllmaterial sowie als Depotfett fungiert (Nickel et al., 2004; Junqueira et al., 2005).

Das Mesenterium commune, das gemeinsame Darmgekröse, zieht als Bauchfelldoppelplatte vom Pylorus bis hin zur Beckenhöhle und wird entsprechend der begleitenden Darmabschnitte Mesoduodenum, Mesojejenum, Mesoileum, Mesozäkum, Mesokolon und Mesorektum bezeichnet. Ähnlich wie im Omentum wird auch hier in einzelnen Gekröseabschnitten entlang der Blut- und Lymphgefäßbahnen Fettgewebe eingelagert. Die zwischen den Gefäßen fächerförmig aufgespannte Serosadoppellamelle ist in der Regel weitestgehend frei von Fetteinlagerungen (Nickel et al., 2004; Junqueira et al., 2005).

Beim Hund und bei der Katze liegt im Inneren der Bauchhöhle in der Regio abdominalis im Ligamentum falciforme zudem der von Peritoneum bedeckte umbilikale Fettkörper (Nickel et al., 2004). Dieser kann bei übergewichtigen Tieren außerordentlich an Größe zunehmen (Liebich, 2010). Er dient insbesondere bei der Katze als Fettspeicher.

Retroperitoneal liegt das retroperitoneale Fettlager. Dieses umgibt die Nieren, ist gegenüber seiner Umgebung gut abgegrenzt, und wird auch als Fettkapsel oder Nierenfett bezeichnet. Es dient zum einen dem Schutz und der Fixation der Nieren (Baufettgewebe), zum anderen dient es als Speicherfettgewebe (Nickel et al., 2004; Junqueira et al., 2005).

1.3.1. Fettgewebeverteilung beim Menschen

Beim Menschen unterscheidet man zwei Fettgewebeverteilungstypen, den subku-

tanen bzw. gynoiden bzw. gluteofemorale und den abdominalen bzw. viszeralen bzw. androiden Typ, wobei Männer und Frauen durchaus das eine oder das andere Fettgewebeverteilungsmuster aufweisen können (Tchoukalova et al., 2008). Die Fettgewebeverteilung beim Menschen ist aber nicht nur durch das Geschlecht beeinflusst, sondern auch altersabhängig. So nimmt das viszerale Abdominalfett mit dem Alter bei beiden Geschlechtern zu (Bouchard et al., 1993).

1.3.2. Fettgewebeverteilung bei Katzen

Ähnlich wie beim Menschen kommt es auch bei fettleibigen Katzen hauptsächlich in der Regio abdominalis zur Fettgewebeakkumulation (Hoenig et al., 2007). Hoenig und Mitarbeiter untersuchten 12 adulte normalgewichtige und 16 adulte fettleibige kastrierte Katzen beiderlei Geschlechts (Hoenig et al., 2007). Magnetresonanztomographische Untersuchungen ergaben, dass sowohl bei fettleibigen als auch bei normalgewichtigen Katzen kein Unterschied in der abdominal subkutanen und der intraabdominalen bzw. viszeralen Fettverteilung in Bezug auf das gesamte abdominale Fettgewebe festzustellen war. Geschlechtsspezifische oder altersassoziierte Unterschiede in der Fettgewebeverteilung wurden anders als beim Menschen nicht festgestellt (Hoenig et al., 2007). Lee und Mitarbeiter untersuchten insgesamt 19 klinisch gesunde adulte Katzen beiderlei Geschlechts unterschiedlicher Rassen mittels Computertomografie auf die Verteilung des abdominalen Fettgewebes in viszerale und subkutane Anteile. Alle Katzen lagen nach Anwendung einer 9-Punkte Body Condition Skala zur Bestimmung des Ernährungsgrades bei einem Body Condition Score von 4 bis 7. Die Messungen ergaben, dass Tiere mit einem BCS von 4 und 5 durchschnittlich einen höheren Anteil viszeralen Fettgewebes am gesamten abdominalen Fettgewebe aufwiesen als Tiere mit einem BCS von 6 und 7. Bei den Tieren mit einem BCS > 5 verschob sich der Anteil des viszeralen und subkutanen Fettgewebes am abdominalen Gesamtfettgewebenvolumen zugunsten des subkutanen Fettgewebes (Lee et al., 2010). In dieser Arbeit bestand keine hohe Korrelation zwischen dem Body Condition Score und dem mittels Computertomographie ermittelten abdominalen Fettgewebeanteil am Gesamtgewebe, weshalb die Autoren folgerten, dass die Bestimmung des BCS keine verlässliche Aussage über die Menge der Fettgewebemasse zulässt (Lee et al., 2010).

1.4. Aufgaben des weißen Fettgewebes

Fettgewebe dient, in Abhängigkeit von seiner Lokalisation, der thermischen Isolierung, der Wasserbindung, dem mechanischen Schutz, als Platzhalter sowie der Substratspeicherung (Krölling und Grau, 1960; Greenwood und Johnson, 1983; Junqueira et al., 2005). Fett stellt einen äußerst effizienten Energiespeicher dar (Fain und Garcija-Sainz, 1983; Dodson et al., 2011), denn die gespeicherten Triglyzeride haben einen höheren Brennwert und eine geringere Dichte als beispielsweise Glykogen (Wajchenberg, 2000). Der Auf- und Abbau der Triglyzeride unterliegt sowohl hormoneller als auch neuraler Steuerung (Hellmer et al., 1992; Hausman et al., 2001). Steigende Insulin-, Glukose- und Fettwerte im Blut stimulieren die Triglyzeridspeicherung. Im Gegensatz dazu führen sinkende Insulinwerte während Fastenzeiten zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems und damit zur Lipolyse und zu einer Erhöhung von Glukagon- und Glukokortikoidwerten (Wajchenberg, 2000). Das Freisetzen von freien Fettsäuren und Glycerol wird vorrangig durch das sympathische Nervensystem gesteuert (Bartness und Song, 2007). Hierbei haben β_1 - und β_2 -Rezeptoren lipolytische Effekte, α_2 -Adrenorezeptoren inhibieren die Lipolyse (Lafontan und Berlan, 1995; Carpenne et al., 1998). Das viszerale Fettgewebe besitzt eine höhere lipolytische Aktivität als das subkutane Fettgewebe, was auf eine höhere Dichte an β_1 - und β_2 -Rezeptoren in dieser Lokalisation zurückgeführt wird (Hellmer et al., 1992). Zudem reagieren viszerale Adipozyten weniger sensitiv auf die antilipolytische Wirkung von Insulin und haben eine geringere Dichte an α_2 -Adrenorezeptoren (Arner et al., 1990; Hellmer et al., 1992; Wajchenberg, 2000).

Viele Autoren sind sich darin einig, Fettgewebe in seiner Gesamtheit als endokrines Organ zu bezeichnen (Kershaw und Flier, 2004; O'Connell et al., 2010; Zoran, 2010). Fettgewebe sezerniert Hormone und Mediatoren, die unter dem Begriff Adipokine zusammengefasst werden, und die systemisch sowie auto- und parakrin wirken (Scherer, 2006). Bislang sind mehr als 50 Adipokine bekannt. Hierzu gehören Stoffe wie Leptin, Adiponektin, TNF- α , Komplementfaktoren, Plasminogen Activator Inhibitor-1, Proteine des Renin-Angiotensin-Systems und Resistin (Trayhurn und Beattie, 2001; Trayhurn, 2005; Gandhi et al., 2010). Adipokine werden in proinflammatorische Adipokine wie IL-6, IL-8, TNF- α und Leptin sowie in antiinflammatorische Adipokine wie IL-10 und Adiponektin unterschieden (Esposito et al., 2003; Skurk et al., 2007). Adipokine werden von Adipozyten oder

von den Endothelzellen des Fettgewebes sezerniert. Adipokine sind an der Regulation des Energiehaushalts, des Glukose- und Fettstoffwechsel, an Entzündungsprozessen sowie an der Fettgewebeproliferation beteiligt (Hausman et al., 2001; Kershaw und Flier, 2004; Skurk et al., 2007; Schäffler und Scholmerich, 2010). Sie beeinflussen metabolische, thrombembolische und kardiovaskuläre Ereignisse und werden z.T. für die Komplikationen der Adipositas mit verantwortlich gemacht (Scherer, 2006). Des Weiteren ist Fettgewebe ein Ort für den Metabolismus von Sexualsteroiden und Glukokortikoiden (Kershaw und Flier, 2004).

2. Reaktionsformen des Fettgewebes auf ein länger anhaltendes Nährstoffüberangebot

Die Fettgewebemasse wird bestimmt durch die Anzahl und die Größe der Fettzellen. Eine positive Energiebalance über einen längeren Zeitraum geht entweder mit einem hypertrophen und/oder einem hyperplastischen Wachstum des Fettgewebes einher (Björntorp und Sjöström, 1971; Hausman et al., 2001; Arner et al., 2010).

2.1. Adipozytäre Hypertrophie

Unter Hypertrophie des Fettgewebes versteht man die Größenzunahme der Fettgewebemasse durch Vergrößerung der vorhandenen Fettzellen infolge einer intrazellulären Akkumulation von Lipiden bei länger bestehender positiver Energiebilanz (Hausman et al., 2001).

2.2. Adipozytäre Hyperplasie

Die Hyperplasie des Fettgewebes wird als Zunahme der Fettgewebemasse durch Vermehrung der Fettzellen bei gleichbleibender Zellgröße definiert (Hausman et al., 2001). Diesem Prozess geht die Adipogenese voraus, d.h. Stammzellen proliferieren und entwickeln sich zu Präadipozyten, welche sich anschließend zu reifen Fettzellen differenzieren (Gregoire, 2001; Hausman et al., 2001). Die Differenzierung von Fettzellvorläuferzellen zu reifen Fettzellen geht mit morphologischen Veränderungen von fibroblastenähnlichen Präadipozyten einher, die sich zu charakteristischen univakuolären Fettzellen entwickeln (Björntorp und Sjöström, 1971).

Untersuchungen zur Proliferation und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen über Fettzellvorläuferzellen (Präadipozyten) zu reifen Fettzellen

fanden zum einen anhand von Präadipozyten-Zelllinien, zum anderen anhand von Primärkulturen endothelialer Vorläuferzellen statt. Die Rekrutierung reifer Adipozyten erfolgt nicht ausschließlich über die Teilungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen, sondern auch über die der Präadipozyten und über deren Ausdifferenzierung (Greenwood und Johnson, 1983; Prins und O'Rahilly, 1997; Kras et al., 1999; Junqueira et al., 2005). Aufgrund einzelner Untersuchungsergebnisse wird kontrovers diskutiert, ob nicht sogar reife Fettzellen ihre Teilungsfähigkeit beibehalten (Greenwood und Johnson, 1983; Hausman et al., 2001). Die Mehrheit der Wissenschaftler unterstützt diese Theorie jedoch nicht, da ausdifferenzierten Fettzellen keine Teilungsfähigkeit zugesprochen wird (Lavau et al., 1977; Samuelson, 2007).

Weiterhin unklar sind die ersten Schritte der Fettzelldifferenzierung von einer postulierten mesenchymalen Stammzelle ausgehend bis hin zu einem Präadipozyten. Hingegen ist die Ausdifferenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten bereits gut erforscht. Am Ende des Differenzierungsprozesses steht unter anderem die Expression fettzellspezifischer Gene, die die notwendige Insulinsensitivität der Zelle und die Synthese spezifischer autokriner, parakriner und hormonell wirksamer Faktoren ermöglichen (Valet et al., 2002).

2.3. Einflussfaktoren auf die Wachstumsform von Fettgewebe

Bei länger bestehender positiver Energiebilanz geht die Fettgewebezunahme sowohl mit adipozytärer Hypertrophie als auch Hyperplasie einher (Hausman et al., 2001). Spezies, Alter, Ernährungsweise, endokrine und parakrine Faktoren, Innervation und anatomische Lokalisation des Fettgewebedepots werden im Rahmen einer Fettgewebezunahme eine maßgebliche Bedeutung beigemessen (Vizzotto et al., 1984; Prins und O'Rahilly, 1997; Hausman et al., 2001).

Umfangreiche Untersuchungen zur Wachstumsform von Fettgewebe fanden am epididymalen Fettgewebe verschiedener Versuchstierspezies statt. Bei Meerschweinchen wurde gezeigt, dass epididymal eine vorwiegend hyperplastische Wachstumsform vorherrscht, wohingegen Ratten und Hamster in dieser Lokalisation ein überwiegend hypertrophes Wachstum aufweisen (Di Girolamo und Mendlinger, 1971 [b]).

Untersuchungen zur Altersabhängigkeit zeigen, dass das epididymale Fettgewebe

bei Ratten ab dem Zeitpunkt der Geburt bis zur vierten Woche post partum von hyperplastischer Natur ist. Anschließend kommen beide Formen des Wachstums nebeneinander vor, um dann in ein überwiegend hypertrophes Wachstum des Fettgewebes überzugehen (Greenwood und Johnson, 1983).

Lavau und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss fettreicher und fettarmer Diäten hinsichtlich Fettzellzahl und mittlerer Fettzelldurchmesser auf epididymales Fettgewebe von 1 Monat alten Ratten, wobei ein Teil der Ratten die Diät 1 Monat, der andere Teil die Diät 10 Monate lang erhielt. Die Ergebnisse zeigten, dass die einmonatige Fütterung einer fettreichen Diät eine Zunahme der Fettzelldurchmesser bewirkte, die Fettzellzahl hingegen unverändert blieb. Tiere, die eine fettreiche Fütterung über einen Zeitraum von 10 Monaten erhielten, wiesen im Vergleich zu den Tieren, die eine fettarme Diät über den gleichen Zeitraum erhielten, sowohl eine Zunahme der Fettzellgröße als auch Fettzellzahl auf (Lavau et al., 1977). Die Autoren weisen darauf hin, dass ursächlich für die erhöhte Fettzellzahl ein hyperplastisches Wachstum der Fettzellen infrage kommt. Sie schließen jedoch nicht aus, dass auch kleine, lichtmikroskopisch nicht eindeutig erkennbare Fettzellen so an Größe zugenommen haben könnten, dass sie bei den Messungen mitgezählt wurden und sich somit die Zahl insgesamt erhöht hat (Lavau et al., 1977).

Dem Einfluss endokriner und parakriner Mediatoren wird ebenfalls eine Bedeutung für die Wachstumsform von Fettgewebe zugesprochen. Insbesondere Glukokortikoiden und Insulin-like growth factor I werden hinsichtlich der Ausreifung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen diskutiert (Björntorp, 1991; Hausman et al., 2001; Peckett et al., 2011).

Untersuchungen der neuronalen Einflüsse auf die Fettgewebezunahme zeigen, dass die sympathische Innervation einerseits lipolytische Wirkung erzielt, andererseits die adipozytäre Hyperplasie hemmt (Youngstrom und Bartness, 1998; Hausman et al., 2001), denn die Denervation inguinalen Fettgewebes beim Hamster sowie retroperitonealen Fettgewebes bei der Ratte gehen mit einem hyperplastischen Wachstum des Fettgewebes in der jeweiligen Lokalisation einher (Cousin et al., 1993; Youngstrom und Bartness, 1998).

Di Girolamo und Mitarbeiter untersuchten depotspezifische Unterschiede in der Wachstumsform von Fettgewebe. Sie bestimmten Fettzellzahl und mittlere Fett-

zelldurchmesser des inguinalen, retroperitonealen, mesenterialen und epididymalen Fettgewebes von heranwachsenden männlichen Ratten bei ad libitum Fütterung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass inguinale und retroperitoneale Fettgewebe die größte Kapazität zur zellulären Hyperplasie besitzt, wohingegen mesenteriales diesbezüglich die geringste Kapazität aufweist. Mesenteriales und epididymales Fettgewebe reagieren in erster Linie mit Hypertrophie auf ein Nährstoffüberangebot (Di Girolamo et al., 1998).

Manche Autoren nehmen an, dass für Fettzellen, abhängig vom jeweiligen Fettgewebedepot und dem Fettleibigkeitsstatus, eine kritische maximale Fettzellgröße existiert (Lemonnier, 1972; Faust et al., 1978; Greenwood und Johnson, 1983; Hausman et al., 2001). Wird diese erreicht, besteht eine lebenslange Fähigkeit des Organismus mit einer Fettzellzahlerhöhung, also Hyperplasie, zu reagieren (Greenwood und Johnson, 1983). Hausman und Mitarbeiter postulierten, dass die Zunahme der Fettgewebemasse eines Fettgewebedepots in Abhängigkeit von der bestehenden Zellgröße entweder überwiegend mit adipozytärer Hypertrophie oder Hyperplasie reagiert (Hausman et al., 2001). Reyne und Mitarbeiter bestimmten Fettzelldurchmesser an Zellen in Suspension von Kaninchen aus dem dorsoskapulären und perirenal Fettgewebe. Sie untersuchten die Fettzelldurchmesser vom Zeitpunkt der Geburt bis zum elften Lebensmonat der Tiere. Ihre Messungen ergaben, dass die Fettzelldurchmesser mit Zunahme der Fettgewebemasse zunächst anstiegen und anschließend ein Abfall der Fettzelldurchmesserkurve zu vermerken war. Der Abfall der gemessenen Werte trat im perirenal früher als im dorsoskapulären Fettgewebedepot auf. Die Autoren interpretieren diesen Abfall als Rekrutierung neuer Fettzellen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse sehen die Autoren die Theorie einer vom jeweiligen Fettgewebedepot abhängigen kritischen Fettzellgröße als bestätigt an (Reyne et al., 1985).

3. Methoden zur Untersuchung von Fettzellgrößen

In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung der Anzahl und Größe von Fettzellen unterschiedlicher Fettgewebedepots angewandt. Diese Untersuchungen unterschieden sich sowohl hinsichtlich der methodischen Ansätze zur Bestimmung der Fettzellzahl und Fettzellgröße als auch in Bezug auf Probennahme, weitere Probenaufbereitung, Verarbeitung und Färbung der Fettgewebeproben.

Fettgewebeproben wurden zum einen mittels Feinnadelbiopsie (Hirsch und Gallian, 1968; Tchoukalova et al., 2003; Tchoukalova et al., 2008; Arner et al., 2010), zum anderen chirurgisch intra operationem (Lavau et al., 1977; Vizzotto et al., 1984; Tchoukalova et al., 2003; Skurk et al., 2007; Tchoukalova et al., 2008; O'Connell et al., 2010) oder aber post mortem (Goldrick, 1967; Di Girolamo et al., 1971 [c]; Lavau et al., 1977) gewonnen.

Fettgewebe wurde entweder als Zellsuspension (Hirsch und Gallian, 1968; Lavau et al., 1977) oder in Form histologischer Schnitte aufbereitet. Histologische Schnitte wurden als Gefrierschnitte (Sjöström et al., 1971) oder nach Einbettung (Vizzotto et al., 1984; O'Connell et al., 2010) angefertigt.

Hirsch und Gallian untersuchten zwei Methoden, die der Glutaraldehyd-fixierten Zellen und die der Osmium-fixierten Zellen, zur Herstellung einer Fettzellsuspension. Die Methode zur Gewinnung Glutaraldehyd-fixierter Zellen bestand darin, die Fettgewebeprobe zunächst einem Kollagenaseverdau zu unterziehen und anschließend mittels Glutaraldehyd zu fixieren. Zur Gewinnung der freien fixierten Zellen, wurde das Gemisch erst durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 250 μm gesiebt und das Filtrat im Anschluss daran durch ein Filternetz mit einer Porengröße von 25 μm gesiebt. Die am Filternetz hängengebliebenen Zellen, wurden daraufhin mit kalter isotoner Lösung abgewaschen und aufgefangen. Die zweite Methode zur Gewinnung der Osmium-fixierten Fettzellsuspension bestand darin, das Fettgewebe mit Osmiumtetroxid zu fixieren, manuell zu zerreiben, zu sieben und anschließend zu filtern, um die so isolierten Zellen aufzufangen (Hirsch und Gallian, 1968). Eine weitere Methode zur Gewinnung einer Fettzellsuspension wurde von Di Girolamo und Mitarbeitern sowie Tchoukalova und Mitarbeitern beschrieben. Auch hier wurde das Fettgewebe einem Kollagenaseverdau unterzogen. Die daraus entstandene Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert und der die Fettzellen enthaltende Überstand gewonnen und anschließend mit Methylenblau gefärbt (Di Girolamo et al., 1971 [c]; Tchoukalova et al., 2003).

Zur Ermittlung der Fettzellvolumina wurden überwiegend Fettzelldurchmesser bestimmt. In Schnittpräparaten wurden die maximalen Fettzelldurchmesser von Fettzellanschnittprofilen mittels direkter Mikroskopie (Skurk et al., 2007) oder

nach Fotografie histologischer Schnittpräparate gemessen (Bianchi, 1989; O'Connell et al., 2010). Fettzellen in Suspension wurden mittels einer Mikroskopkamera fotografiert und anschließend ihre Durchmesser manuell oder automatisiert bestimmt (Hirsch und Gallian, 1968; Di Girolamo et al., 1971 [c]; Tchoukalova et al., 2003; O'Connell et al., 2010). Aus den ermittelten Werten wurde unter der Annahme, dass es sich bei den Fettzellen um sphärische Partikel handelt, das Volumen der Fettzellen berechnet (Goldrick, 1967; Di Girolamo et al., 1971 [c]). Eine andere Möglichkeit zur Ermittlung der Fettzellgröße bestand im Einsatz eines Coulter Counters® (Hirsch und Gallian, 1968). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Widerstandsmessung zur Ermittlung von Teilchenzahlen und -größen in einer Suspension. Die Zellsuspension strömt im elektrischen Feld durch eine kleine Kapillaröffnung, so dass die durchfließenden Fettzellen beim Durchtritt durch die Kapillare als verringertes Stromsignal detektiert werden. Das Signal korreliert mit der Größe der Fettzellen (Hirsch und Gallian, 1968). Eine weitere Möglichkeit Fettzellgrößen anzugeben, besteht darin, sie als μg Fett pro Fettzelle auszudrücken. Die Fettzellzahl wurde mittels Coulter Counter® und der Lipidgehalt, nach vorheriger Lipidextraktion mittels Chloroform und Methanol, gravimetrisch bestimmt und hieraus der Lipidgehalt pro Fettzelle errechnet (Lavau et al., 1977). Di Girolamo und Mitarbeiter bestimmten den mittleren Fettzelllipidgehalt in Picoliter. Nach Errechnung des Fettzellvolumens aus der Ermittlung der Fettzelldurchmesser in einer Zellsuspension, wurde das Fett aus der entnommenen Fettgewebeprobe mit Chloroform und Methanol extrahiert und anschließend die Lipiddichte ermittelt. Die Multiplikation des errechneten mittleren Fettzellvolumens mit der Lipiddichte ergab den mittleren Fettzelllipidgehalt (Di Girolamo et al., 1971 [a]).

Vizzotto und Mitarbeiter bestimmten die Fettzellvolumina in Paraffinschnitten indem sie die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe sowie die Anzahl der Fettzellen pro Volumen Fettgewebe ermittelten (Vizzotto et al., 1984).

4. Morphometrische Untersuchungen von Fettzellen

Fettzellgrößen werden in der Literatur meist als Durchmesser von Fettzellanschnittprofilen angegeben. Ohne Angabe zu der Spezies oder der Lokalisation der untersuchten Fettzellen werden Fettzellanschnittprofildurchmesser meistens in einem Größenbereich von 25 bis 100 μm angegeben (Patzelt, 1948; Krölling und

Grau, 1960; Hausman et al., 2001; Junqueira et al., 2005; Liebich, 2010). Morphometrische Untersuchungen von Fettzellen zur Ermittlung der Fettzellvolumina diverser Lokalisationen und Untersuchungen zur Ermittlung geeigneter Messmethoden fanden bisher an diversen Tierarten wie Mäusen (Hirsch und Gallian, 1968), Ratten (Goldrick, 1967; Hirsch und Gallian, 1968; Di Girolamo et al., 1971 [a]; Di Girolamo et al., 1971 [c]; Lavau et al., 1977; Di Girolamo et al., 1998), Goldhamstern (Di Girolamo et al., 1971 [c]), Kaninchen (Reyne et al., 1985), Schweinen (Lee et al., 1973), Rindern (Hood und Allen, 1973), Pferden (Bianchi, 1989), Meerschweinchen (Di Girolamo et al., 1971 [c]), Hunden (Di Girolamo et al., 1971 [c]), Katzen (Occhipinti, 1936) und beim Menschen (Sjöström et al., 1971; Vizzotto et al., 1984; O'Connell et al., 2010) statt.

Im Folgenden werden beispielhaft morphometrische Untersuchungen von Fettzellen verschiedener Spezies in Hinblick auf depotspezifische Unterschiede vorgestellt.

Occhipinti bestimmte die Durchmesser von Fettzellanschnittprofilen an histologischen Schnitten aus dem subkutanen, perirenal, epikardialen und orbitalen Fettgewebe bei Mensch, Hund, Katze, Meerschweinchen, Ratte und Rind. Seine Ergebnisse zeigen, dass bei allen Vertebraten die subkutanen Fettzellen die größten Durchmesser im Vergleich zu den perirenal, epikardialen und orbitalen Fettzellen haben, während die orbitalen Fettzellen die kleinsten Durchmesser aufweisen (Occhipinti, 1936). Lee und Mitarbeiter untersuchten im Rahmen einer Ernährungsstudie die Auswirkung eines Futterregimes auf die Fettgewebeentwicklung. Hierfür untersuchte die Arbeitsgruppe Osmiumtetroxid-fixierte Fettzellen mittels Coulter Counter® nach der von Hirsch und Gallian (1968) beschriebenen Methode (siehe II.3) aus dem subkutanen, omentalen und intramuskulären Fettgewebepot und stellten fest, dass die subkutanen Fettzellen von Schweinen der Rasse Poland-China und Duroc größere Volumina als die omentalen und diese wiederum größere als die intramuskulären Fettzellen aufwiesen (Lee et al., 1973). Hood und Mitarbeiter untersuchten mit der gleichen Methode Fettzellen subkutanen und perirenal Fettgewebes von Hereford X Angus und Holstein Stieren verschiedener Altersgruppen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Fettzellvolumina beider Rassen perirenal größer waren als die subkutanen. Die Milchrasse Holstein wies im Vergleich zur Fleischrassekreuzung (Hereford X Angus) zudem signifi-

kant kleinere subkutane und perirenale Fettzellvolumina auf (Hood und Allen, 1973). In der Arbeit von Bianchi wurden Fettzellen sechzehn verschiedener Lokalisationen von Pferden intra- und interindividuell verglichen. Es wurden zum einen die Durchmesser der Fettzellanschnittprofile an Paraffinschnitten sowie die Durchmesser von Zellen einer eingedeckten Zellsuspension nach Kollagenaseverdau bestimmt. Die Untersuchungen ergaben, dass die subseröse ventrale Bauchregion die größten Fettzellen aufwies und orbital die kleinsten Fettzellen lagen (Bianchi, 1989).

5. Adipositas

Fettleibigkeit, Adipositas und Obesitas sind synonyme Begriffe und werden als Akkumulation einer übermäßigen Menge an Fettgewebe im Körper definiert (Burkholder und Bauer, 1998). Übergewicht und Fettleibigkeit werden zum einen als prozentuale Überschreitung des idealen Körpergewichts, zum anderen anhand des Body Condition Scores definiert. In der Literatur werden Katzen ab 20% über dem Idealgewicht als übergewichtig definiert (Zoran, 2009). Bei der Verwendung eines Body Condition Scores zur Ermittlung des Ernährungsgrades, entspricht, abhängig von der verwendeten Skala, ein Body Condition Score von 3 (5-Punkte Skala) bzw. von 5 (9-Punkte Skala) Punkten dem Idealgewicht.

Katzen in westlichen Haushalten sind zunehmend übergewichtig (das entspricht 4 Punkten auf einer 5-Punkte Skala bzw. 6-7 Punkten auf einer 9-Punkte Skala) bis fettleibig (das entspricht 5 Punkten auf einer 5-Punkte Skala bzw. > 8 Punkten auf einer 9-Punkte-Skala) (Lund et al., 2005; Colliard et al., 2009). Aus den Vereinigten Staaten haben Studien zur Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit bei Katzen Werte bis zu 35% der Katzenpopulation privater Haushalte ergeben (Lund et al., 2005). Eine Studie zur Prävalenz der felines Adipositas in Frankreich zeigt, dass ca. 27% der Hauskatzen übergewichtig sind (Colliard et al., 2009). Die Entwicklung von Fettleibigkeit bei Hauskatzen hängt von Faktoren ab wie Geschlecht, Kastration, Alter, genetische Prädisposition, hormonelle Störungen, Haltungsform (Ein- oder Mehrkatzenhaushalt, Hund mit im Haushalt), Freigang und Aktivitätsgrad, Diät bzw. Fütterung, der Einstellung der Besitzer sowie ihrer Einschätzung des Ernährungsgrades der eigenen Katze (German, 2006).

6. Methoden zur Bestimmung des Ernährungsgrades bei Katzen

Eine ausführliche Darstellung der Methoden zur Bestimmung des Ernährungsgrades bei Katzen findet sich bei German (2006). Die wichtigsten Verfahren sind die wiederholte Gewichtsbestimmung, der Body Condition Score, der Body Mass Index, die Computertomografie (CT) und die Magnetresonanztomografie (MRT). Die serielle Gewichtsbestimmung dient vor allem der primären Einschätzung des Ernährungsgrades sowie dem Monitoring einer Diät (Hoenig et al., 2007; Lee et al., 2010). Mittels Body Condition Score wird der Ernährungsgrad sowohl adspektorisch als auch palpatorisch bestimmt. Dies geschieht anhand einer 5-Punkte- (3 Punkte entsprechen dem Idealgewicht) oder 9-Punkte-Skala (5 Punkte entsprechen dem Idealgewicht), wobei der Unterschied darin besteht, dass die 9-Punkte-Skala Zwischenstadien beinhaltet (Zoran, 2009) (siehe III.2.2 und Abbildung 2). Der Body Condition Score erlaubt keine Unterscheidung zwischen Fettgewebezunahme bei gleichzeitigem Verlust an Muskelmasse und ausschließlicher Fettgewebezunahme (Zoran, 2009). Hierbei handelt es sich zudem um eine Methode, die erst mit zunehmender Erfahrung durch regelmäßige Anwendung reproduzierbare Werte liefert (Zoran, 2009).

BODY CONDITION SYSTEM

ZU DÜNN	1	Rippen bei Kurzhaarkatzen sichtbar, keine tastbaren Fettpolster, große Magengrube, Lendenwirbel und Darmbeinflügel tastbar.	
	2	Rippen bei Kurzhaarkatzen leicht erkennbar, Lendenwirbel gut erkennbar bei minimaler Muskelmasse, ausgeprägte Magengrube, kein tastbares Körperfett.	
	3	Rippen unter einer minimalen Fettschicht leicht tastbar, Lendenwirbel gut ausgeprägt, Taille unter den Rippen markiert, minimales Fettpolster auf dem Bauch.	
	4	Rippen unter einer minimalen Fettschicht tastbar, Taille unter den Rippen leicht markiert, leichte Magengrube, keine Fettschicht auf dem Bauch.	
IDEAL	5	Gut proportioniert, Taille hinter den Rippen sichtbar, Rippen unter einer leichten Fettschicht tastbar, minimales Fettpolster auf dem Bauch.	
ZU DICK	6	Rippen unter einer etwas zu dicken Fettschicht tastbar, Taille und Fettschicht auf dem Bauch erkennbar, keine Magengrube.	
	7	Rippen unter einer mäßigen Fettschicht nicht so leicht tastbar, Taille kaum sichtbar, ausgeprägte Rundung des Bauchs, mäßige Fettschicht auf dem Bauch.	
	8	Rippen unter einer zu dicken Fettschicht nicht tastbar. Keine Taille erkennbar, ausgeprägte Rundung des Bauchs mit erheblicher Fettschicht, Fettpolster im Lendenbereich.	
	9	Rippen unter dicker Fettschicht nicht mehr tastbar, schwere Fettdepots im Lendenwirbelbereich, im Gesicht und an den Gliedmaßen, Aufblähung des Unterleibs, keine Hüfte, ausgedehnte Fettdepots am Unterlaib.	

Das Body Condition System wurde am Nestlé Purina Center entwickelt und als Dokument in folgenden Publikationen validiert:

- Laflamme DP. Development and Validation of a Body Condition Score System for Cats: A Clinical Tool. *Feline Practice* 1997; 25:13-17
- Laflamme DP, Hume E, Harrison J. Evaluation of Zoometric Measures as an Assessment of Body Composition of Dogs and Cats. *Compendium* 2001; 23(Suppl 9A):98

PURINA
Your Pet, Our Passion.™

Abbildung 2: Body Condition Score System mit 9-Punkte Skala, Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Purina, Proplan.

(http://www.proplan-proficlub.de/NR/rdonlyres/EF176290-526F-455C-AFE2-982596118324/0/BCS_Katze.pdf)

Der sogenannte feline Body Mass Index wird aus dem Brustkorbumfang auf Höhe der 9. Rippe sowie aus dem Abstand zwischen Patella und Tuber calcanei über eine Formel errechnet (Butterwick, 2000; Zoran, 2009) (siehe Gleichung 1 (Zoran, 2009)). Der Abstand zwischen Patella und Tuber calcanei korreliert mit der Magermasse des Tieres, der Brustkorbumfang korreliert mit der Fettmasse des

Tieres (Zoran, 2009).

Gleichung 1

$$\text{Feline Body Mass Index (\%Fett)} = \frac{1,5(\text{ribcage circumference})[\text{cm}] - (\text{leg index measurement})[\text{cm}]}{9}$$

Mithilfe der Magnetresonanztomografie kann Fettgewebe von anderen Geweben anhand seiner Kernspinresonanz unterschieden werden (Hoenig et al., 2007). Die Computertomografie ist ein Röntgenverfahren, mit dessen Hilfe Fettgewebe anhand seiner Dichte identifiziert werden kann (Lee et al., 2010). Eine Untergliederung des Abdominalfettes in subkutanes und viszerales Fett gelingt mittels beider Methoden (Hoenig et al., 2007; Lee et al., 2010). Für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse ist die einheitliche Lagerung der Tiere erforderlich. Computertomografie und Magnetresonanztomografie erfordern eine Vollnarkose der Tiere (Hoenig et al., 2007; Lee et al., 2010).

7. Komorbiditäten der Fettleibigkeit

Obesitas ist beim Menschen mit einer Reihe von Beschwerden und Erkrankungen assoziiert (Popkin et al., 2006; Dodson et al., 2011). Vor allem bei hochgradiger Fettleibigkeit reichen diese von orthopädischen Beschwerden bis hin zu Herz-Kreislauf-Problemen und Atemnot bei körperlicher Anstrengung. Weitere Erkrankungen, die beim Menschen, v.a. bei Zunahme des viszeralen Abdominalfettes, mit Fettleibigkeit einhergehen, sind Insulinresistenz, Hyperglykämie, Dyslipidämie/Hyperlipidämie, Hypertension sowie prothrombotischer und proinflammatorischer Status (Kershaw und Flier, 2004; Frühbeck, 2008). Hausman und Mitarbeiter führen zudem chronische Erkrankungen wie Kohlenhydratintoleranz, Diabetes mellitus, Koronare Herzkrankheit, Gicht, restriktive Lungenerkrankung, Gallenblasenerkrankungen, Tumorerkrankungen, degenerative Arthritis und Unfruchtbarkeit als Folge exzessiver Obesitas auf (Hausman et al., 2001). Eine Reduktion des Körpergewichts hingegen senkt das Risiko, diese chronischen Erkrankungen zu entwickeln und reduziert Morbidität und Mortalität der Betroffenen (Barzilai und Gupta, 1999).

Auch für Katzen und Hunde zeigen zahlreiche Studien, dass Fettleibigkeit mit Begleiterkrankungen und Reduktion der Lebensdauer einhergeht (Scarlett und

Donoghue, 1998; German, 2006). Fettleibige Tiere sind prädisponiert, Diabetes mellitus, Hyperlipidämien, hepatische Lipidose, Fettgewebenekrosen, kardiorespiratorische Erkrankungen, Bluthochdruck, Erkrankungen des Urogenitaltraktes, Reproduktionsstörungen, Neoplasien, dermatologische und orthopädische Erkrankungen zu erleiden (Scarlett und Donoghue, 1998; Schwarz et al., 2000; Lund et al., 2005; German, 2006; Zoran, 2009). Adipositas geht zudem mit Bewegungs- und Hitzeintoleranz, Immunschwäche und gesteigertem Anästhesierisiko einher (German, 2006).

8. Fettzellgröße verschiedener Fettgewebepots und ihr Zusammenhang mit fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen

Morphometrische Untersuchungen zeigten, dass Fettzellen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Körper unterschiedliche Größen (Durchmesser, Volumina) aufweisen (Occhipinti, 1936; Hood und Allen, 1973; Lee et al., 1973; Bianchi, 1989). Die Arbeitsgruppe von Di Girolamo stellte fest, dass Fettzellen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation im Körper eine überwiegend hypertrophe bzw. überwiegend hyperplastische Wachstumsform zeigen (Di Girolamo et al., 1998). Darüber hinaus sprechen die Untersuchungsergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen für eine mögliche pathogenetische Relevanz der Fettzellgröße (Volumen), im Sinne einer adipozytären Hypertrophie, in verschiedenen Fettgewebepots für das Auftreten bzw. die Entwicklung fettleibigkeitsassoziiierter Erkrankungen. Nachfolgend werden hierzu einzelne Untersuchungsergebnisse beispielhaft vorgestellt.

Katamoto und Mitarbeiter untersuchten Fettzellen abdominalen Fettgewebes von Schlachtkörpern gesunder Kühe und von Kühen mit abdominaler Fettgewebenekrose, die alle dieselbe ad libitum Fütterung erhielten und aus demselben Bestand stammten. Die Untersuchungen stützen sich auf die Erkenntnisse von Ito und Mitarbeitern, die postulierten, dass die Hypertrophie von Fettgewebe infolge exzessiver Energieaufnahme zu vaskulären Zirkulationsstörungen führt, und auf die Erkenntnisse von Motoi und Mitarbeiter, die eine exzessive Energiezufuhr während der Wachstumsphase als Ursache für die Entwicklung der Fettgewebenekrose annehmen (Ito et al., 1968; Motoi et al., 1984; Katamoto et al., 1996). Katamoto

und Mitarbeiter maßen die Durchmesser von Fettzellen in Suspension, die aus dem Kolonmesenterium und aus der Peripherie nekrotischer Massen stammten. Die Fettzellen im Kolonmesenterium und in der Peripherie von nekrotischen Massen bei Kühen mit Fettgewebenekrose waren signifikant größer als die von gesunden Kühen. Daraus entstand die Arbeitshypothese, dass die Hypertrophie von Fettzellen bei übermäßiger Fettgewebezunahme eine Prädisposition für die Entstehung der Fettgewebenekrose darstellt (Motoi et al., 1984; Katamoto et al., 1996).

Fettleibigkeit wird als ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II beim Menschen gesehen (Wajchenberg, 2000; Frühbeck, 2008), wobei nicht bekannt ist, weshalb manche fettleibige Menschen einen Diabetes mellitus Typ II entwickeln während andere nicht betroffen sind. Die Arbeitsgruppen um Salans, Weyer und Hoffstedt postulieren, dass eine adipozytäre Hypertrophie im Gegensatz zu einer überwiegend adipozytären Hyperplasie des subkutanen abdominalen Fettgewebes mit Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Diabetes mellitus Typ II in Verbindung steht (Salans et al., 1968; Weyer et al., 2000; Hoffstedt et al., 2010). Weyer und Mitarbeiter zeigten in prospektiven Untersuchungen beim Menschen, dass hypertrophe subkutane abdominale Fettzellen ein Prädiktor für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II sind (Weyer et al., 2000). O'Connell und Mitarbeiter untersuchten omentale und subkutane Fettzellen von metabolisch gesunden und ungesunden fettleibigen Menschen. Als metabolisch ungesund wurden Menschen definiert, wenn einer der von der International Diabetes Federation festgelegten „cut-off points“ für das Metabolische Syndrom überschritten war beziehungsweise eine kardiovaskuläre, respiratorische oder metabolische Erkrankung vorlag. Als metabolisch gesund wurden Menschen definiert, wenn sie keine kardiovaskulären, respiratorischen oder metabolischen Vorerkrankungen hatten und ihre Blutwerte unter den festgelegten „cut-off points“ lagen. Die Autoren stellten fest, dass fettleibige, metabolisch gesunde Menschen signifikant kleinere omentale Fettzellen als die als metabolisch ungesund definierten Menschen aufwiesen. Die subkutanen abdominalen Fettzellen wiesen, im Gegensatz zur Arbeit von Weyer und Mitarbeitern, bei metabolisch gesunden und ungesunden Menschen keinen Unterschied in ihrer Größe auf (O'Connell et al., 2010).

Die adipozytäre Hypertrophie bei bestehender Fettleibigkeit geht mit einer übermäßigen Produktion proinflammatorischer Adipokine einher (Skurk et al., 2007). Die Untersuchungen von Skurk und Mitarbeitern ergaben, dass bei fettleibigen Menschen große Fettzellvolumina mit einer vermehrten Synthese proinflammatorischer Adipokine wie Leptin, IL-6 und -8 und TNF- α einhergehen, wohingegen die Synthese von IL-10 sinkt. Zwischen der Fettzellgröße und der Sekretion von Adiponektin konnte kein Zusammenhang aufgezeigt werden (Skurk et al., 2007). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse von Esposito, Skurk und Maffei, dass Fettleibigkeit, insbesondere die hypertrophe Form, mit einem proinflammatorischen Status einhergeht, welcher in Zusammenhang mit der Entstehung fettleibigkeitsassoziierter Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II und Atherosklerose gebracht wird (Esposito et al., 2003; Maffei et al., 2007; Skurk et al., 2007).

III. MATERIAL UND METHODEN

In der vorliegenden Arbeit wurden die mittleren Fettzellvolumina des subkutanen, umbilikalen, omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebes adulter, männlicher, kastrierter sowohl normalgewichtiger als auch übergewichtiger bzw. adipöser Katzen mittels quantitativ stereologischer Analysen ermittelt. Die untersuchten Tiere stammten aus dem Obduktionsmaterial des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die Bestimmung der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe erfolgte nach dem Prinzip von Delesse mittels Punktzählung (Weibel, 1979). Die numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe wurde unter Anwendung der physikalischen Disektor Methode ermittelt.

1. Vorversuche

Die Bestimmung der numerischen Volumendichte mittels der physikalischen Disektor Methode erforderte die Herstellung serieller Fettgewebeschnitte mit definiertem Abstand. Durchführbarkeit sowie Art und Umfang der anzuwendenden Untersuchungstechniken für die Disektor Methode wurden im Rahmen von Vorversuchen evaluiert. Im Einzelnen wurden die Präparationstechnik zur Entnahme der Fettgewebeprouben aus den definierten Lokalisationen, die Gewinnung repräsentativer Fettgewebeprouben mittels systematisch zufälligen Auswahlverfahrens, die Prozessierungstechnik und die Eignung von Einbettungsmedien wie Glycolmethacrylat-Methylmethacrylat (GMA-MMA) und Epoxidharz (früher Epon 812) beurteilt.

1.1. Entnahmetechnik und Probengewinnung

Die Präparation der Fettgewebeprouben wurde hinsichtlich Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit der sieben zu untersuchenden Lokalisationen an 5 Katzen erprobt. Darüber hinaus wurde die Umsetzbarkeit der vollständigen Entnahme und Wägung der Fettgewebeprouben aus den sieben zu untersuchenden Fettgewebelokalisationen geprüft.

Fettgewebeprouben wurden aus dem subkutanen Fettgewebe der Regio mesogastrica, aus dem Umbilikalfettgewebe, aus dem Omentalfettgewebe, aus dem mesojunalen Fettgewebe (im Weiteren als mesenteriales Fettgewebe bezeichnet), aus

dem peripankreatischen Fettgewebe, aus dem perirenal Fettgewebe und aus dem orbitalen (im Weiteren retrobulbäres Fettgewebe bezeichnet) gewonnen.

Die Entnahmetechnik wurde sowohl an normal genährten ($n = 3$) wie auch an adipösen ($n = 2$) männlichen kastrierten Katzen erprobt. Nach der Bestimmung des Körpergewichts in Gramm und des Body Condition Scores (siehe III.2.2) wurde das Abdomen der Tiere großflächig ausrasiert und die Regio mesogastrica mit einem wasserunlöslichen Stift (edding 3000, permanent marker, col. 001, Ahrensburg) skizzenhaft auf der rasierten Haut eingezeichnet. Begrenzungslinien der mittleren Bauchgegend, der Regio mesogastrica, wurden auf Höhe der Verbindungslinie des letzten Rippenpaares und auf Höhe der Hüfthöcker eingezeichnet (siehe Abbildung 3) (Nickel et al., 2004). Nach dorsal wird die Regio mesogastrica durch die Regio lumbalis begrenzt (Nickel et al., 2004).

Paramedianschnitt und Entlastungsschnitte wurden entlang des Rippenbogens angelegt, so dass Haut und Unterhaut von der Muskulatur abpräpariert werden konnten. Das subkutane Fettgewebe haftete somit teils der Unterhaut, teils der Muskulatur an. Nach seitlichem Aufklappen der zwei Bauchhautlappen wurde die Bauchhöhle paramedian sagittal eröffnet. Der umbilikale Fettkörper im Ligamentum falciforme hepatis verbindet bei der Katze die parietale Fläche der Leber mit dem Zwerchfell und dem Nabel. Der umbilikale Fettkörper konnte weitestgehend in seiner Gesamtheit entnommen werden (siehe Abbildung 4, A). Das große Netz wurde unter Umschneidung des Pankreas im Abstand von ca. 2 cm und nach Ablösen von der großen Krümmung des Magens herauspräpariert und ausgebreitet (siehe Abbildung 4, B). Nach Abbinden des Magen-Darm-Kanals mittels einfacher Ligatur am Übergang von Ösophagus in Kardia und mittels doppelter Ligatur im Bereich des Rektums wurde der Magen-Darm-Trakt in seiner Gesamtheit entnommen und auf dem Sektionstisch ausgebreitet. Das Mesenterium wurde vom Ileum beginnend, unter Belassen des Duodenalschenkels des Pankreas am Duodenum, abpräpariert und anschließend fächerförmig ausgebreitet (siehe Abbildung 4, C). Das peripankreatische Fettgewebe wurde als das in einem Abstand von ca. 2 cm vom Pankreasrand gelegene Fettgewebe im großen Netz und Mesoduodenum definiert und entsprechend umschnitten (siehe Abbildung 4, D). Die Nieren samt ihrer retroperitonealen Fettkapsel wurden entnommen (siehe Abbildung 4, E) und anschließend aus dieser gelöst. Bei sehr fettleibigen Tieren war eine

eindeutige Abgrenzung der renalen Fettgewebekapsel von dem umliegenden retroperitonealen (sublumbalen) Fettgewebe nicht möglich. In diesen Fällen wurde die Niere mit Fettkapsel im Abstand von ca. 2 cm vom Nierenrand nach kranial, lateral und kaudal abgesetzt. Die mediale Begrenzung bildete die Aorta. Nachdem die Nieren aus ihrer Kapsel gelöst und entfernt waren, wurde die fetthaltige Kapsel ausgebreitet. Zur Entnahme des retrobulbären Fettgewebes wurden beide Bulbi und Adnexe herauspräpariert (siehe Abbildung 4, F) und das retrobulbäre Fettgewebe beider Augen entnommen.

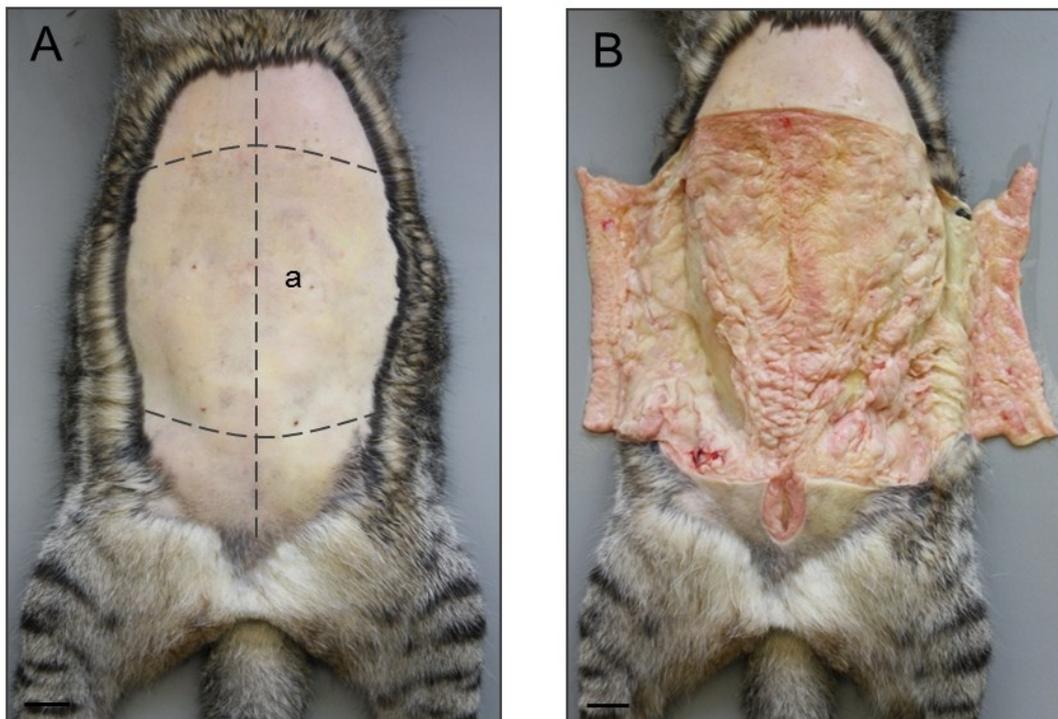


Abbildung 3: Präparation des subkutanen Fettgewebes einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS von 8; (A) ausrasiertes Abdomen, Regio mesogastrica (a) und Hilfslinien (gestrichelte Linie), hier zur besseren Darstellung schematisch überprojiziert; (B) Subkutanes Fettgewebe nach Abpräparieren der Haut; Balken \approx 2 cm.

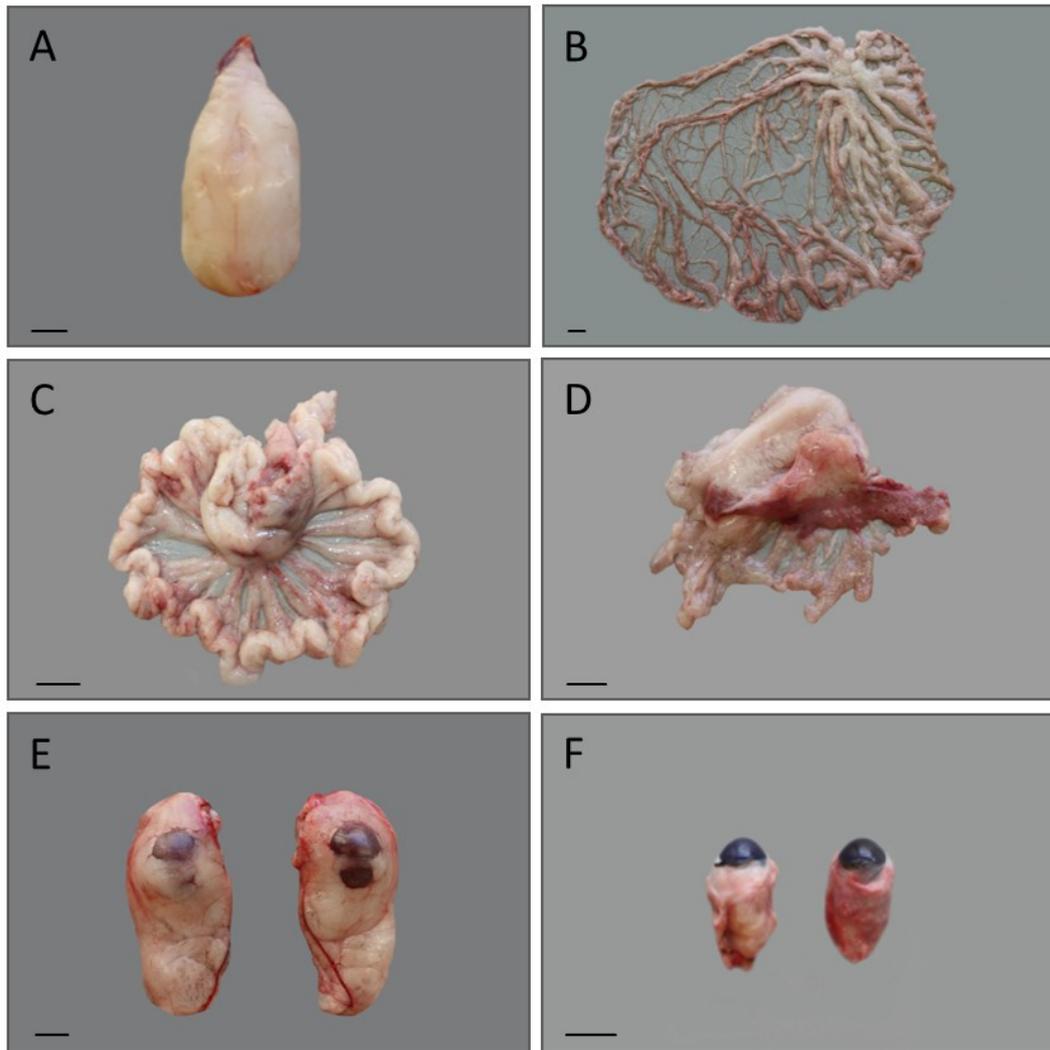


Abbildung 4: Präparierte Fettgewebelokalisationen einer männlichen kastrierten Katze mit einem BCS von 8; (A) Umbilicales Fettgewebe; (B) Omentales Fettgewebe im Omentum majus; (C) Mesenteriales Fettgewebe (Mesojejenum); (D) Pankreas mit peripankreatischem Fettgewebe; (E) Nieren in ihrer Kapsel mit perirenalem Fettgewebe; (F) Augen mit retrobulbärem Fettgewebe; Balken = 2 cm.

Die Probengröße wurde entsprechend der im Institut für Tierpathologie eingesetzten Ausgussformen für die Gewebeeinbettung in Glycolmethacrylat-Methylmethacrylat auf eine maximale Probenkantenlänge von 1 cm festgelegt. Zur systematisch zufälligen Entnahme von bis zu fünf Fettgewebeproben mit einer Probenkantenlänge von 1 cm wurde der optimale Abstand der Testpunkte auf den Testpunktrastern geprüft.

1.2. Vorversuch zur Eignung verschiedener Kunststoff-Einbettungsmedien wie Glycolmethacrylat-Methylmethacrylat (GMA-MMA) und Epoxidharz

1.2.1. Prozessierung der Fettgewebeproben für die GMA-MMA-Einbettung

Die Proben der sieben Entnahmelokalisationen wurden 24 Stunden in 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV Flintsbah a. Inn) fixiert. Jeweils 2 der 5 entnommenen Fettgewebeproben pro Lokalisation bzw. eine der beiden retrobulbären Fettgewebeproben wurden zugeschnitten und in Einbettungskassetten mit einer zufällig gewählten Seite nach unten eingelegt. Der Rest der Proben wurde 12 Stunden in Äthanol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach a. Main) : Xylol (SAV LP, Flintsbach a. Inn) (1:1) entfettet, zugeschnitten und anschließend mit einer zufällig gewählten Seite nach unten in Einbettungskassetten verbracht.

1.2.2. Einbettung der Fettgewebeproben in GMA-MMA, serielle Schnittherstellung, Färbung der GMA-MMA-Schnitte

Die Einbettung der Fettgewebeproben, die serielle Schnittherstellung sowie die Hämatoxylin-Eosin-Phloxin Färbung erfolgten wie in den Kapiteln III.2.4.2 und III.2.4.3 beschrieben.

1.2.3. Prozessierung der Gewebeproben für die Einbettung in Epoxidharz

Fixierte, entfettete und nicht entfettete subkutane und omentale Fettgewebeproben wurden mit einer frischen Klinge (T585, Plano, Wetzlar) auf 0,2 x 0,2 x 0,2 cm große Proben zugeschnitten und für 3 Stunden in mit Phosphatpuffer nach Sörensen (siehe IX.1.3.1) beschickte Reaktionsgefäße (Eppendorf safe lock tube, Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf) verbracht.

1.2.4. Einbettung in Epoxidharz und Semidünnschnittherstellung

Die Proben wurden erneut mit Phosphatpuffer nach Sörensen gewaschen und anschließend mit Osmiumtetroxid (siehe IX.1.3.4) bei 4 °C nachfixiert, entwässert und in Epoxidharz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) unter Verwendung der im Anhang aufgeführten Materialien nach folgendem Schema eingebettet (siehe Tabelle 1).

Waschen der Proben bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer nach Sörensen	6 x 2	Min.
Nachfixierung in 1%igem Osmiumtetroxid bei 4 °C	2	Std.
Waschen der Proben bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer nach Sörensen	3 x 2	Min.
Entwässern bei 4 °C in Aceton (neoLab Migge Laborbedarf-Vetriebs GmbH, Heidelberg): 50%ig, 2 x 70%ig, 2 x 90%ig, 3 x 100%ig	je 10	Min.
100%iges Aceton:Epoxidharz (siehe IX.1.3.6) (1:1)	1	Std.
Epoxidharz unverdünnt	2 x 30	Min.

Tabelle 1: Einbettung in Epoxidharz.

Im Anschluss wurden die Proben in Gelatinekapseln (Plano GmbH, Wetzlar) überführt, mit Epoxidharz aufgefüllt und bei 60 °C im Brutschrank für 48 Stunden auspolymerisiert.

Die Epoxidharzblöcke wurden mit einer Fräse (TM60, Reichert-Jung, Heidelberg) zugetrimmt. Von den Blöcken wurden an einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Heidelberg) 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

1.2.5. Toluidinblau-Safraninfärbung der Epoxidharz-Semidünnschnitte

Auf einer 85 °C warmen Heizplatte (HK 120, Reichert-Jung, Heidelberg) wurden die Semidünnschnitte 45 Sekunden mit Toluidinblau-Lösung (siehe IX.1.4.1) gefärbt, mit destilliertem Wasser abgespült, getrocknet und anschließend 15 Sekunden mit Safranin O Lösung (siehe IX.1.4.2) gegengefärbt und mit destilliertem Wasser abgespült. Nach dem Trocknen wurden die gefärbten Schnitte mit einem Tropfen Epoxidharz und Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG) eingedeckt und für 24 Stunden in den Brutschrank verbracht.

2. Tiere, Material und Methoden

2.1. Übersicht über die durchgeführten Analysen

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die durchgeführten Analysen.

Tiere: männliche kastrierte Katzen, Zeitpunkt des Todes < 48 h. Ermittlung des Körpergewichts und des Body Condition Scores nach 9-Punkte-Skala (Kamphues, 2004).	III.2.2
Sektion, Präparation und systematisch zufällige Fettgewebeprobennahme aus dem subkutanen, umbilikalen, omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebe.	III.1.1; III.2.3
Prozessierung der Fettgewebeproben für die Einbettung in GMA-MMA.	III.2.4.1
Einbettung in GMA-MMA, Herstellung von Serienschnitten (6-10 Schnitte/Probe; nominelle Schnittdicke 1 µm) und Färbung der Kunststoffschritte.	III.2.4.2; III.2.4.3
Einbettung in Paraffin, Schnittherstellung, Masson-Trichrom-Färbung zur besseren Darstellung des gefäßführenden Bindegewebes im Fettgewebe.	III.2.4.4; III.2.4.5
Bestimmung der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe durch Punktzählung am histologischen Schnitt anhand systematisch zufälliger Testfelder.	III.2.5.1
Bestimmung der numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe mittels physikalischen Diesektorverfahrens.	III.2.5.2
Errechnung des mittleren Volumens der Fettzellen aus den untersuchten Fettgewebelokalisationen.	III.2.5.3

Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Analysen mit Verweis auf die entsprechenden Kapitel.

2.2. Tiere

Die Fettgewebeproben wurden von normalgewichtigen männlichen kastrierten Katzen (n = 4) und übergewichtigen männlichen kastrierten Katzen (n = 4), die zur Obduktion in das Institut für Tierpathologie der LMU München gelangten, gewonnen. Es wurden ausschließlich Tiere untersucht, die zum Zeitpunkt der Sek-

tion nicht länger als 48 Stunden tot waren. Alter, Epikrise und Signalement der Tiere wurden dem Vorbericht entnommen.

Bestimmung des Tierkörpergewichts und des Body Condition Scores

Das Gewicht der Tierkörper wurde durch Abwiegen (Panther BBA 330-CC15, Mettler Toledo, Gießen) in Gramm (g) ermittelt. Anschließend wurde der Body Condition Score adspektorisch und palpatorisch entsprechend der in Tabelle 3 aufgeführten Einteilung bestimmt (Kamphues, 2004). Die Tiere wurden in eine Gruppe mit Tieren mit einem BCS ≥ 6 und in eine mit einem BCS < 6 eingeteilt.

Body Condition Score	Beschreibung
1	Rippen bei kurzem Haar sichtbar, kein palpierbares Fettgewebe, sehr ausgeprägte Taille, Beckenknochen und Lendenwirbel sichtbar
3	Rippen leicht palpierbar mit sehr dünner Fettschicht, Beckenknochen, Lendenwirbel leicht palpierbar, markierte Taille, kaum Bauchfett
5	Ideal: gut proportioniert, Taille sichtbar, Rippen leicht palpierbar mit dünner Fettschicht, kaum Bauchfett
7	Rippen unter mäßiger Fettschicht noch palpierbar, Taille schwer erkennbar, deutliche Rundung des Abdomens, mäßig Bauchfett
9	Rippen unter dicker Fettschicht nicht palpierbar, starke Fettdepots in der Lendengegend, im Gesicht und an den Gliedmaßen
Score 2, 4, 6, 8	Zwischenstadien

Tabelle 3: 9-Punkte-Skala zur Ermittlung des Body Condition Scores mit ausführlicher Beschreibung der adspektorischen und palpatorischen Charakteristika (Kamphues, 2004).

2.3. Präparation der zu untersuchenden Fettgewebelokalisationen und systematisch zufällige Fettgewebeprobentnahme

Die Präparation der Fettgewebelokalisationen erfolgte basierend auf den aus den Vorversuchen (siehe III.1.1) erzielten Erkenntnissen (siehe Abbildung 3 und Abbildung 4).

Mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes wurde das auf dem Sektionstisch ausgebreitete Fettgewebe mit einer durchsichtigen Testpunktrasterfolie (375 Testpunkte im Abstand von je 1 cm) bedeckt. Die Fettgewebeproben ($n = 5/\text{Lokalisation}$) mit einer Schnittkantenlänge von ca. 1 cm wurden systematisch zufällig ausgewählt (Gundersen und Jensen, 1987). Die Anzahl (N) der Trefferpunkte auf Fettgewebe wurde bestimmt und entsprechend durchnummeriert. Mittels Gleichung 2 (Lewis-Beck et al., 2004) wurde für alle Entnahmelokalisationen, mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes, und für jedes Tier ein individuelles Beprobungsintervall (k) errechnet. Die erste der 5 zu entnehmenden Proben wurde als Zufallszahl zwischen 1 und k aus einer Zufallszahlentabelle (Stattrek, 2009) bestimmt. Systematisch wurde anschließend jede weitere Probe im errechneten Intervall (k) mit Schere und Pinzette entnommen (siehe Abbildung 5). Bulbus und Adnexe beider Augen wurden gemeinsam mit dem retrobulbären Fettgewebe entnommen und daraufhin das Fettgewebe abpräpariert. Anschließend wurden die gewonnenen Fettgewebeproben, getrennt nach Lokalisation, in Probengefäße mit 4%iger neutral gepufferter Formaldehydlösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV Flintsbach a. Inn) zur Fixierung verbracht.

Gleichung 2

$k = \frac{N}{n}$	
k	Beprobungsintervall
N	Anzahl der Trefferpunkte auf Fettgewebe
n	Anzahl auszuwertender Proben (5)

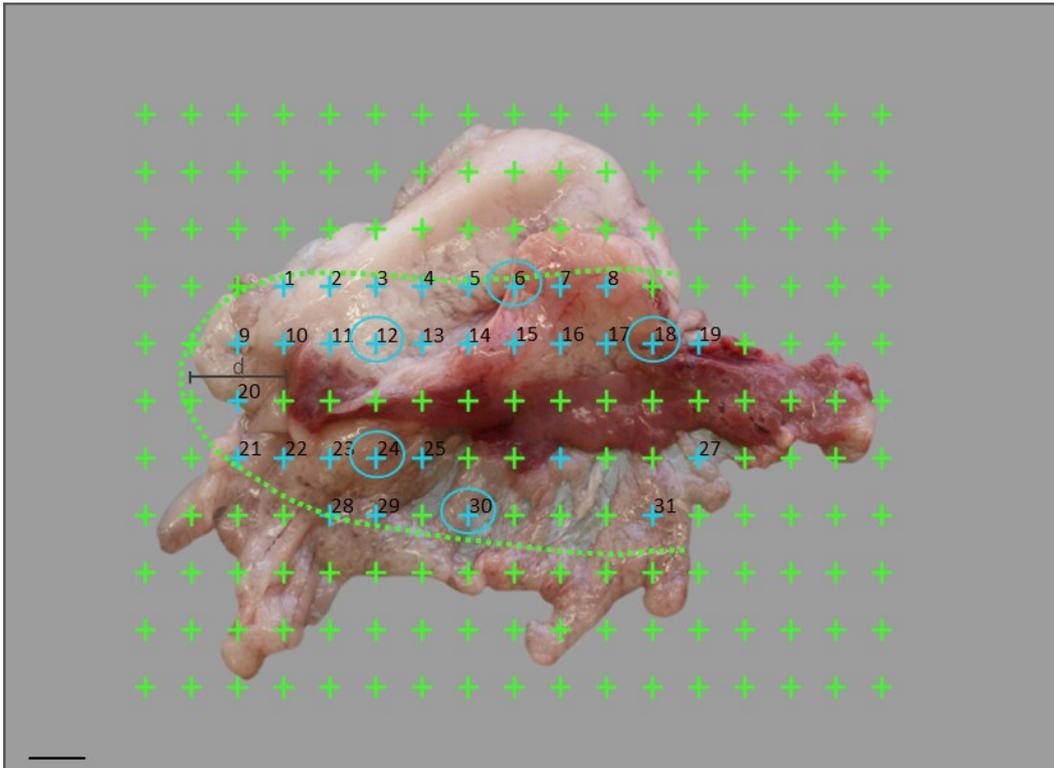


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Bestimmung systematisch zufällig gewählter Fettgewebeproben mittels eines Testpunkterasters; Pankreas und peripankreatisches Fettgewebe einer männlichen kastrierten Katze; d (Abstand zum Pankreas) = 2 cm; Bei N (Trefferpunkte auf Fettgewebe) = 31 und 5 auszuwertenden Probenlokalisationen (n) ergibt sich nach $k = N/n$ (Gleichung 2) ein Beprobungsintervall von $k = 6$. Einer Zufallszahlenreihe wird eine Zufallszahl zwischen 1 und k entnommen; diese definiert die erste (zufällige) Probenlokalisation, (hier Trefferpunkt 6). Systematisch wird anschließend jeder weitere k -te Trefferpunkt beprobt; Balken = 1 cm.

2.4. Prozessierung der Proben für histologische, morphometrische und quantitativ stereologische Analysen

2.4.1. Fixation, Entfettung und Agareinbettung

Die Fettgewebeproben wurden 24 Stunden bei 8 °C in 4%iger neutral gepufferter Formaldehyllösung (Nr. FN 10 000-4-1, SAV, Flintsbach a. Inn) fixiert. Anschließend wurden die Proben 12 Stunden in einem Xylol-Alkohol-Gemisch (1:1) entfettet. Zur Vermeidung von Quetschartefakten bei den Prozessierungsschritten wurden die fixierten Fettgewebeproben in Agar eingebettet. Hierzu wurden sie in eine mit Agar (Bacto™ Agar, 214010, Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Frankreich) gefüllte Aluminiumschiene mit U-Profil (1,5 cm x 50 cm x 1,5 cm) eingebracht. 10 g Agar wurden mit 60 ml 50 °C warmem Wasser in einem Becherglas (200 ml) verrührt. Bei 650 Watt wurde das Gemisch ca. 1 min

in einem Mikrowellenherd (MG 3837C, LG Electronics, Ratingen) aufgekocht. Der flüssige Agar wurde im Anschluss mit ca. 0,4 ml schwarzer Tusche (29770, Rohrer & Klingner Leipzig-Co. Zella-Mehlis) versetzt, verrührt und in eine Aluminiumschiene mit U-Profil gegossen. Die Proben wurden an entsprechend markierter Stelle in den flüssigen mit Tusche geschwärmten Agar versenkt. Zu den Fettgewebeproben wurden außerdem Leber- oder Nierenproben, ca. 2-3 cm x 0,3 cm x 0,3 cm groß, direkt neben die Fettgewebeproben mit eingebettet, um bei geringer Vergrößerung die Lage des Fettgewebes auf dem histologischen Schnitt lokalisieren und die Schnitte zur Durchführung des Punktzählverfahrens und zur Anwendung der physikalischen Disektor Methode entsprechend gleichgerichtet und parallel anordnen zu können (siehe III.2.5.1. und III.2.5.2). Nach einer Aushärtungszeit von 10 min wurde der Agar mit den Proben aus der Schiene entnommen. Die markierten Abschnitte der Schiene ermöglichten eine einwandfreie Zuordnung der Fettgewebeproben im Agarblock. Jede der in Agar eingelassenen Fettgewebeproben wurde anschließend mit einer Rasierklinge (T585, Plano, Wetzlar) in ca. 2-3 mm dicke Scheiben lamelliert (siehe Abbildung 6). Je eine Scheibe der fünf entnommenen Proben pro Lokalisation wurde anhand einer Zufallszahlentabelle entnommenen Zufallszahl bestimmt und in Einbettungskassetten verbracht.

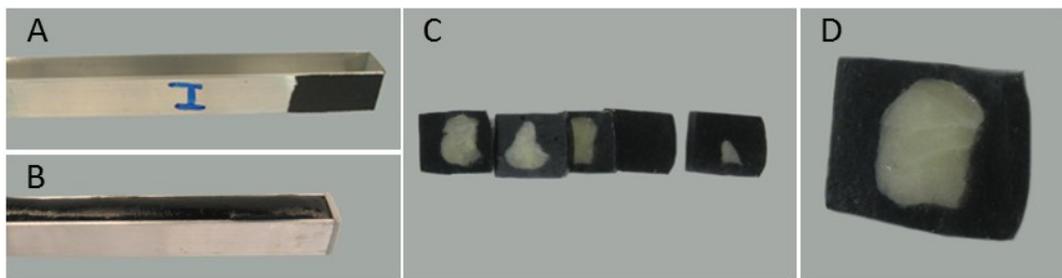


Abbildung 6: Lamellierung einer in geschwärztem Agar eingebetteten Fettgewebeprobe; **A:** Aluminiumschiene mit U-Profil und Abschnittsmarkierung; **B:** Aluminiumschiene mit U-Profil, gefüllt mit geschwärztem Agar; **C:** Aus der Schiene herausgelöster lamellierter Agarblock mit darin eingebettetem Fettgewebe; **D:** Anschnittfläche des Fettgewebes, eingebettet in geschwärztem Agar; Balken \approx 1 cm.

2.4.2. Einbettung der Fettgewebeproben in GMA-MMA und serielle Schnittherstellung

Die entfetteten, in Agar eingebetteten Fettgewebeproben wurden zur Entfernung des ungebundenen Fixiermittels zunächst 3 Stunden in Spüllösung (siehe

IX.1.1.1) verbracht. Anschließend erfolgte die Entwässerung in aufsteigender Äthanolreihe in einem Gewebeeinbettautomaten (Citadel 1000, Shandon GmbH, Frankfurt) (siehe Tabelle 4).

Äthanol 30%ig	2 x 1	Std.
Äthanol 56%ig	2 x 1	Std.
Äthanol 70%ig	2 x 2	Std.
Äthanol 96%ig	2 x 2	Std.
Äthanol 96%ig	2 x 3	Std.

Tabelle 4: Aufsteigende Äthanolreihe

Im Anschluss wurden die Proben für 24 Std. bei 4 °C auf einem Taumler (Modell 4010, Köttermann, Hänigsen) mit einem Kunststoffmonomerenmischung im Verhältnis 1:1, genannt Intermedium, bestehend aus 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (GMA, Fluka-Nr. 64170) und Methylmethacrylat (MMA, Fluka-Nr. 64200) versetzt. Daraufhin wurden die Proben für 4 Stunden auf dem Taumler bei 4 °C mit dem Einbettungsmedium Lösung A (siehe IX.1.1.3) inkubiert. Anschließend wurden die Proben in luftdicht verschließbare Polyethylenausgussformen (LDPE mit Schnappdeckel, Diagonal, Münster) überführt und mit Lösung B (Einbettungsmedium A und Polymerisationsstarter) (siehe IX.1.1.4) versetzt. Nicht entfettete Proben mussten, um ein Aufschwimmen zu verhindern, mittels Gewichte in Position gehalten werden. Die Polymerisation erfolgte, da es sich hierbei um eine exotherme Reaktion handelt, über 24 Stunden bei 4 °C in einem Wasserbad im Kühlschrank. Das Polymerisationsprodukt wurde aus den Polyethylenausgussformen herausgelöst und mit einem Hartschnittmikrotom (Microm HM 360, Walldorf) 1 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf einem Wasserbad (Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel) bei 55 °C gestreckt, auf entfettete Objektträger aufgezogen, auf einer Heizplatte (HPL-2, Kunz Instruments, Vallentuna, Schweden) getrocknet und über Nacht bei 64 °C in einem Wärmeschrank (Mettmert GmbH & Co. KG, Schwabach) gelagert.

2.4.3. Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der GMA-MMA-Schnitte

Die Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der Kunststoffsschnitte erfolgte unter Verwendung des folgenden Färbeprotokolls (siehe Tabelle 5).

Mayers Hämalaun (Nr. 1.09249, Merck, Darmstadt)	5	Min.
Wässern in fließendem Leitungswasser	10	Min.
1%iges HCl-Äthanol (siehe IX.1.2.1)	2	Sek.
Wässern in fließendem Leitungswasser	10	Min.
Heizplatte, 60°C	5	Min.
Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (siehe IX.1.2.2)	20	Min.
Destilliertes Wasser	2 x 2	Sek.
Heizplatte (60°C)	2	Min.
Xylol	2	Sek.

Tabelle 5: Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der Kunststoffsschnitte

Im Anschluss wurden die Schnitte mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) und Histokitt (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & C. KG, Sondheim/Rhön) eingedeckt.

2.4.4. Paraffineinbettung und Schnittherstellung

Fettgewebeproben des subkutanen, umbilikalen, omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebes wurden zur Durchführung einer Spezialfärbung an Paraffinschnitten zur besseren Darstellung des gefäßführenden Bindegewebes in Paraffin eingebettet. Hierfür wurden die fixierten und entfetteten Fettgewebeproben in einem Einbettungsautomaten (Autotechnikon, Histomaster 2050/DI, Bavimed, Birkenau) wie folgt prozessiert (siehe Tabelle 6).

Spülen mit destilliertem Wasser	30	Min.
Äthanol 70%ig	2 x 1,5	Std.
Äthanol 96%ig	2 x 1,5	Std.
Äthanol 100%ig	2 x 1,5	Std.
Xylol	2 x 30	Min.
Xylol	1,5	Std.
Paraffin (SAV LP, Flintsbach a. Inn) bei 60 °C	2	Std.
Paraffin bei 60 °C	3	Std.

Tabelle 6: Paraffineinbettung

Im Anschluss wurden die Proben in einer Ausgießstation (TBS 88 Paraffin Embedding System, Medite GmbH, Burgdorf) in Paraffinblöcke ausgegossen. Mit einem Rotationsmikrotom (HM 315, Microm, Walldorf) wurden Schnitte mit einer nominellen Schnittdicke von ca. 4-5 µm angefertigt. Diese wurden auf einem 40°C warmen Wasserbad (Daglef Platz, Wankendorf) gestreckt und auf geschliffene Objektträger (76 x 26 mm, Starfrost, Engelbrecht, Edermünde, Nr. 11250) aufgezogen. Zur Trocknung lagerten die Schnitte für mindestens 24 Stunden bei 40°C in einem Wärmeschrank (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach). Zur Paraffinextraktion wurden die Schnitte für 20 Minuten in Xylol inkubiert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 96%- und 70%-iges Äthanol, Aqua dest.).

2.4.5. Masson-Trichrom-Färbung

Zur besseren Darstellung des gefäßführenden Bindegewebeanteils im Fettgewebe der jeweiligen Lokalisation wurden die Paraffinschnitte mit Masson-Trichrom nach folgenden Protokoll gefärbt (siehe Tabelle 7).

Xylol	10	Min.
Absteigende Alkoholreihe (2 x 100%, 2 x 96%, 1 x 70%)	Je 2	Sec.
Weigerts Eisenhämatoxylin (siehe IX.2.1.1)	5	Min.

Wässern in fließendem warmen Leitungswasser	5	Min.
Differenzieren in 0,5%igem HCL-Alkohol	3 x 1	Sec.
Wässern in fließendem warmen Leitungswasser	5	Min.
Rote Farbe (siehe IX.2.1.4)	15	Min.
Spülen in 0,5%iger Essigsäure (siehe IX.2.1.10)	3 x 1	Sec.
Phosphorwolframsäure-Orange G (siehe IX.2.1.8)	3	Min.
Spülen in 0,5%iger Essigsäure	3 x 1	Sec.
Anilinblau (siehe IX.2.1.9)	1	Min.
Spülen in 0,5%iger Essigsäure	3 x 1	Sec.
Ab 96%igem Alkohol in aufsteigende Alkoholreihe	Je 10	Sec.
Xylol	10	Sec.

Tabelle 7: Masson-Trichrom-Färbung

Anschließend wurden die Schnitte mit Deckgläschen (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) und Histokitt (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim/Rhön) eingedeckt.

2.5. Quantitativ stereologische Analysen

Zur quantitativ stereologischen Abschätzung der mittleren Fettzellvolumina in den sieben untersuchten Lokalisationen wurden die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe ($V_{V(\text{Fettzellen}/\text{Fettgewebe})}$) und die numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe ($N_{V(\text{Fettzellen}/\text{Fettgewebe})}$) bestimmt. Die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe wurde nach dem Prinzip von Delesse durch Bestimmung der Punktdichte der Fettzellen ermittelt (Weibel, 1979). Die numerische Volumendichte wurde mittels physikalischer Disektor Methode ermittelt. Die Durchführung der Punktzählung und der physikalischen Disektor Methode erfolgte an einem computerassistierten und automatisierten Stereologiesystem (bestehend aus einem Systemmikroskop (Olympus BX 41, Tokio, Japan) mit gekoppelter, automatisch fokussierender (Motorized Focus Drive, MFD, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar) Videokamera (Olympus DP 72, Tokio, Japan), einer

Tischsteuerung (M-SC-DT-3-Tischsteuerung, Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, Wetzlar), sowie einem Rechner (K & R Computersysteme, München) mit zwei Flachbildmonitoren (HP LP 2065 20“-LCD-Monitor, Palo Alto, USA) und der installierten Software newCAST™ (Computer Assisted Stereological Toolbox, Visiopharm, Hoersholm, Dänemark).

2.5.1. Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe

Der Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe wurde nach dem Prinzip von Delesse durch Punktzählung bestimmt (Weibel, 1979) (siehe Gleichung 3).

Gleichung 3

$V_{V(\text{Fettzellen/Fettgewebe})} = A_{A(\text{Fettzellen/Fettgewebe})} = P_{P(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$	
$V_{V(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$	Volumendichte (Volumenanteil) der Fettzellen im Fettgewebe
$A_{A(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$	Flächendichte (Flächenanteil) aller Fettzellanschnittprofile in (an) der untersuchten Fettgewebeanschnittfläche
$P_{P(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$	Punktdichte der untersuchten Struktur (Fettzellen) im entsprechenden Referenzraum (Fettgewebe) (das Verhältnis der bei Verwendung eines äquidistanten Punktrasters auf Fettzellanschnittprofile und auf die Fettgewebeanschnittfläche innerhalb eines untersuchten Areals des histologischen Schnittpräparats treffenden Punkte)

Zur Ermittlung der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe, $V_{V(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$, wurden unter 100-facher Vergrößerung durchschnittlich 56 ± 13 Fotografien in durchschnittlich 8 Schnitten (4 Schnittpaare) pro Lokalisation und Tier angefertigt. In den Fotografien wurden die innerhalb eines Testfeldes mit einer durchschnittlichen Testfeldfläche von $106 \times 10^3 \pm 20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ liegenden Trefferpunkte auf Fettzellen und auf Fettgewebe gezählt. Anhand eines durch das Stereologiesystem automatisch über den Fotografien projizierten Testpunktrasters (25 bis 49 Testpunkte je nach Fläche des verwendeten Testfeldes) mit Testpunk-

ten in einem Abstand von $47\mu\text{m}$, wurde die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe pro Lokalisation und Tier über Gleichung 4 bestimmt (siehe Abbildung 7).

Gleichung 4

$V_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})} = \frac{\sum P_{(\text{Fettzellen})}}{\sum P_{(\text{Fettgewebe})}}$	
$V_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})}$	Stereologisch geschätzte mittlere Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe der entsprechenden Lokalisation
$\sum P_{(\text{Fettzellen})}$	Summe der auf die Fettzellen fallenden Trefferpunkte
$\sum P_{(\text{Fettgewebe})}$	Summe der auf das Fettgewebe fallenden Trefferpunkte im Testfeld

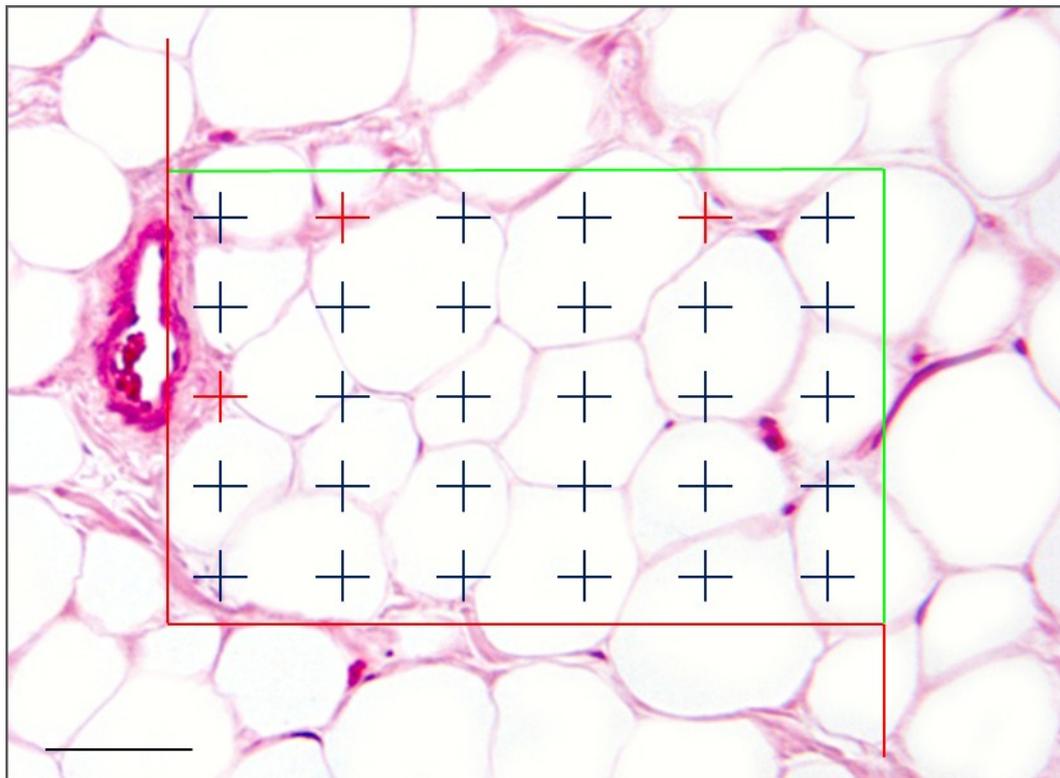


Abbildung 7: Bestimmung der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe. Repräsentative Aufnahme retrobulbären Fettgewebes mit Testfeld nach Gundersen (Gundersen und Jensen, 1987) und Testpunktraster; beispielhaft zeigen dunkelblaue Testpunkte Treffer auf Fettzellen, rote Testpunkte Treffer auf interstitiellem Gewebe; Balken = $50\mu\text{m}$.

Pro Lokalisation und Tier wurden durchschnittlich 2645 ± 749 Trefferpunkte ausgewertet.

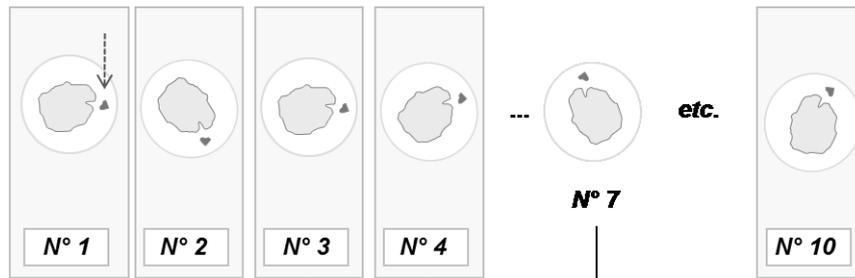
2.5.2. Numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe

Die numerische Volumendichte $N_{V(\text{Fettzellen}/\text{Fettgewebe})}$ der Fettzellen im Fettgewebe pro Volumeneinheit des Referenzkompartiments wurde mithilfe der physikalischen Disektor Methode an seriellen Hämatoxylin-Eosin-Phloxin gefärbten GMA-MMA-Schnitten mit einer nominellen Schnittdicke von $1 \mu\text{m}$ ermittelt (siehe Abbildung 8).

2.5.2.1. Prinzip des physikalischen Disektors

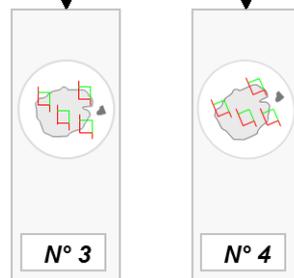
Die physikalische Disektor Methode dient der Bestimmung der Anzahl von Partikeln im dreidimensionalen Raum. Der Disektor stellt ein dreidimensionales Testsystem mit bekanntem Disektorvolumen dar und besteht aus einem Testfeld mit definierter Fläche auf einer Ausgangsebene und einer parallel dazu angeordneten Vergleichsebene. Das Disektorvolumen ist das Produkt aus Testfeldflächen und Disektorhöhe (= Distanz zwischen Ausgangs- und Vergleichsebene) (Sterio, 1984; Gundersen, 1986). Gezählt werden, unabhängig von Größe oder Gestalt, Partikel (hier Fettzellkernanschnitte), deren Profile durch das Testfeld auf der Ausgangsebene erfasst und die von der Vergleichsebene nicht geschnitten werden. Die so gezählten Partikel werden gemäß der standardisierten Nomenklatur (Weibel, 1979; Oberholzer, 1983; Gundersen, 1986; Mattfeldt, 1990) mit dem stereologischen Symbol Q^- bezeichnet, wobei das hochgestellte Minuszeichen das Verschwinden der Partikelprofile zum Ausdruck bringt (siehe Abbildung 8). Die numerische Volumendichte $N_{V(\text{Fettzellen}/\text{Fettgewebe})}$ der entsprechenden Partikel (Fettzellen) errechnet sich aus der Anzahl der gezählten Fettzellkernanschnitte, dividiert durch das Disektorvolumen (siehe Gleichung 6).

A Folgeschnittserie (1-10) der in GMA-MMA eingebetteten Fettgewebeprobe

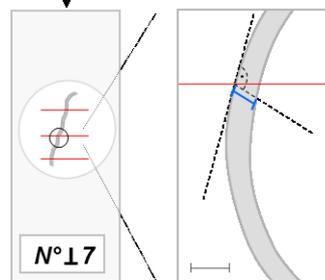


B Systematisch zufällige Auswahl von Folgeschnittpaaren (Bsp. N° 3 und 4) zur Abschätzung von $N_{V(FZ/FG)}$.

Systematisch zufällige Auswahl erwartungsgerechter Testfelder in entsprechenden Lokalisationen beider Folgeschnitte

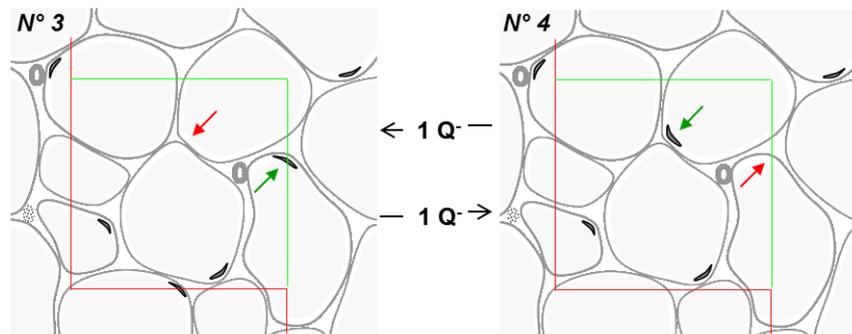


C Orthogonale Wiedereinbettung eines zufällig ausgewählten Schnittes (N° 7) in Epon zur Schnittdickenbestimmung



Bestimmung der Schnittdicke am Schnittpräparat des orthogonal wiedereinbetteten Schnittes

Zählen der Fettzellkernanschnittprofile, welche innerhalb des durch das Testfeld definierten Bereichs in nur einem beider Folgeschnitte präsent sind (Q)



Disektorvolumen = Fläche des Testfeldes x Abstand der Schnittebenen (Schnittdicke)

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Bestimmung von $N_{V(\text{Fettzellen/Fettgewebe})}$ (A) Schematische Darstellung der Herstellung von 1 μm dicken Serienschritten, $n = 6-10$ Schnitte/Fettgewebeprobe (210-350 Serienschritte/Tier), zur Orientierung wurden formalinfixierte Leber- oder Nierenproben mit eingebettet (gestrichelter Pfeil); (B) Schematische Darstellung der systematisch zufälligen Auswahl von Schnittpaaren und der Durchführung der physikalischen Disektor Methode zur Ermittlung der numerischen Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe; Pfeile zeigen auf gezählte Q ; der Fettzellkern, der in $N^{\circ}3$ die rote Linie des Zählrahmens (counting frame) trifft, wird nicht gezählt; (C) Schematische Darstellung der Schnittdickenbestimmung zur Bestimmung der Disektorhöhe und zur Berechnung des Disektorvolumens.

2.5.2.2. Bestimmung der orthogonalen Linearprojektion der Fettzellkernanschnittprofile

Bedingung für die Anwendbarkeit der physikalischen Disektor Methode ist, dass der Abstand zwischen den Auswertungsebenen (=Disektorhöhe) nicht größer als ca. ein Drittel der minimalen orthogonalen Linearprojektion („Höhe“) der zu erfassenden Zellkerne ist (Gundersen, 1986). Die Bestimmung des Abstands der Auswertungsebenen erfolgte an zehn 1 μm dicken Hämatoxylin-Eosin-Phloxin gefärbten GMA-MMA-Schnitten von eingebetteten Fettgewebeproben aus dem subkutanen ($n = 5$) und omentalen ($n = 5$) Fettgewebe. Von jedem histologischen Schnittbild wurde unter 400-facher Vergrößerung jeweils eine Fotografie angefertigt sowie unter gleichen Bedingungen ein Objektmikrometer aufgenommen. Die Bestimmung der minimalen Durchmesser der Fettzellkernanschnittprofile erfolgte an einem halbautomatischen Bildanalysesystem (Videoplan[®], Zeiss-Kontron, Eching). Nach Kalibrierung des Systems wurde der minimale Durchmesser der Fettzellkernanschnittprofile von 100 Fettzellkernanschnittprofilen bestimmt. Der Mittelwert betrug $3,69 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Bei einer Schnittdicke der GMA-MMA-Schnitte von 1 μm , werden direkte Folgeschnitte zur Bestimmung der numerischen Volumendichte ausgewertet.

2.5.2.3. Bestimmung der nominellen Schnittdicke

Zur Überprüfung der nominellen Schnittdicke (Gundersen, 1986; Wanke, 1996) der GMA-MMA-Schnitte wurde je Lokalisation und Tier ein Schnitt aus der seriellen Schnittreihe senkrecht in Epoxidharz eingebettet (siehe III.1.2.3 und III.1.2.4), geschnitten und anschließend wie in Kapitel III.1.2.5 gefärbt und eingedeckt. Die orthogonal eingebetteten GMA-MMA Schnitte wurden unter 1000-facher Vergrößerung gemeinsam mit einem Objektmikrometer fotografiert, formatiert und ausgedruckt. Die Messung der Schnittdicke erfolgte an einem halbautomatischen Bildanalysesystem (Videoplan[®], Zeiss-Kontron, Eching). Nach Kalibrierung des Systems, wurde die Schnittdicke an den Ausdrucken 30 zufällig gewählter Fotografien gemessen. Der Mittelwert betrug $1,01 \mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$. Zur Berechnung der numerischen Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe und des mittleren Volumens der Fettzellen mittels physikalischer Disektor Methode wurde einheitlich ein Wert der Schnittdicke von 1 μm verwendet.

2.5.2.4. Bestimmung der Einbettungsschrumpfung der Fettgewebeproben sämtlicher zu untersuchenden Lokalisationen

Die Einbettungsschrumpfung nach Einbettung in GMA-MMA wurde anhand der Flächeninhalte vor und nach Einbettung der Fettgewebeproben in den sieben untersuchten Lokalisationen von drei zufällig ausgewählten adulten männlichen kastrierten Katzen an durchschnittlich 12 ± 1 Schnittflächen pro Lokalisation mittels Gleichung 5 bestimmt (Haug, 1980; Wanke, 1996) und die ermittelten Werte entsprechend korrigiert (Gleichung 7). Die Gewebeschrumpfung der Fettgewebeproben durch Fixierung mit Formaldehyd und Entfettung mit Xylol:Alkohol (1:1) (siehe III.2.4.1) wurde außer Acht gelassen. Nach Lamellierung der in Agar eingebetteten Fettgewebeproben, wurden die Scheiben mit einer zufällig gewählten Fettgewebeprobenanschnittfläche zum Schutz des Scangeräts beidseitig mit einer DIN A4 Klarsichtfolie (Farb-Laserdrucker-Kopier-Folie, DIN A4, transparent, sigel, Mertingen) versehen und auf die Scanfläche des Scanners (HP Scanjet 7400c, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen) verbracht. Mit jedem Scanvorgang wurde ein Maßstab in Form eines Millimeterpapiers aufgenommen. Anschließend wurden die Proben so in die Einbettungskassetten zur Einbettung in GMA-MMA verbracht, dass von der gescannten Schnittflächenseite jeder Fettgewebeprobe ein 5 μm dicker Schnitt hergestellt und gefärbt werden konnte (siehe III.2.4.2 und III.2.4.3). Die histologischen Schnitte wurden gemeinsam mit einem Maßstab mit einer an ein Photomakroskop (M400, Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz) angeschlossenen Kamera (Leica FireCam) digital fotografiert (siehe Abbildung 9).

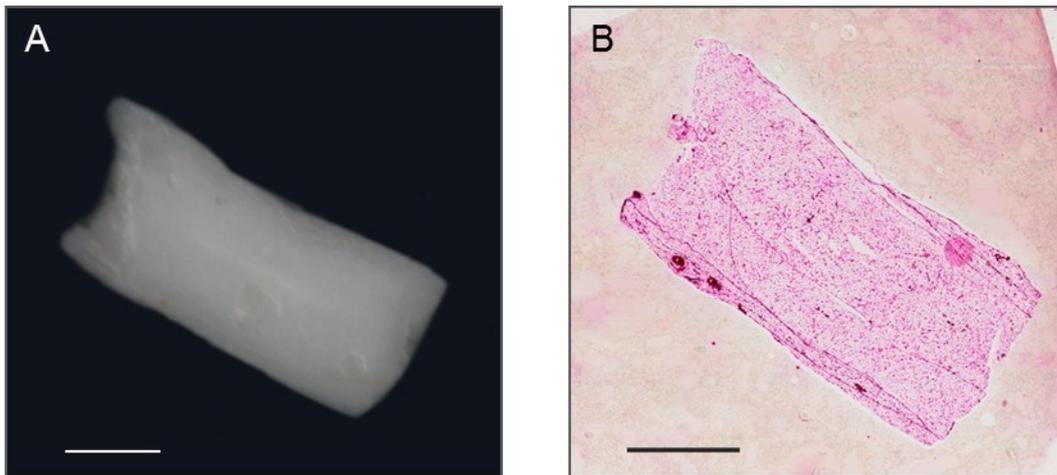


Abbildung 9: A: Scanbild von subkutanem Fettgewebe, fixiert, entfettet und in geschwärzten Agar eingebettet; B: Dieselbe Fettgewebeprobe wie A in GMA-MMA eingebettet; Balken = 2 mm.

Die Flächeninhalte vor und nach Einbettung wurden unter Verwendung von Ausdrucken der jeweiligen Probenfotos mit einem Bildanalyse-System (Videoplan®, Zeiss-Kontron, Eching) planimetrisch bestimmt.

Der lineare Schrumpfungsfaktor wurde wie in Gleichung 5 berechnet.

Gleichung 5

$$f_s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n A_{i(s)}}{\sum_{i=1}^n A_i}}$$

f_s	Linearer Schrumpfungsfaktor
$A_{i(s)}$	Flächeninhalt des histologischen Kunststoffschnittes der i-ten Fettgewebeprobe
A_i	Flächeninhalt der i-ten in Agar eingebetteten fixierten und entfetteten Fettgewebeprobe vor Einbettung
n	Anzahl der Fettgewebeproben pro Lokalisation

2.5.2.5. Bestimmung der numerischen Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe

Aus den sechs bis zehn seriellen GMA-MMA-Schnitten von jeweils drei der fünf Proben pro Lokalisation und Tier wurde anhand einer Zufallszahlentabelle (Stattek, 2009) entnommenen Zahl für jede zu untersuchende Schnittreihe jeweils ein Schnitt X als Ausgangsschnitt ausgewählt, wobei der erste Schnitt der jeweiligen Schnittreihe grundsätzlich außer Acht gelassen wurde (Walker et al., 1992; Wanke, 1996). Der entsprechende Schnitt X+1 der Schnittserie diente als Vergleichsschnitt. Das Stereologiesystem bestimmte im Ausgangsschnitt systematisch zufällig erwartungsgetreue Testfelder (Disektorfläche) und suchte die entsprechende Lokalisationen im Folgeschnitt auf (Gundersen, 1977). Um ein möglichst korrektes Übereinanderlegen der Serienschnitte zu gewährleisten, ist ein eindeutiger Bezugspunkt, der sich von Schnitt zu Schnitt verfolgen lässt, erforderlich, weshalb in unmittelbarer Nachbarschaft zum Fettgewebe Leber- oder Nierengewebe eingebettet wurde (siehe III.2.4.1). Ausgewählte (Ausgangsebene) und korrespondierende (Vergleichsebene) Lokalisationen wurden anschließend in 100facher Vergrößerung digital fotografiert (siehe Abbildung 8) Die Zählung der Q^- (Fettzellkernanschnittprofile, die in Schnitt X, jedoch nicht mehr in Schnitt X+1 präsent waren) erfolgte an Ausgangs- und Vergleichsebenen mit einer durchschnittlichen Fläche von $106 \times 10^3 \mu\text{m}^2 \pm 20 \times 10^3 \mu\text{m}^2$. In einem zweiten Durchgang wurde die Effizienz des Verfahrens verdoppelt, indem die Rollen der Vergleichs- und Ausgangsebene vertauscht wurden (Gundersen, 1986; Wanke, 1996). Pro Tier und Lokalisation wurden durchschnittlich $118 \pm 42 Q^-$ in durchschnittlich 57 ± 14 Disektoren gezählt.

Der stereologische Schätzwert für die Anzahl der Fettzellen pro Volumeneinheit Fettgewebe pro Lokalisation wurde anhand der Anzahl gezählter Q^- und des kumulativen Volumens der pro Lokalisation analysierten Disektoren über Gleichung 6 (Sterio, 1984) ermittelt:

Gleichung 6

$\hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})_s} = \frac{\sum_{i=1}^n Q^-(Z)i}{h^* \sum_{i=1}^n A_{(\text{Fettgewebe})i_s}}$	
$\hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})_s}$	Stereologischer Schätzwert für die numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe der jeweiligen Lokalisation; auf eingebettetes Gewebe bezogen
n	Anzahl der pro Lokalisation ausgewerteten Testfelder
$Q^-(Z)i$	Anzahl der gezählten $Q^-(Z)$ (Fettzellkernanschnittprofile) im Disektor i
h	Distanz zwischen Ausgangs- und Vergleichsebene (Disektorhöhe)
$A_{(\text{Fettgewebe})i_s}$	Durch das Testfeld definierte Fläche des Fettgewebes im Disektor i

Die für die Einbettungsschrumpfung korrigierte numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe wurde anhand Gleichung 7 berechnet:

Gleichung 7

$\hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})} = \hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})_s} \times f_s^3$	
$\hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})}$	Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der fixierten und entfetteten Fettzellen im Fettgewebe vor Einbettung in GMA-MMA
$\hat{N}_{V(\text{Fettzellen} / \text{Fettgewebe})_s}$	Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe bezogen auf eingebettetes Gewebe
f_s	Linearer Schrumpfungsfaktor

2.5.3. Bestimmung der mittleren Fettzellvolumina in den untersuchten Lokalisationen

Das mittlere Fettzellvolumen wurde für jede Lokalisation und jedes Tier anhand Gleichung 8 errechnet.

Gleichung 8

$\hat{v}_{(Fettzellen)} = \frac{1}{\hat{N}_{V(Fettzellen/Fettgewebe)}} \times V_{V(Fettzellen/Fettgewebe)}$	
$\hat{v}_{(Fettzellen)}$	Stereologisch geschätztes mittleres Volumen der Fettzellen der jeweils untersuchten Lokalisation
$V_{V(Fettzellen/Fettgewebe)}$	Stereologisch geschätzter Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe der jeweils untersuchten Lokalisation
$\hat{N}_{V(Fettzellen/Fettgewebe)}$	Stereologisch geschätzte numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe der jeweils untersuchten Lokalisation vor Einbettung in GMA-MMA

2.6. Statistische Tests

Die statistische Auswertung erfolgte mit Excel (Microsoft Office 2003), Graphpad Prism 5, Version 5.04 (Graphpad Software, San Diego, USA) und SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics 19). Die erhobenen Daten wurden mittels Friedmans Zweifach-Rangvarianzenanalyse und Kolmogorov-Smirnov mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors auf ihre Normalverteilung hin untersucht und mithilfe des Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben, des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verbundener Stichproben sowie der Spearman-Rho-Tests (Korrelation) ausgewertet (Sachs, 2004). Die Adjustierung des Signifikanzniveaus erfolgte bei Mehrfachvergleichen nach Bonferroni und Holm (Holm, 1979), wobei in den Graphen ausschließlich signifikante Unterschiede gekennzeichnet sind. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Graphen (Graphpad Prism 5) zeigen Mittelwerte, Standardabweichungen und Korrelationen.

IV. ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der Vorversuche

1.1. Entnahmetechnik und Probengewinnung

Das umbilikale Fettgewebe konnte vollständig entnommen werden. Das subkutane, omentale, mesenteriale, peripankreatische, perirenale und retrobulbäre Fettgewebe konnten aufgrund präparatorischer Schwierigkeiten nicht mit hinreichender Genauigkeit und unter Substanzerhalt voneinander getrennt, bzw. vollständig entnommen werden. Eine exakte Wägung des subkutanen, omentalen, mesenterialen, peripankreatischen und perirenen Fettgewebes war deshalb nicht möglich.

Um Probengrößen von 1 cm Kantenlänge zu erhalten, bewährte sich eine durchsichtige Testpunktrasterfolie mit 325 Testpunkten im Abstand von je 1 cm. Das Auflegen der Testpunktrasterfolie zur Durchführung einer systematisch zufälligen Probenentnahme war bei allen Proben mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes möglich. Bis auf die letztgenannte Ausnahme gelang es, fünf systematisch zufällige Proben aus jeder Lokalisation zu gewinnen (32 Proben pro Tier). Das retrobulbäre Fettgewebe beider Augen wurde aufgrund seines geringen Volumens soweit möglich im Ganzen entnommen.

1.2. Eignung verschiedener Einbettungsmedien wie Epoxidharz und GMA-MMA zur Durchführung des physikalischen Disektorverfahrens

Bei der Beurteilung der Prozessierungsschritte sowie des geeigneten Einbettungsmediums zur Durchführung der Disektor Methode standen die Anfertigung von Serienschnitten sowie die für das Überprojizieren mehrerer Testfeldflächen innerhalb einer Schnittfläche, Subsampling, erforderliche Schnittflächengröße im Vordergrund des Interesses.

1.3. Ergebnisse der GMA-MMA-Einbettung

Das Einbetten entfetteter Fettgewebeproben erforderte im Gegensatz zu den nicht entfetteten Proben keinen Einsatz von Gewichten, um das Aufschwimmen der Proben im Einbettungsgefäß zu verhindern. Die Herstellung von Serienschnitten gelang bei den entfetteten Fettgewebeproben mit deutlich weniger Zerreißen

und Artefakten (siehe Abbildung 10).

Die Hämtoxylin-Eosin-Färbung der entfetteten Proben ermöglichte die Identifizierung der Fettzellgrenzen, der Fettzellkerne und des umgebenden gefäßführenden Bindegewebes. Die nicht entfetteten Proben wiesen hinsichtlich der oben genannten Strukturen deutlich schlechtere Färbeergebnisse auf.

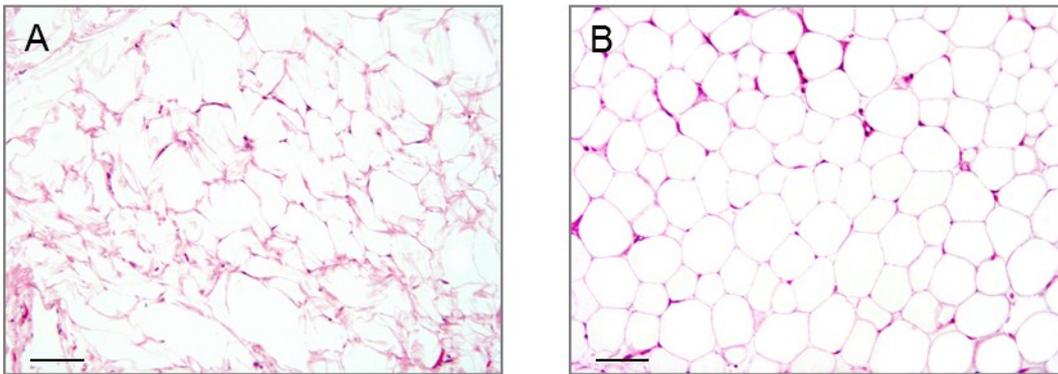


Abbildung 10: A: Nicht entfettetes omentales Fettgewebe, B: Entfettetes omentales Fettgewebe; GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin, Balken = 100 µm; das Schnittpräparat des nicht entfetteten Fettgewebes (A) zeigt deutlich mehr Zerreißen und Artefakte als das des entfetteten Fettgewebes (B).

Die im Institut routinemäßig durchgeführte GMA-MMA-Einbettung erlaubt eine Probenkantenlänge von bis zu 1 cm². Eine Schnittfläche der eingebetteten Probe von dieser Größe erlaubte bei einer 100fachen Vergrößerung die Durchführung eines systematisch zufälligen Subsamplings.

1.4. Ergebnisse der Epoxidharz-Einbettung

Bei einer Schnittflächengröße eines Semidünnschnittes von max. 4 mm² lagen ca. 60 Fettzellanschnittprofile in der Schnittfläche des Fettgewebes vor. Damit war das Überprojizieren mehrerer Testfeldflächen innerhalb einer Schnittfläche nicht möglich (siehe Abbildung 11).

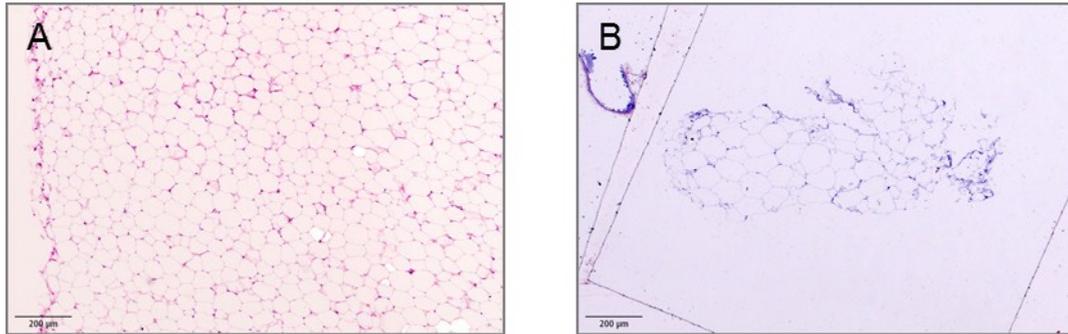


Abbildung 11: A: Omentales Fettgewebe in GMA-MMA eingebettet, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung; B: Omentales Fettgewebe in Epoxidharz eingebettet; Toluidinblau-Safranin-Färbung. Im GMA-MMA-Schnitt (A) liegen deutlich mehr Fettzellanschnittprofile vor als im Epoxidharz-Schnitt (B).

2. Ergebnisse der Hauptversuche

2.1. Tiere

Es wurden insgesamt 8 adulte männliche kastrierte Katzen untersucht, die maximal 48 Stunden vor der Sektion verstorben waren bzw. euthanasiert worden waren (Tabelle 8).

Kennzeichen und Hauptdiagnosen der Tiere

Rasse/Sektionshallennr.	Alter (J)	Körpergewicht (kg)	BCS	Todesart (E/T)	Hauptdiagnose
EKH S 9/11	18	5,7	8	E	Hyperplasie der lymphatischen Einrichtungen im Rachenraum mit Larynxstenose
EKH S 43/11	9	5,6	7	E	Malignes Lymphom (mehrere Organe betroffen)
EKH S 181/11	3	5,1	7	T	Restriktive Kardiomyopathie
EKH S 205/11	9	6	6	E	Dilatative Kardiomyopathie
EKH S 236/11	2,5	5,8	5	T	Kardiomyopathie
Main Coon S 252/11	1,5	6,9	5	T	Kardiomyopathie
EKH S 370/11	1	3,4	4	T	Embolisch-metastatisches Infektgeschehen
EKH S 534/11	6	3,6	3	T	Kardiomyopathie

Tabelle 8: Kennzeichen der untersuchten Tiere (n = 8) mit Angabe der Rasse, der Sektionshallennummer, des Alters in Jahren (J), des Körpergewichts (kg), des BCS (Body Condition Score) (1-9), der Rasse (EKH: Europäisch Kurzhaar Katze); der Todesart (E: Euthanasie; T: natürlicher Tod) und der Hauptdiagnosen.

Die männlichen kastrierten Katzen wurden entsprechend ihres Body Condition Scores in zwei Gruppen aufgeteilt (siehe Abbildung 12).

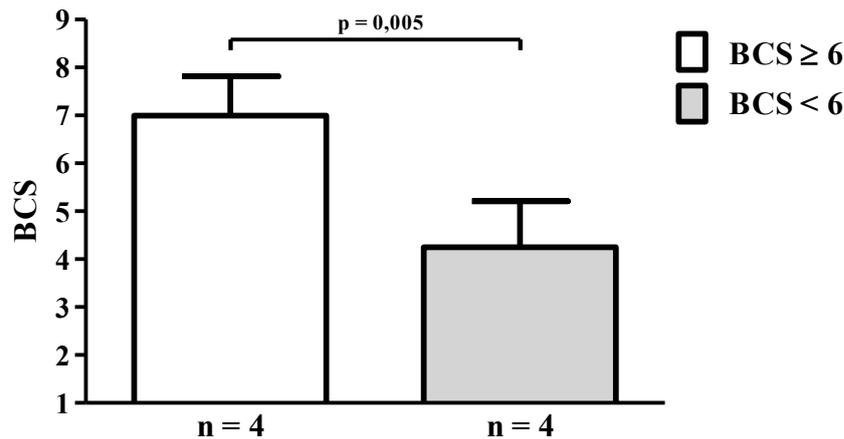


Abbildung 12: Body Condition Scores der untersuchten Tiergruppen mit einem BCS ≥ 6 und einem BCS < 6 , $n = 8$ ($n = 4$ /Gruppe), Mittelwerte \pm SD, zweiseitiger t-Test.

2.2. Makroskopische und histologische Befunde des Fettgewebes

Das Fettgewebe der jeweiligen Lokalisation wies makroskopisch bei allen untersuchten Tieren keine pathologischen Veränderungen auf.

Die Fettgewebeproben zeigten im histologischen Schnitt bei allen Tieren einen regelrechten Aufbau. Das histologische Schnittbild aller untersuchten Lokalisationen und jedes Tieres bestand aus reifen univakuolären Adipozyten, die von gefäßführendem Bindegewebe umgeben waren. Im intraindividuellen Vergleich erschienen subjektiv die subkutanen und umbilikalen Fettzellanschnittprofile deutlich größer als die omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebepots. Dies war insbesondere bei den Tieren mit einem BCS von ≥ 6 augenscheinlich.

Beim intraindividuellen Vergleich des gefäßführenden Bindegewebeanteils erschien dieser subjektiv im retrobulbären Fettgewebe deutlich größer im Vergleich zu den anderen untersuchten Lokalisationen.

Die omentalen, mesenterialen und peripankreatischen Fettgewebepots konnten im histologischen Schnittbild morphologisch nicht unterschieden werden.

In den sieben untersuchten Fettgewebelokalisationen der acht untersuchten männlichen kastrierten Katzen konnten keine histopathologischen Veränderungen, ins-

besondere keine höhergradigen Entzündungszellinfiltrate, keine Fettgewebenekrose oder neoplastischen Veränderungen verzeichnet werden.

2.3. Ergebnisse der Einbettungsschrumpfung der untersuchten Fettgewebeproben

Für den linearen Schrumpfungsfaktor (f_s) der GMA-MMA-Einbettung ergab sich ein Gesamtmittelwert von $f_s = 0,94 \pm 0,05$. Dieser Wert impliziert eine lineare Schrumpfung von 6% beziehungsweise einen Volumenschwund von 17% (siehe Abbildung 13).

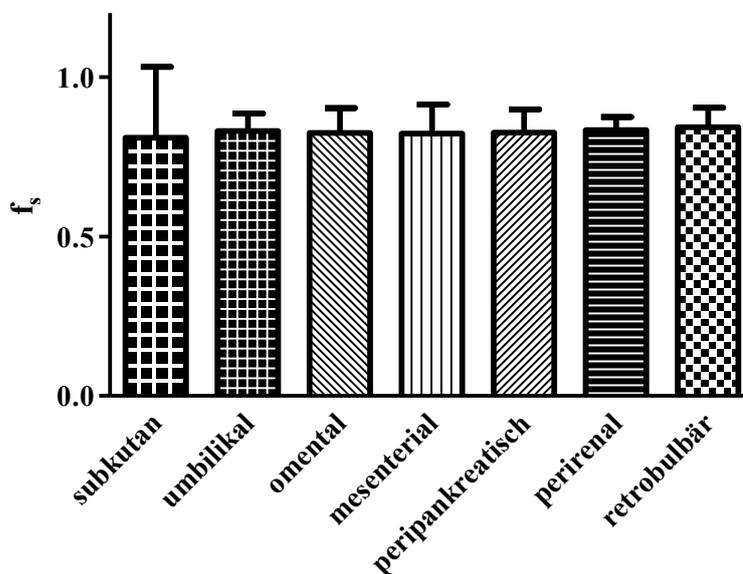


Abbildung 13: Einbettungsschrumpfung der sieben untersuchten Fettgewebedepots: subkutan ($n = 13$), umbilikal ($n = 12$), omental ($n = 9$), mesenterial ($n = 12$), peripankreatisch ($n = 11$), perirenal ($n = 11$), retrobulbär ($n = 13$), f_s = linearer Schrumpfungsfaktor, Mittelwerte \pm SD, zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest): die Mittelwerte der Einbettungsschrumpfung sämtlicher untersuchter Fettgewebedepots lagen alle in der gleichen Größenordnung; bei Vergleich der durchschnittlichen Einbettungsschrumpfung des Fettgewebes der jeweiligen Lokalisation nach Einbettung in GMA-MMA lag, nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm, kein signifikanter Unterschied vor.

Da zwischen den Tieren und den sieben untersuchten Lokalisationen keine Unterschiede bezüglich der Einbettungsschrumpfung zu zeigen waren, wurde der Durchschnittswert $f_s = 0,94$ einheitlich zur Korrektur der an den seriellen GMA-MMA-Schnitten erhobenen stereologischen Daten verwendet.

2.4. Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelocalisationen

Die durchschnittliche Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe, d.h. der Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe, aller untersuchten Lokalisationen und Tiere betrug 96%. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen Tieren festgestellt werden.

Das retrobulbäre Fettgewebe besaß bei allen Tieren mit durchschnittlich 0,91% im Vergleich mit den anderen untersuchten Lokalisationen die geringste Volumendichte (Abbildung 14). Subkutanes Fettgewebe enthielt eine 5 % höhere Volumendichte als das retrobulbäre Fettgewebe. Das umbilikale Fettgewebe besaß gemeinsam mit dem omentalen Fettgewebe eine 8% höhere Volumendichte als das retrobulbäre Fettgewebe. Zwischen dem peripankreatischen und dem retrobulbären Fettgewebe belief sich der Unterschied auf 6%. Signifikante Unterschiede in der Volumendichte bestanden zwischen dem subkutanen und dem retrobulbären, dem umbilikalen und dem retrobulbären, dem omentalen und dem retrobulbären sowie zwischen dem peripankreatischen und dem retrobulbären Fettgewebe (siehe Abbildung 15).

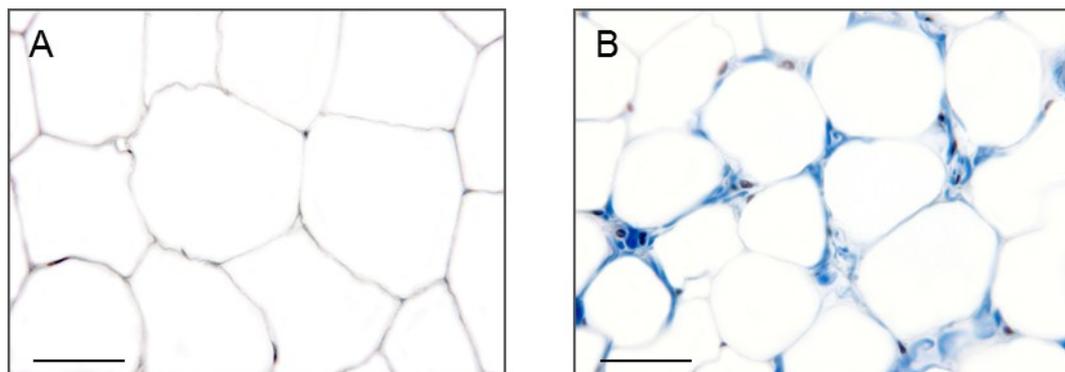


Abbildung 14: Vergleich der Histologie des umbilikalen und retrobulbären Fettgewebes einer männlichen kastrierten Katze in der Masson-Trichrom-Färbung. A: Umbilikales Fettgewebe mit durchschnittlicher $V_{V(FZ/FG)}$ von $0,99 \pm 0,007$; B: Retrobulbäres Fettgewebe mit durchschnittlicher $V_{V(FZ/FG)}$ von $0,91 \pm 0,04$. Das retrobulbäre Fettgewebe enthält einen höheren Bindegewebeanteil als das umbilikale Fettgewebe; Paraffin, Masson-Trichrom, Balken = 50 μm .

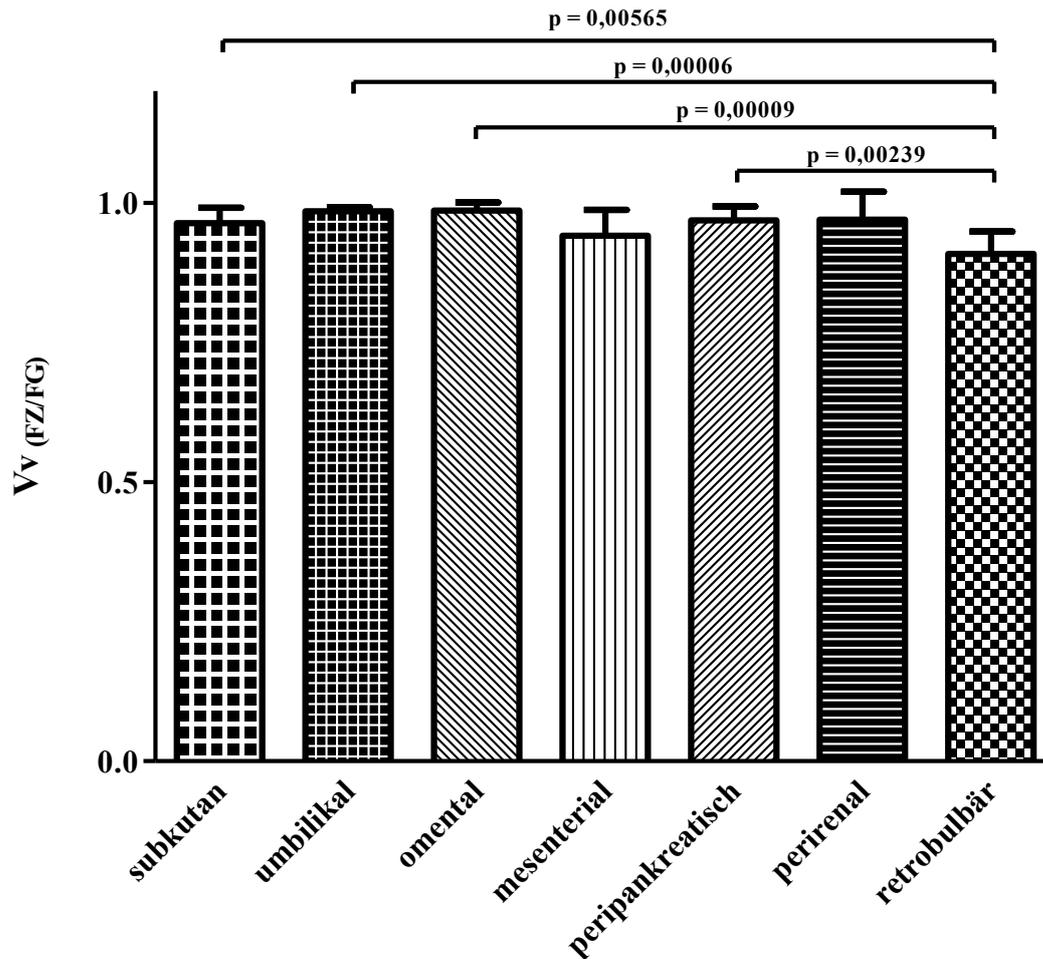


Abbildung 15: Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe ($V_v(FZ/FG)$) in den sieben untersuchten Fettgewebelokalisationen, $n = 8$ Tiere/Lokalisation, Mittelwerte \pm SD, $p =$ absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm); zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.5. Numerische Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelokalisationen

Die numerische Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe, Anzahl der Fettzellen pro Volumen Fettgewebe, der acht untersuchten adulten männlichen kastrierten Katzen betrug in den sieben definierten Lokalisationen (subkutan, umbilikal, omental, mesenterial, peripankreatisch, perirenal und retrobulbär) durchschnittlich $13 \times 10^{-6}/\mu\text{m}^3 \pm 7 \times 10^{-6}/\mu\text{m}^3$ bzw. $13 \times 10^3/\text{mm}^3 \pm 7 \times 10^3/\text{mm}^3$ Fettzellen/Fettgewebe (siehe Abbildung 16). Veranschaulicht bedeutet dies, dass in einem Fettgewebewürfel mit einer Kantenlänge von 1 mm $13 \times 10^3 \pm 7 \times 10^3$ Fettzellen vorliegen.

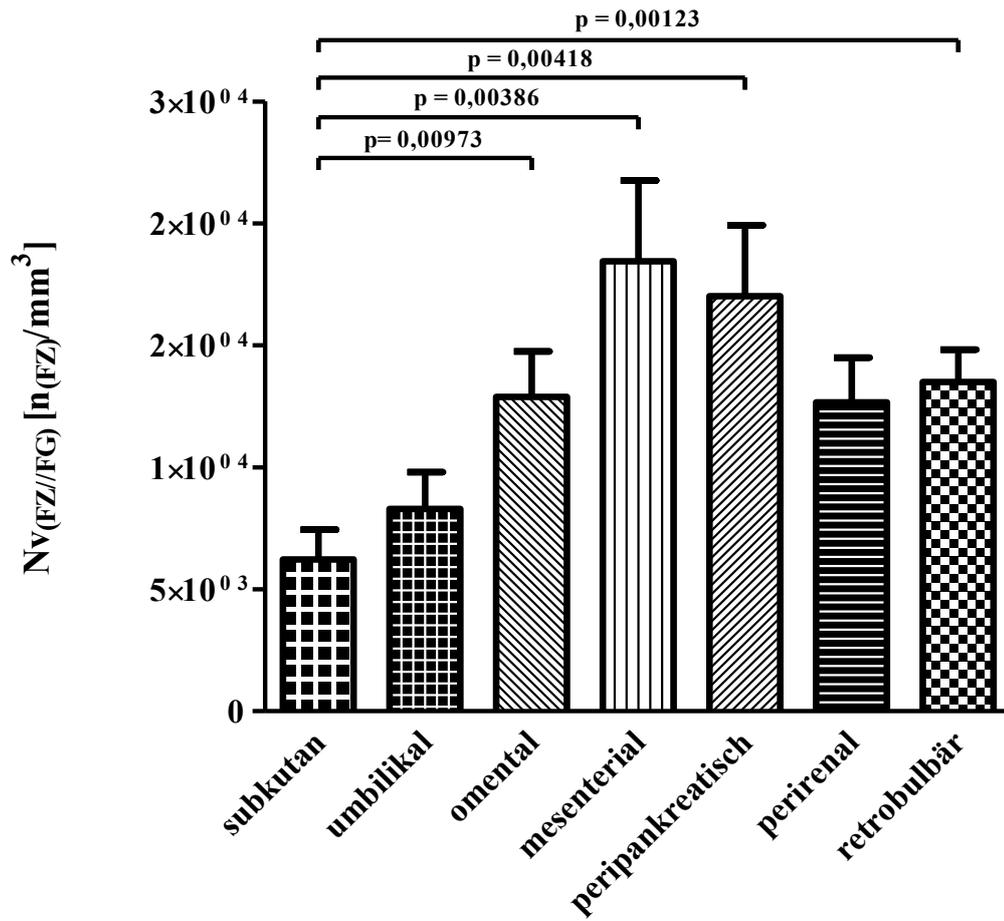


Abbildung 16: Numerische Volumendichte $N_{V(FZ/FG)}$ ($n_{(FZ)}/\text{mm}^3$) der Fettzellen im Fettgewebe, $n = 8$ Tiere/Lokalisation, Mittelwerte \pm SD, $p =$ absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm); zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.6. Mittlere Fettzellvolumina der untersuchten Fettgewebelokalisationen aller untersuchten Tiere

Das durchschnittliche mittlere Fettzellvolumen ($\hat{v}_{(Fettzellen)}$) in den sieben untersuchten Lokalisationen (subkutan, umbilikal, omental, mesenterial, peripankreatisch, perirenal und retrobulbär) der acht adulten männlichen kastrierten Katzen betrug $106 \times 10^3 \mu\text{m}^3 \pm 47 \times 10^3 \mu\text{m}^3$. In Abbildung 17 sind die mittleren Fettzellvolumina sämtlicher untersuchter Fettgewebedepots aller untersuchten Tiere dargestellt.

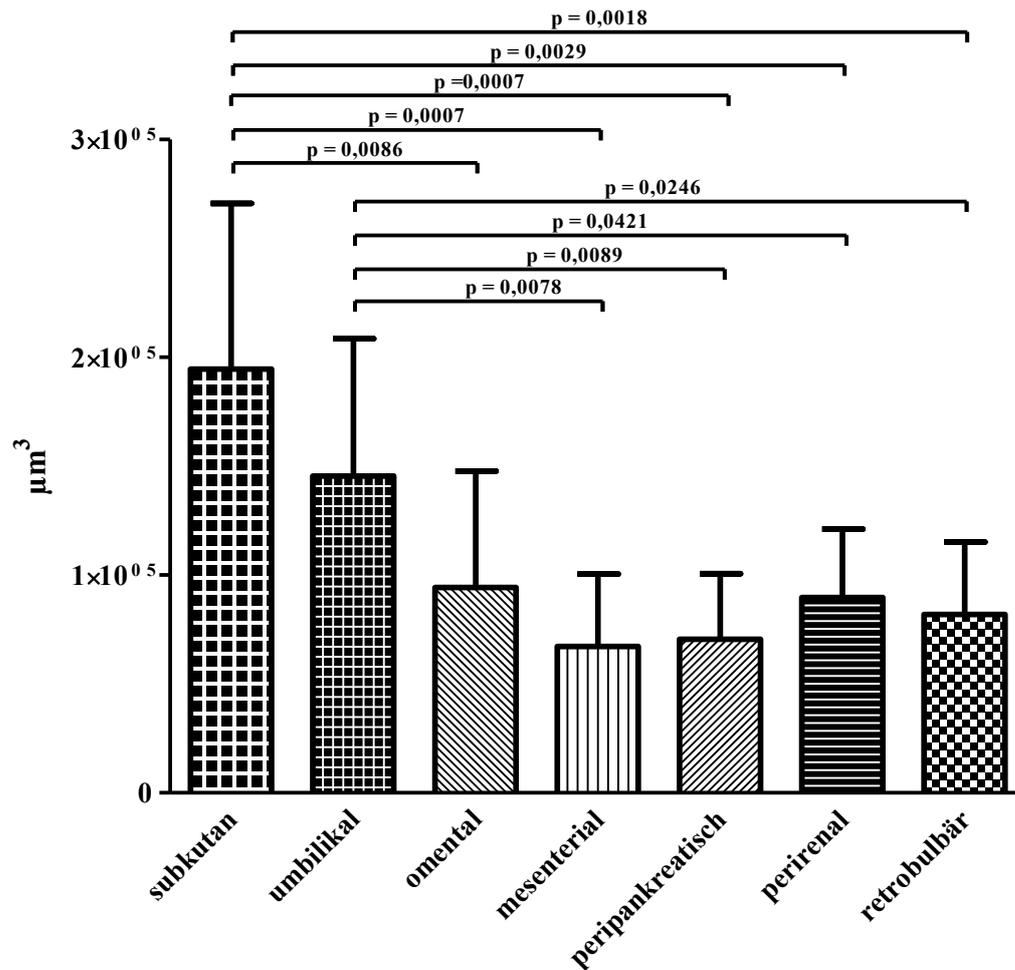


Abbildung 17: Mittlere Fetzellvolumina ($\hat{V}_{(\text{Fetzellen})}$) in den sieben untersuchten Lokalisationen, $n = 8$ Tiere/Lokalisation, Mittelwerte \pm SD, $p =$ absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm); zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

Die mittleren Fetzellvolumina im subkutanen Fettgewebe waren signifikant größer als im omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenenalen und retrobulbären Fettgewebe. Die mittleren Fetzellvolumina im umbilikalen Fettgewebe war signifikant größer als im mesenterialen, peripankreatischen, perirenenalen und retrobulbären Fettgewebe.

Die umbilikalen Fettzellen wiesen durchschnittlich 25% kleinere mittlere Fetzellvolumina auf als die subkutanen Fettzellen. Die omentalen Fettzellen besaßen durchschnittlich 52% kleinere mittlere Fetzellvolumina auf als die subkutanen Fettzellen und 35% kleinere mittlere Fetzellvolumina als die umbilikalen Fettzel-

len. Die mesenterialen Fettzellen wiesen durchschnittlich 65% geringere Werte als die subkutanen und 54% geringere Werte als die umbilikalen Fettzellen auf. Die mittleren Fettzellvolumina des peripankreatischen Fettgewebes waren durchschnittlich 64% kleiner als die mittleren Fettzellvolumina des subkutanen Fettgewebes und 51 % kleiner als die umbilikalen mittleren Fettzellvolumina. Die perirenal Fettzellen wiesen durchschnittlich 54% kleinere Werte als die subkutanen und 38% kleinere Werte als die umbilikalen Fettzellen auf. Die retrobulbären Fettzellen wiesen durchschnittlich 58% kleinere Werte als die subkutanen und 44% kleinere Werte als die umbilikalen Fettzellen auf.

Abbildung 18 zeigt die durchschnittlichen mittleren Fettzellvolumina der untersuchten Fettgewebedepots der Einzeltiere auf.

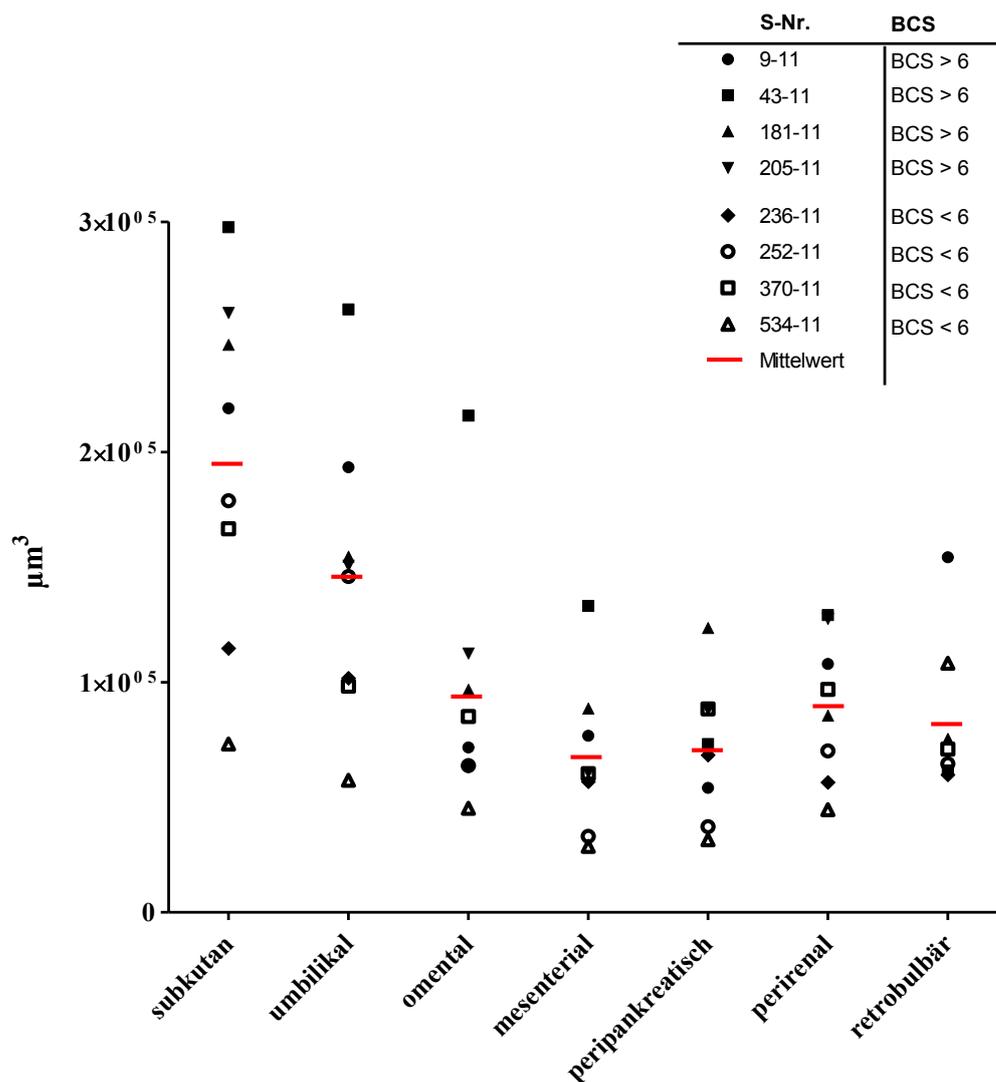


Abbildung 18: Mittlere Fettzellvolumina ($\hat{v}_{\text{Fettzellen}}$) der untersuchten Tiere ($n = 8$) mit Angabe der Sektionshallennummer (S-Nr.) und des BCS in den untersuchten Fettgewebepots.

2.7. Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger und adipöser Tiere in den untersuchten Fettgewebelokalisationen

Die mittleren Fettzellvolumina aller untersuchten Lokalisationen wiesen bei den untersuchten Katzen mit einem $\text{BCS} \geq 6$ höhere Werte auf als bei den Tieren mit einem $\text{BCS} < 6$ (siehe IV.2.7.1 bis IV.2.7.7).

Die mittleren Fettzellvolumina der untersuchten adulten männlichen kastrierten Katzen mit einem $\text{BCS} < 6$ wiesen im subkutanen Fettgewebe signifikant höhere Werte als im mesenterialen und als im peripankreatischen Fettgewebe auf (siehe

Abbildung 19).

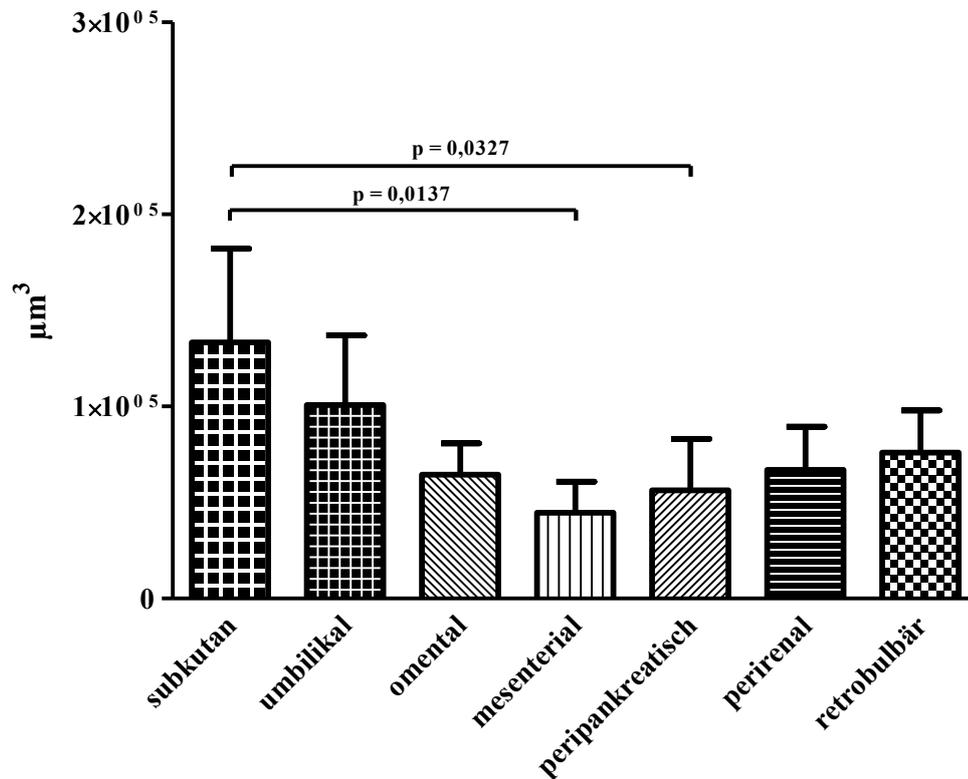


Abbildung 19: Mittlere Fettzellvolumina der kastrierten Katzen (n = 4 Tiere/Lokalisation) mit einem BCS < 6 in den sieben untersuchten Lokalisationen (subkutan, umbilikal, omental, mesenterial, peripankreatisch, perirenal und retrobulbär), Mittelwerte ± SD, p = absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm), zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

Die mittleren Fettzellvolumina der untersuchten adulten männlichen kastrierten Katzen mit einem BCS ≥ 6 wiesen im subkutanen Fettgewebe signifikant höhere Werte als im omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenal und retrobulbären Fettgewebe auf. Die mittleren Fettzellvolumina der Katzen mit einem BCS ≥ 6 wiesen im umbilikalen Fettgewebe signifikant höhere Werte als im peripankreatischen und retrobulbären Fettgewebe auf (siehe Abbildung 20).

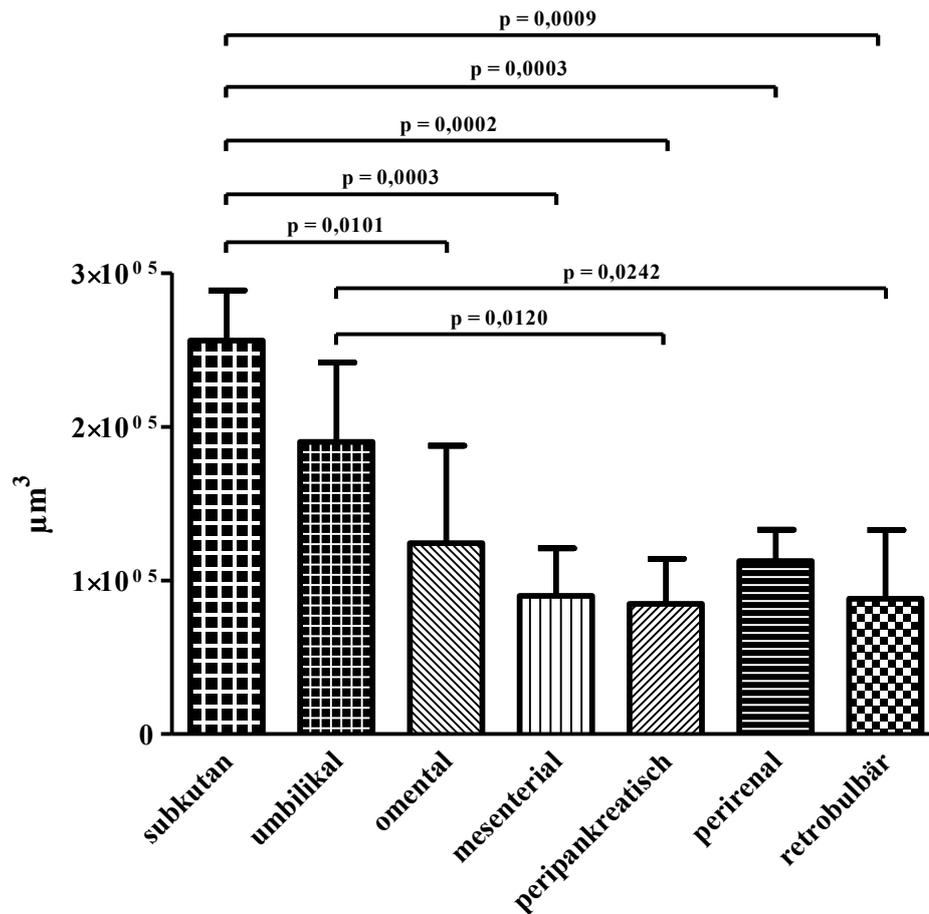
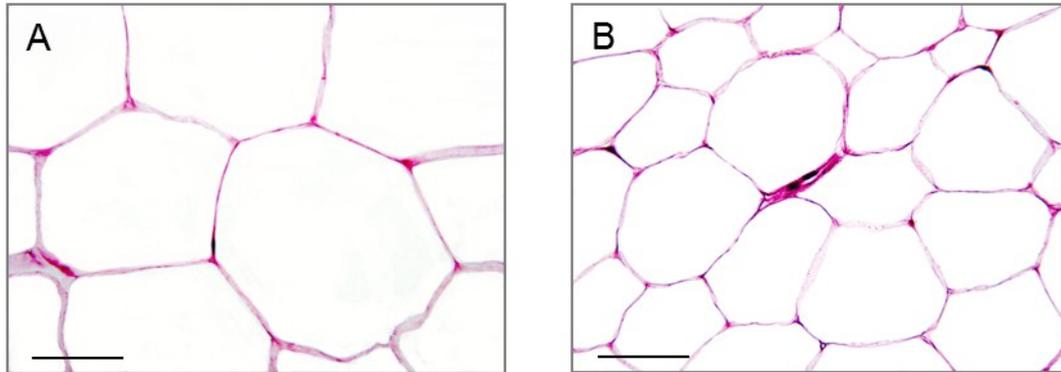


Abbildung 20: Mittlere Fettzellvolumina der kastrierten Katzen ($n = 4$ Tiere/Lokalisation) mit einem BCS ≥ 6 in den sieben untersuchten Lokalisationen (subkutan, umbilikal, omental, mesenterial, peripankreatisch, perirenal und retrobulbär), Mittelwerte \pm SD, p = absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm), zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.7.1. Subkutanes Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des subkutanen Fettgewebes fettleibiger Tiere war durchschnittlich um 92% größer als das mittlere Fettzellvolumen des subkutanen Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 21).

I.



II.

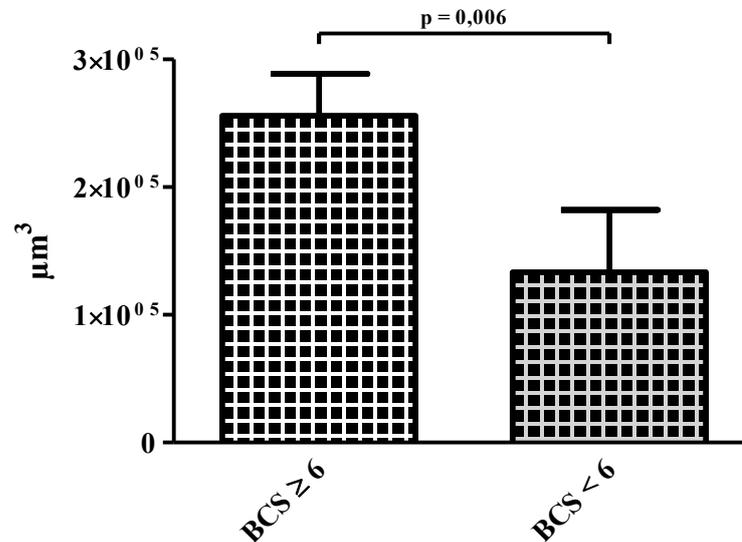


Abbildung 21: Subkutanes Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

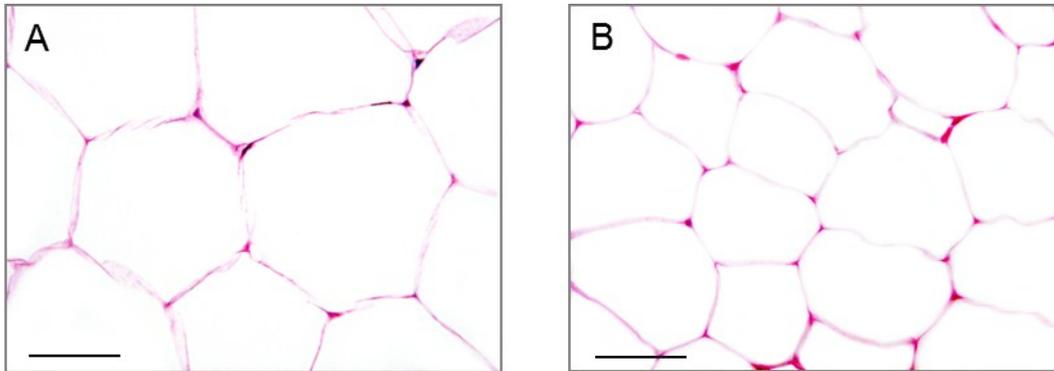
I. Repräsentative Aufnahmen subkutaner Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittlere Fettzellvolumina subkutanen Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; $p =$ absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm), zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.7.2. Umbilikales Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des umbilikalen Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 87% größer als das mittlere Fettzellvolumen des umbilikalen Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 22).

I.



II.

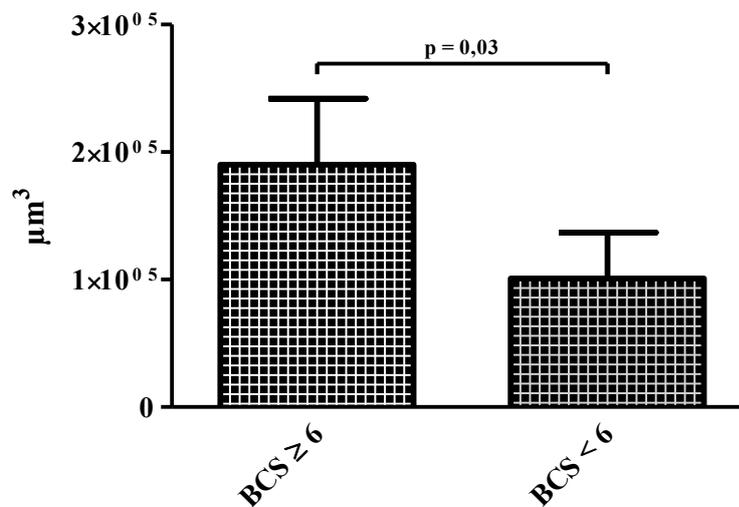


Abbildung 22: Umbilikales Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

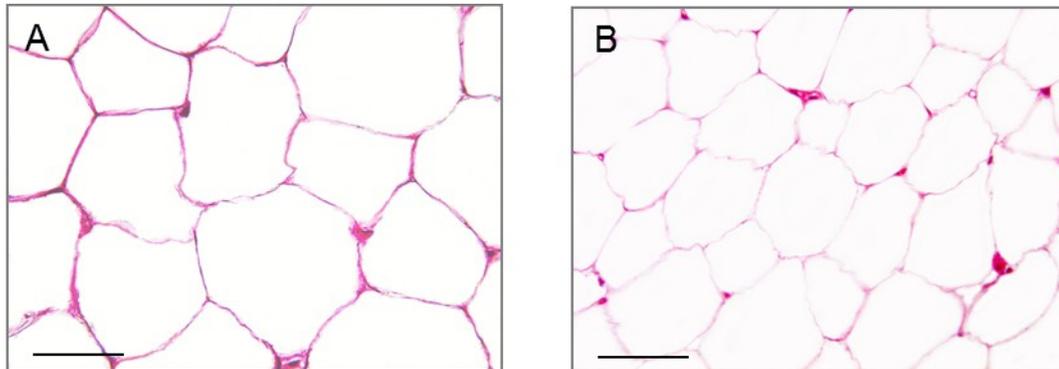
I. Repräsentative Aufnahmen umbilikaler Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittlere Fettzellvolumina umbilikalen Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; p = absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm); zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.7.3. Omentales Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des omentalen Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 93% größer als das mittlere Fettzellvolumen des omentalen Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 23).

I.



II.

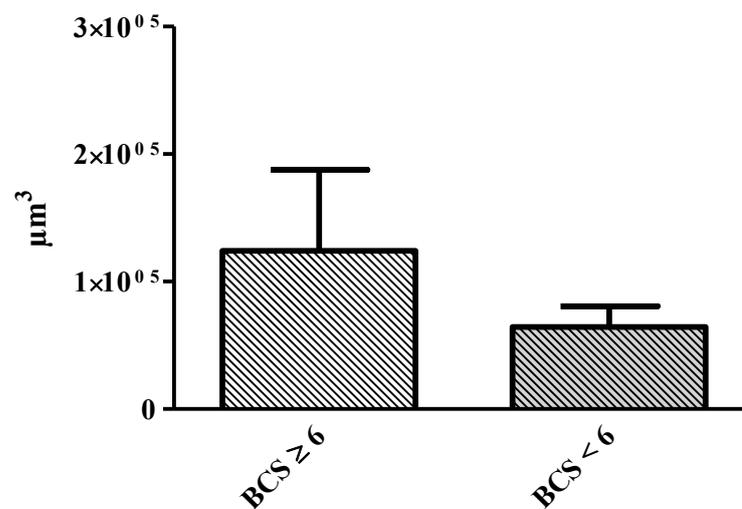


Abbildung 23: Omentales Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

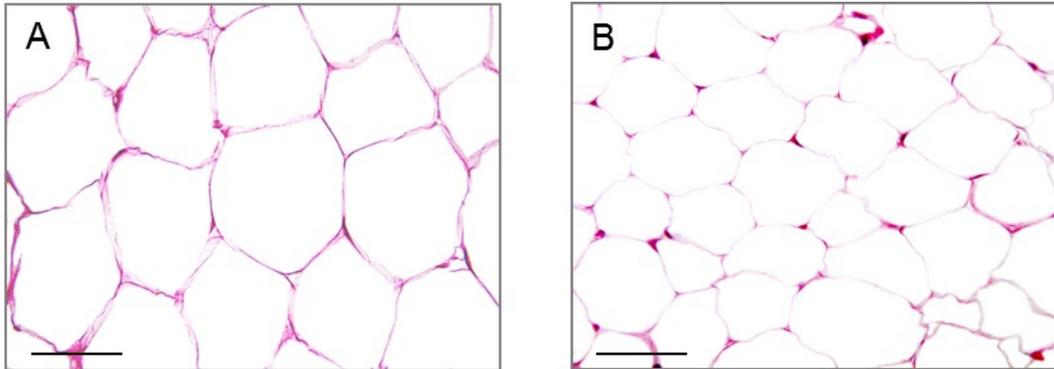
I. Repräsentative Aufnahmen omentaler Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittlere Fettzellvolumina omentalen Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest): bei Vergleich der Mittelwerte der mittleren Fettzellvolumina des omentalen Fettgewebes normalgewichtiger und adipöser Tiere lag, nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm, kein signifikanter Unterschied vor.

2.7.4. Mesenteriales Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des mesenterialen Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 100% größer als das mittlere Fettzellvolumen des mesenterialen Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 24).

I.



II.

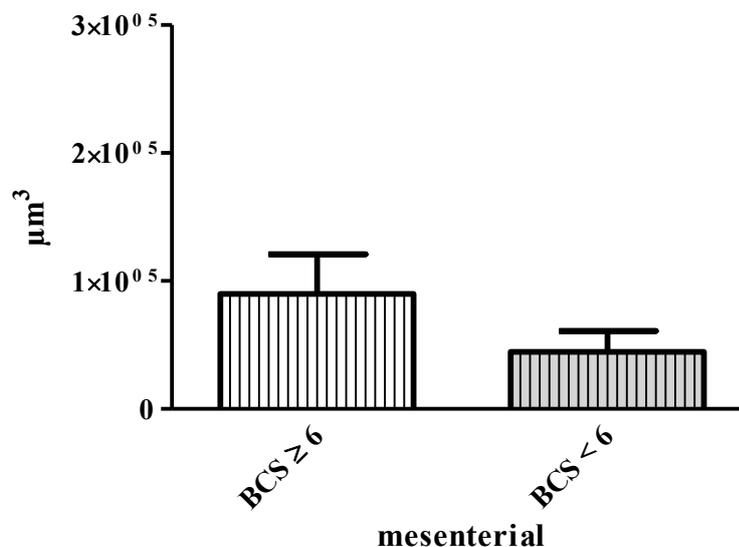


Abbildung 24: Mesenteriales Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

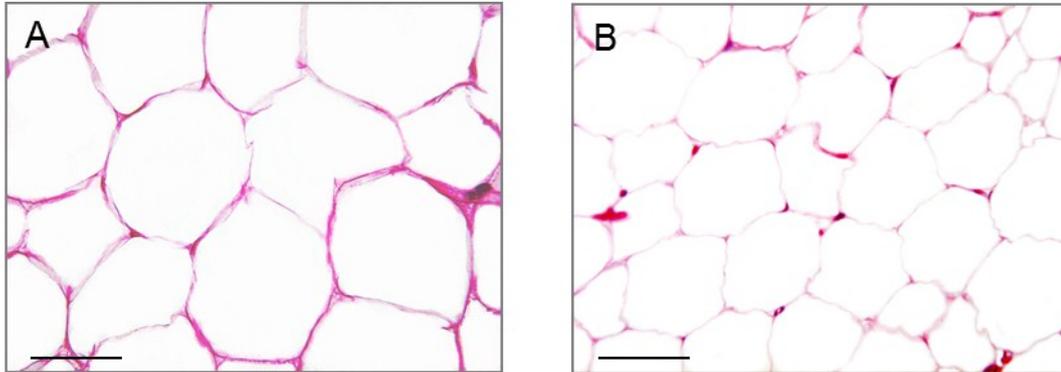
I. Repräsentative Aufnahmen mesenterialer Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittlere Fettzellvolumina mesenterialen Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest): bei Vergleich der Mittelwerte der mittleren Fettzellvolumina des mesenterialen Fettgewebes normalgewichtiger und adipöser Tiere lag, nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm, kein signifikanter Unterschied vor.

2.7.5. Peripankreatisches Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des peripankreatischen Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 50% größer als das mittlere Fettzellvolumen des peripankreatischen Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 25)

I.



II.

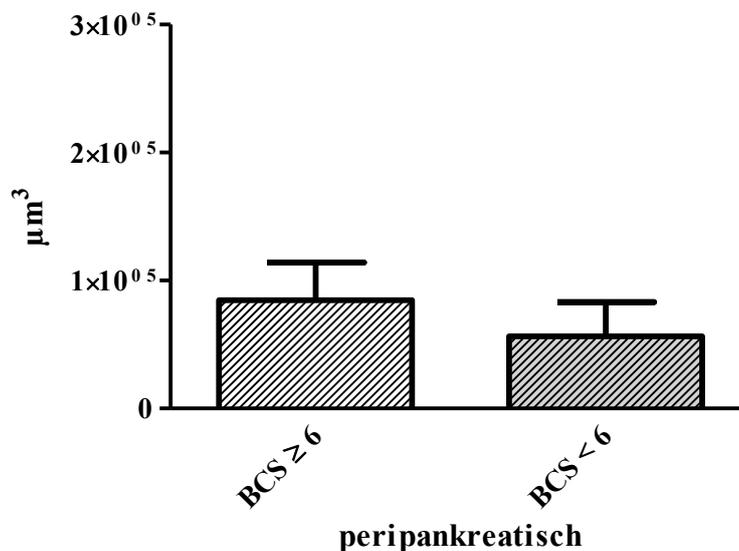


Abbildung 25: Peripankreatisches Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

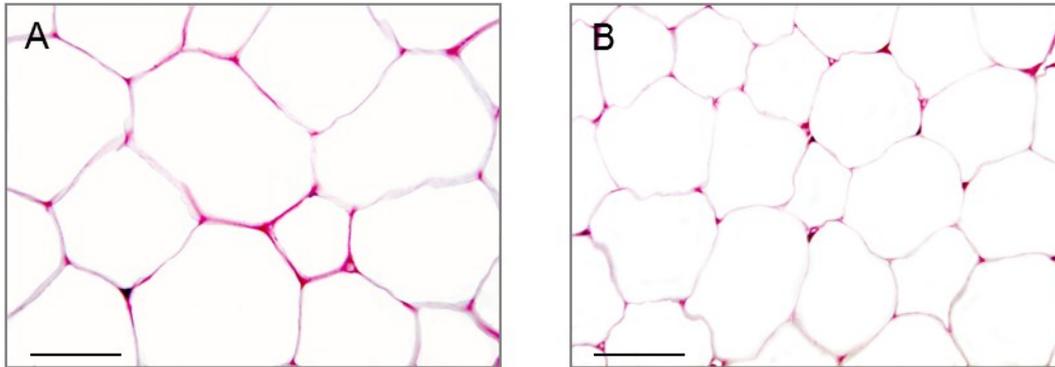
I. Repräsentative Aufnahmen peripankreatischer Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittlere Fettzellvolumina peripankreatischen Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest): bei Vergleich der Mittelwerte der mittleren Fettzellvolumina des peripankreatischen Fettgewebes normalgewichtiger und adipöser Tiere lag, nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm, kein signifikanter Unterschied vor.

2.7.6. Perirenales Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des perirenal Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 68% größer als das mittlere Fettzellvolumen des perirenal Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 26).

I.



II.

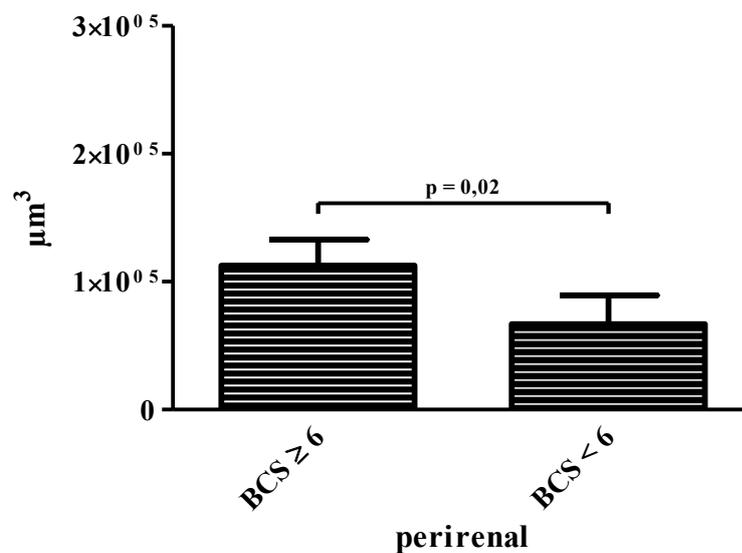


Abbildung 26: Perirenales Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

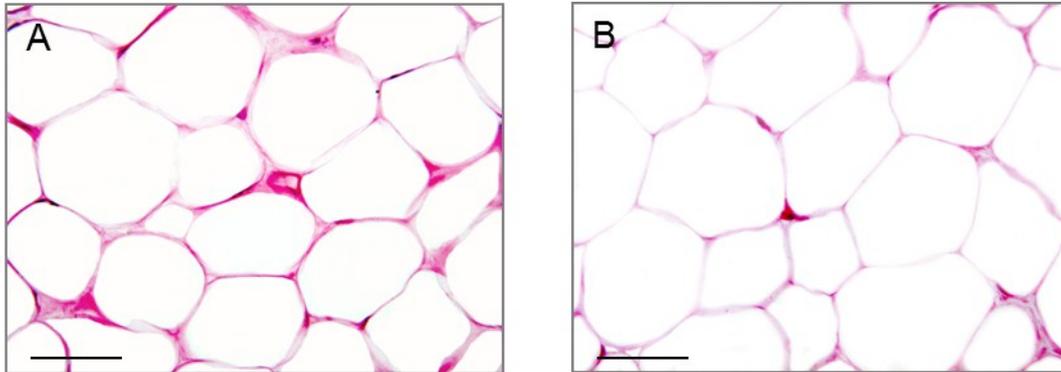
II. Repräsentative Aufnahmen perirenal Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

I. Mittleres Fettzellvolumen perirenal Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; $p =$ absolute Signifikanz (Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm); zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest).

2.7.7. Retrobulbäres Fettgewebe

Das mittlere Fettzellvolumen des retrobulbären Fettgewebes fettleibiger Tiere war um 16% größer als das mittlere Fettzellvolumen des retrobulbären Fettgewebes normalgewichtiger Tiere (siehe Abbildung 27).

I.



II.

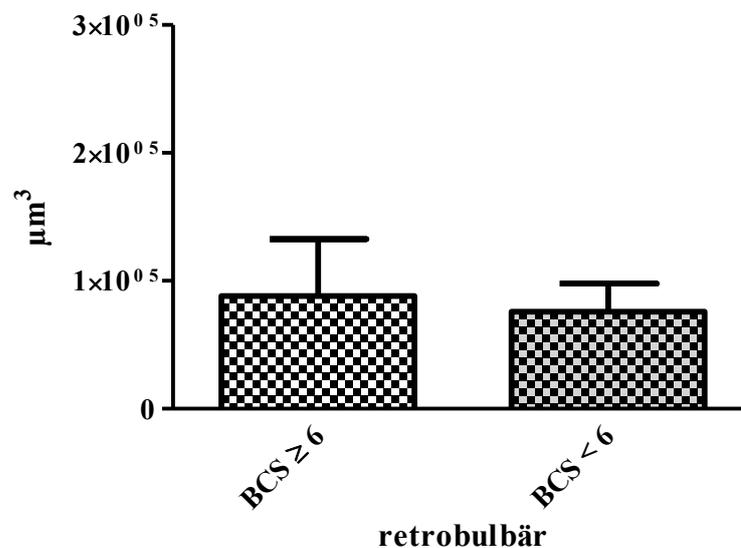


Abbildung 27: Retrobulbäres Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Tiere.

I. Repräsentative Aufnahmen retrobulbärer Fettzellanschnittprofile einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS ≥ 6 (A) und einer adulten männlichen kastrierten Katze mit einem BCS < 6 (B), GMA-MMA, Hämatoxylin-Eosin-Phloxin, Balken = 50 μm .

II. Mittleres Fettzellvolumen retrobulbären Fettgewebes bei Tieren ($n = 4$) mit einem BCS ≥ 6 und Tieren ($n = 4$) mit einem BCS < 6 ; Mittelwerte \pm SD; zweiseitiger t-Test für abhängige Variablen (Paarvergleichstest): bei Vergleich der Mittelwerte der mittleren Fettzellvolumina des retrobulbären Fettgewebes normalgewichtiger und adipöser Tiere lag, nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni und Holm, kein signifikanter Unterschied vor.

2.8. Korrelation des mittleren Fettzellvolumens mit dem BCS in der jeweiligen Fettgewebelokalisation

Es lag ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Body Condition Score und dem mittleren Fettzellvolumen des subkutanen, umbilikalen und mesenterialen Fettgewebes vor. Der Korrelationskoeffizient für das subkutane Fettzellvolumen in Zusammenhang mit dem BCS betrug 0,77, für das umbilikale 0,95 und für das mesenteriale 0,84.

Die Steigung (m) der Regressionsgeraden des subkutanen mittleren Fettzellvolumens in Zusammenhang mit dem BCS betrug $36 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$, die des umbilikalen $33 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$, die des omentalen $15 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$, die des mesenterialen Fettzellvolumens $14 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$, die des peripankreatischen $7 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$, die des perirenal $12 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$ und die des retrobulbären $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{BCS}$. Die Steigung der Regressionsgeraden des subkutanen und des umbilikalen Fettgewebes war im Vergleich zu den anderen untersuchten Lokalisationen am steilsten, d.h. in diesen Lokalisationen war der Anstieg der mittleren Fettzellvolumina mit zunehmendem BCS am größten. In den retrobulbären und peripankreatischen Fettgewebedepots nahmen die mittleren Fettzellvolumina bei steigendem BCS am geringsten zu (siehe Abbildung 28).

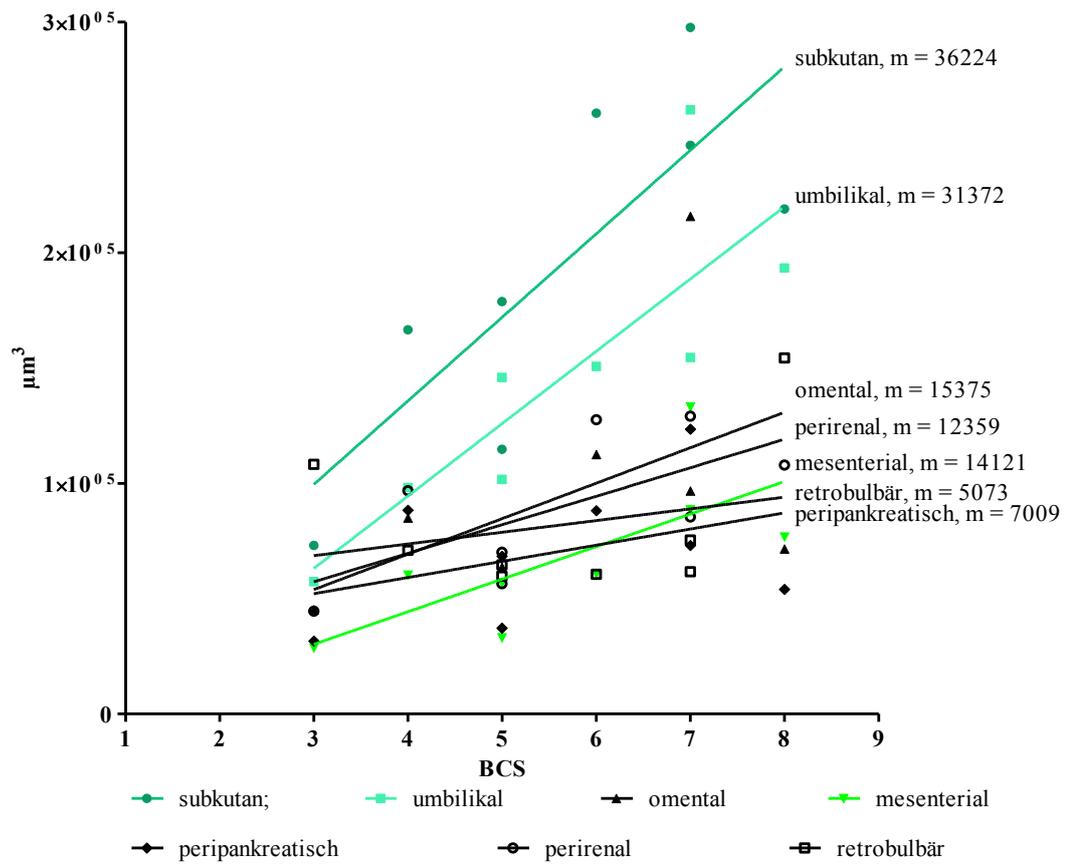


Abbildung 28: Korrelation von den mittleren Fettzellvolumina mit dem BCS in den jeweiligen Fettgewebedepots mit entsprechender Regressiongerade; m = Steigung der Regressiongeraden.

V. DISKUSSION

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Hauskatzen in westlichen Haushalten beträgt ca. 30 % (Scarlett und Donoghue, 1998; Lund et al., 2005; Colliard et al., 2009), wobei insbesondere männliche kastrierte Wohnungskatzen betroffen sind (Lund et al., 2005). Ebenso wie beim Menschen, treten auch bei der Katze fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämien und kardiorespiratorische Erkrankungen auf (Scarlett und Donoghue, 1998; German, 2006; Colliard et al., 2009). Fettzellen verschiedener Lokalisationen des Körpers weisen (siehe II.4 und II.8) bei Katzen wie bei Menschen unterschiedliche Größen auf (Occhipinti, 1936). Die adipozytäre Hypertrophie subkutanen und viszeralen abdominalen Fettgewebes beim Menschen wird als Prädisposition für das Auftreten von Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II postuliert (Hoffstedt et al., 2010).

Ziel dieser Arbeit war es, mittlere Fettzellvolumina der subkutanen, umbilikalen, omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettzellen bei normal- und übergewichtigen bzw. adipösen männlichen kastrierten Katzen mittels quantitativ stereologischer Analysen zu bestimmen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Fettzellen des subkutanen und umbilikalen Fettgewebes normalgewichtiger und übergewichtiger bzw. adipöser Katzen signifikant größere Volumina aufwiesen als die des omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebes. Die Fettzellvolumina übergewichtiger bzw. adipöser Katzen waren in allen untersuchten Lokalisationen signifikant größer als die der normalgewichtigen Katzen. Des Weiteren korrelierten die mittleren Fettzellvolumina der subkutanen, umbilikalen und mesenterialen Fettgewebe signifikant mit dem Body Condition Score. Die Steigung der Regressionsgeraden des subkutanen und des umbilikalen Fettgewebes war im Vergleich zu den anderen untersuchten Lokalisationen am steilsten, d.h. in diesen Lokalisationen war der Anstieg der mittleren Fettzellvolumina mit zunehmendem BCS am größten.

1. Probengewinnung und Prozessierung

Um die Repräsentativität der Stichproben zu gewährleisten, wurden fünf Fettgewebeproben pro Lokalisation, mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes, mittels systematisch zufälligen Auswahlverfahrens gewonnen. Eine vollständige Entnahme sämtlicher untersuchter Fettgewebedepots aus dem Tierkörper konnte aufgrund präparatorischer Schwierigkeiten nicht durchgeführt werden, weshalb eine Wägung zur Ermittlung des Gesamtgewichts bzw. Volumens des Fettgewebes in den untersuchten Lokalisationen nicht möglich war. Somit konnte die Anzahl der Fettzellen im jeweiligen Fettgewebedepot nicht bestimmt werden.

Um eine Stabilisierung der Proben beim Zuschnitt zu gewährleisten, wurden die fixierten und entfetteten Fettgewebeproben in Agar eingebettet. Die Einbettung in mit schwarzer Tusche eingefärbtem Agar war zudem Voraussetzung für die Bestimmung der Volumenschrumpfung von Fettgewebe der untersuchten Lokalisationen. Die Kontrastierung ermöglichte eine deutliche Abgrenzung des Fettgewebes zur linearen Schnittflächenbestimmung der fixierten und entfetteten Proben vor und nach Einbettung in GMA-MMA. Das Entfetten des Fettgewebes vor der Einbettung in GMA-MMA führte zu einer Reduzierung der Schnitt- und Zerreiβungsartefakte bei der Herstellung serieller GMA-MMA-Schnitte. Die im Institut eingesetzten Ausgussformen für die GMA-MMA-Einbettung erlaubten eine Schnittkantenlänge der einzubettenden Fettgewebeprobe von bis zu 1 cm. Die Fettgewebeschnitte mit einer Fläche von bis zu 1 cm^2 enthielten ausreichend viele Fettzellanschnittprofile, um bei 100-facher Vergrößerung innerhalb eines Schnittes mehrere Disektor-Testfeldflächen von durchschnittlich $106 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ auf das histologische Schnittbild zu projizieren. Die Software newCAST™ wählte aus diesen projizierten Feldern Testfelder für die systematisch zufällige Untersuchung aus (Subsampling). Die im Institut eingesetzten Einbettungskapseln für Epoxidharz hingegen erlaubten maximal eine Fettgewebeprobekantenlänge von 2 mm. Fettgewebeschnittflächen von maximal 4 mm^2 enthielten zu wenige Fettzellenanschnittprofile, um ein Subsampling durchzuführen. Der daraus resultierende Arbeits- und Materialaufwand hätte die im Vergleich zu GMA-MMA geringere Einbettungsschrumpfung in Epoxidharz (Wanke, 1996) nicht gerechtfertigt, da die Volumenschrumpfung der Fettgewebeproben auch in GMA-MMA gleichmäßig und gering war und somit eine einheitliche Korrektur der stereologischen Daten

erlaubte (Wanke, 1996).

2. Fettgewebeschrumpfung bei Einbettung in GMA-MMA

Die Einbettungsschrumpfung der fixierten und entfetteten Fettgewebeproben aus den sieben untersuchten Lokalisationen wurde bestimmt und diente zur Korrektur der ermittelten numerischen Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe und der mittleren Fettzellvolumina. Es bestand kein Unterschied in der Gewebeschrumpfung zwischen Fettzellen unterschiedlicher Lokalisationen, d.h. das mittlere Volumen der Fettzellen hatte keinen Einfluss auf die Fettgewebeschrumpfung in GMA-MMA eingebetteter fixierter und entfetteter Proben, weshalb eine einheitliche Schrumpfungskorrektur der ermittelten stereologischen Daten möglich war. Die Schrumpfung des Gewebes durch Paraformaldehyd und die Schrumpfung durch Entfetten mit Xylol und Alkohol wurden nicht berücksichtigt, daher beziehen sich die ermittelten Fettzellvolumina auf fixiertes und entfettetes Material. Die Schrumpfung durch Paraformaldehyd konnte nicht ermittelt werden, da eine Schnittflächenbestimmung an frischem Fettgewebe aufgrund der Texturbeschaffenheit von Fettgewebe nicht durchführbar war. Wegen der Prozessierungsschwierigkeiten bei der Einbettung nicht entfetteten Fettgewebes (Aufschwimmen der Proben und hochgradige Zerreißungsartefakte) konnte die durch Entfetten der Fettgewebeproben entstehende Gewebeschrumpfung ebenfalls nicht bestimmt werden.

3. Experimentelles Design und Methodik

3.1. Untersuchtes Tierkollektiv

Die Auswahl der untersuchten Tiere wurde entsprechend der Häufigkeit des Vorkommens von Übergewicht und Adipositas in der Hauskatzenpopulation gewählt. Etwas 40-50% der übergewichtigen und adipösen Hauskatzen sind adult, männlich und kastriert (Lund et al., 2005; Kienzle und Moik, 2011). Daher wurden vier normalgewichtige und vier übergewichtige/adipöse adulte, männliche, kastrierte Katzen untersucht. Um keine Tiere mit einer chronisch auszehrenden Erkrankung zu untersuchen, wurden kachektische und stark untergewichtige Tiere mit einem BCS von 1 oder 2 von dieser Studie ausgeschlossen.

3.2. Verwendung des Body Condition Scores zur Beurteilung des Ernährungsgrades

Die Bestimmung des Body Condition Scores ermöglichte die Einteilung der untersuchten adulten, männlichen, kastrierten Katzen in normalgewichtige und übergewichtige bzw. adipöse Tiere. Bei Anwendung der 9-Punkte-Skala entspricht ein Score von 5 dem Idealgewicht (Kienzle und Moik, 2011). Die Methode zur Bestimmung des Ernährungsgrades sollte einerseits akkurat, d.h. dem tatsächlichen Wert möglichst entsprechen, andererseits präzise, d.h. reproduzierbar, sein (German, 2006). Bei der Methode des BCS handelt es sich um eine subjektive semiquantitative Methode, bei der das subkutane, das viszerale und das oberflächlich in der Muskulatur vorkommende Fettgewebe adspektorisch und palpatorisch beurteilt werden (German, 2006).

Die Untersuchungen von Hoenig und Mitarbeiter zeigten, dass magnetresonanztomographische Untersuchungen und die Bestimmung des Body Condition Scores zur Ermittlung des Ernährungsgrades von Katzen vergleichbare Ergebnisse erzielten. Die magnetresonanztomographischen Untersuchungen zeigten auf, dass das Gesamtvolumen des viszeralen Fettgewebes mit der des subkutan palpierbaren und adspektorisch erfassbaren Fettgewebes korrelierte, weshalb die Anwendung des BCS zur Ermittlung des Ernährungsgrades repräsentative Ergebnisse erzielte (Hoenig et al., 2007). Bjornvad und Mitarbeiter verglichen den Body Condition Score mit dem Dual-Röntgen-Absorptiometrie-Verfahren zur Bestimmung des Ernährungsgrades von Katzen. Hierbei wurde eine Korrelation zwischen der 9-Punkte-BCS-Skala und dem prozentualen Körperfettgehalt nachgewiesen, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass die 9-Punkte-BCS-Skala eine aussagefähige Methode zur Beurteilung des prozentualen Fettgehaltes in Katzen ist (Bjornvad et al., 2011). Hingegen konnten Lee und Mitarbeiter nur eine geringe Korrelation zwischen ihren Computertomografieergebnissen und den ermittelten Body Condition Scores bei den von ihnen untersuchten Katzen feststellen. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass die Methode des BCS zur Erfassung der Fettgewebemasse in Katzen unzulänglich sein könnte (Lee et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf Grundlage der Ergebnisse von Hoenig und Mitarbeiter (2007) sowie Bjornvad und Mitarbeiter (2011) die Methode des BCS zur Bestimmung des Ernährungsgrades bei den untersuchten Katzen angewendet.

Katzen mit einem BCS < 6 und > 2 wurden als normalgewichtig definiert, Katzen mit einem BCS ≥ 6 als übergewichtig bzw. adipös.

3.3. Wahl der untersuchten Fettgewebelokalisationen

In der gegenwärtigen Studie wurde subkutan abdominales Fettgewebe, intraperitoneales wie das umbilikale, omentale, mesenteriale, peripankreatische Fettgewebe, retroperitoneales perirenales Fettgewebe sowie retrobulbäres Fettgewebe bei männlichen kastrierten adulten Katzen untersucht.

Beim Menschen besteht ein Zusammenhang zwischen der Akkumulation von intraabdominalem Fettgewebe und dem Auftreten von Erkrankungen wie Diabetes mellitus, koronaren Herzerkrankungen, Dyslipidämien und Bluthochdruck (Koster et al., 2010). Das abdominale Fettgewebe wird unterteilt in subkutane und viszerale Anteile (Cinti, 2005), wobei dem viszeralen Fettgewebe der größte Einfluss auf die metabolische Gesundheit zugesprochen wird (Wajchenberg, 2000; Koster et al., 2010; Liu et al., 2010; Dodson et al., 2011). Ebenso wie bei adipösen Menschen treten auch bei Hauskatzen fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen auf (siehe II.7) (Scarlett und Donoghue, 1998; Colliard et al., 2009; Zoran, 2010). Die Erkenntnis, dass Fettzellen depotspezifische funktionelle Unterschiede aufweisen, führte zu weiteren Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Morphologie und Funktion von Fettzellen in verschiedenen Lokalisationen, wobei insbesondere das abdominale Fettgewebe - sowohl subkutan als auch viszeral - im Fokus der Forschungsbemühungen steht (Björntorp und Sjöström, 1971; Skurk et al., 2007; Tchoukalova et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass nicht Fettleibigkeit per se, sondern insbesondere die adipozytäre Hypertrophie abdominalen Fettgewebes mit dem Auftreten fettleibigkeitsassoziiierter Erkrankungen in Verbindung steht (Weyer et al., 2000; Skurk et al., 2007; O'Connell et al., 2010). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse lag auch in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf der Untersuchung der abdominalen Fettgewebedepots. Das retrobulbäre Fettgewebe wurde als Vertreter der Baufettgewebe (Krölling und Grau, 1960) zum Vergleich ausgewählt.

3.4. Wahl der Methode zur Bestimmung der mittleren Fettzellvolumina

Zur Gewährleistung der Repräsentativität wurden die Fettgewebeproben aus den zu untersuchenden Lokalisationen (subkutan, umbilikal, omental, mesenterial,

peripankreatisch, perirenal), mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes, systematisch zufällig entnommen. Zufällig bedeutet, dass es sich um eine Zufallsauswahl handelt, d.h. jedes Element der Grundgesamtheit hat die gleiche Chance in die Stichprobe zu gelangen. Systematisch heißt, die Probe wird zufällig, aber mit einem bestimmten System ausgewählt (siehe III.2.3) (Oberholzer, 1983).

Die Bestimmung des mittleren Fettzellvolumens in den untersuchten Lokalisationen erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels quantitativ stereologischer Methoden. Es handelt sich hierbei um ein morphometrisches Verfahren, bei dem indirekte Messungen vorgenommen werden. Die indirekte Messung erforderte zunächst das Zählen einfacher, dimensionsloser Strukturparameter (= Partikel x , z.B. Fettzellkerne). Anschließend wurde aus den beiden Parametern - Gesamtvolumenanteil der Partikel x im Referenzvolumen - und - Anzahl der Partikel x im Referenzvolumen - durch einfache Division das mittlere Volumen eines einzigen Partikels errechnet (Reid, 1980; Oberholzer, 1983). Die Anzahl der Partikel x im Referenzvolumen wurde durch die physikalische Disektor Methode bestimmt (siehe III.2.5.2.1) (Sterio, 1984).

Bei den in der Literatur beschriebenen morphometrischen Methoden zur Ermittlung der Fettzellvolumina (siehe II.3) handelt es sich überwiegend um direkte Messungen eindimensionaler Strukturparameter, z.B. Durchmesser (Oberholzer, 1983). Unter der Annahme, dass es sich bei Fettzellen um sphärische Partikel handelt, wurde aus den ermittelten Durchmessern das Volumen der Zellen errechnet (Hirsch und Gallian, 1968). Die Durchmesser wurden entweder an Fettzellen in Suspension (Hirsch und Gallian, 1968; Di Girolamo et al., 1971 [c]) oder an Fettzellanschnittprofilen (Sjöström et al., 1971) im histologischen Schnitt bestimmt. Diese Vorgehensweise ist modellbasiert. Modellbasierte Ansätze können allerdings nur so gut sein, wie das Modell der Realität nahe kommt. Messungen an Zellsuspensionen, in denen Zellen nicht mehr in ein retikuläres Netz eingebunden sind, vernachlässigen die natürliche Form der biologischen Struktur, da es aufgrund der veränderten Grenzflächenspannung in einer Suspension zu einer Abrundung der Zellen und damit Verkleinerung des Fettzelldurchmessers kommt (Thyberg und Moskalewski, 1984). Bei der Methode des Physikalischen Disektors hingegen handelt es sich um eine design-based stereologische Untersuchung, d.h. es werden keine Annahmen über Form, Größe, Orientierung oder Verteilung der

zu untersuchenden Struktur gemacht (Gundersen, 1988; Wanke, 1996).

4. Volumendichte der Fettzellen in den untersuchten Fettgewebelocalisationen

Der Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe (Volumendichte der Fettzellen am Fettgewebe) in den untersuchten Lokalisationen betrug im Durchschnitt 96%. Es lagen keine Unterschiede in der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe zwischen normalgewichtigen und übergewichtigen bzw. adipösen Tieren vor. Im retrobulbären Fettgewebe entsprach die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe 91%. Der Volumenanteil gefäßführenden Bindegewebes war in dieser Lokalisation signifikant höher als im subkutanen, umbilikalen, omentalen und peripankreatischen Fettgewebe. Das retrobulbäre Fettgewebe dient als Baufettgewebe dem mechanischen Schutz und Halt des Bulbus (Krölling und Grau, 1960). Die Fettzellen sind hier in ein dichteres Bindegewebe eingebettet als in den Speichergewebepots (Krölling und Grau, 1960). Bereits makroskopisch und haptisch waren Unterschiede in der Textur zwischen dem retrobulbären und den anderen entnommenen Fettgeweben erkennbar. Retrobulbäres Fettgewebe der untersuchten Katzen war fester und damit formstabiler sowie von weißlicherer Farbe. Auch die lichtmikroskopische subjektive Beurteilung histologischer Schnittpräparate der untersuchten Fettgewebelocalisationen in Standard- und Spezialfärbungen ergab, dass das retrobulbäre von deutlich mehr Bindegewebe durchsetzt war als das subkutane oder umbilikale Fettgewebe (siehe IV.2.4, Abbildung 14).

Fettgewebe wird als ein Gewebe beschrieben, das fast ausschließlich aus Adipozyten besteht (Greenwood und Johnson, 1983). Daneben finden sich Fettvorläuferzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen sowie Bindegewebesepten, in denen Nerven, Blut- und Lymphgefäße verlaufen (Krölling und Grau, 1960; Greenwood und Johnson, 1983). Die Größenordnung der Volumendichte von Fettzellen im Fettgewebe der vorliegenden Arbeit deckt sich mit der allgemeinen Aussage von Ryan, der, ohne Angabe zu der Lokalisation, den interstitiellen Anteil am Fettgewebenvolumen in gesundem Fettgewebe mit 10% angibt (Ryan, 1995). Avram und Mitarbeiter, geben den Anteil reifer Adipozyten am Fettgewebe hingegen mit 33% an, während kleine Blutgefäße, Nervengewebe, Fibroblasten und Fettvorläuferzellen zwei Drittel ausmachen (Avram et al., 2005), wobei die Autoren keine Quelle für diese Daten anführen. Die Abweichung der postulierten

Werte von Avram und Mitarbeitern (2005) zu den Werten von Ryan (1995) kann durch die in der vorliegenden Studie gewonnen histomorphologischen und quantitativ stereologischen Ergebnisse nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Studie lag der Volumenanteil der Fettzellen im mesenterialen Fettgewebe mit 94% deutlich niedriger als in den anderen abdominalen, sowohl subkutanen als auch viszeralen Fettgewebedepots. Die niedrigere Volumendichte der Fettzellen im mesenterialen Fettgewebe ist möglicherweise mit einer höheren Volumendichte der Gefäße in dieser Lokalisation zu begründen, denn das mesenteriale Fettgewebe begleitet im Mesojejunum die Gefäße, die von der Radix mesenterii zum Jejunum ziehen.

Dodson und Mitarbeiter geben zu bedenken, dass mit der Hypertrophie von Fettzellen bei Zunahme der Fettgewebemasse sich der Anteil des gefäßführenden Bindegewebes im Fettgewebe verringert. Dies führt nach Ansicht der Autoren zu einer Verminderung der Perfusion des hypertrophierten Fettgewebes und wird als eine mögliche Ursache für die Entstehung hypoxischer Zustände diskutiert (Dodson et al., 2011). Allerdings finden sich in der Literatur keine Daten darüber, ab welcher Größe Fettzellen als hypertroph anzusehen sind bzw. wie ein erniedrigter Anteil gefäßführenden Bindegewebes im Fettgewebe definiert ist.

In der vorliegenden Arbeit lag kein signifikanter Unterschied in der Volumendichte von Fettzellen im Fettgewebe zwischen den Fettgewebedepots mit den größten Fettzellvolumina - subkutan und umbilikal - und den Fettgeweben mit kleineren Fettzellvolumina wie dem omentalen oder peripankreatischen Fettgewebe vor. Diese Ergebnisse erlauben jedoch keine Schlussfolgerung hinsichtlich der Vaskularisationsdichte von Fettgewebe und der Versorgung der Fettzellen bei adipöser Hypertrophie.

5. Mittleres Fettzellvolumen

5.1. Mittlere Fettzellvolumina aller untersuchten Tiere

Die Fettzellen des abdominal subkutanen und umbilikalen Fettgewebes aller untersuchten Tiere wiesen unabhängig vom Body Condition Score signifikant größere mittlere Fettzellvolumina auf als die Fettzellen der viszeral abdominalen und retrobulbären Fettgewebedepots. Die mittleren Fettzellvolumina der viszeralen

abdominalen Fettgewebepots (omental, mesenterial, peripankreatisch, perirenal) unterschieden sich untereinander nur geringgradig. Zwischen den subkutanen und umbilikalen Fettzellen lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied der mittleren Fettzellvolumina vor.

Diese Befunde zeigen, dass ebenso wie beim Menschen und diversen Labortieren auch bei männlichen kastrierten Katzen Fettzellen verschiedener Fettgewebepots, unabhängig von ihrem Ernährungsgrad, Unterschiede in den mittleren Fettzellvolumina aufweisen (siehe II.4).

Die subkutanen Fettzellen wiesen bei allen untersuchten Tieren die größten mittleren Fettzellvolumina auf. Erkrankungen des Unterhautfettgewebes ungeklärter Ätiologien wie beispielsweise die sterile idiopathische noduläre Pannikulitis könnten möglicherweise in Zusammenhang mit überdurchschnittlich großen mittleren subkutanen Fettzellvolumina stehen (Synilo, 2010). Hierzu liegen bislang jedoch keine veröffentlichten Untersuchungen vor.

5.2. Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger Tiere (BCS < 6 > 2)

Die untersuchten normalgewichtigen männlichen kastrierten Katzen mit einem BCS < 6 > 2 wiesen subkutan und umbilikal die größten Fettzellvolumina auf. Die subkutanen Fettzellen waren im Vergleich zu den omentalen, mesenterialen, peripankreatischen und perirenal Fettzellen durch rund doppelt so hohe Fettzellvolumina gekennzeichnet. Signifikante Größenunterschiede lagen zwischen den mittleren Fettzellvolumina des subkutanen und des mesenterialen sowie des peripankreatischen Fettgewebes vor. Die mittleren Fettzellvolumina retrobulbärer Fettzellen waren geringgradig größer als die der omentalen, mesenterialen, peripankreatischen und perirenal Fettzellen.

Bereits Occhipinti untersuchte 1936 Fettzellgrößen verschiedener Fettgewebepots bei Menschen, Hunden, Katzen, Meerschweinchen, Ratten und Rindern und zeigte, dass die größten Fettzellen im subkutanen Fettgewebe liegen (Occhipinti, 1936). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. Occhipinti bemaß die mittleren Durchmesser der Fettzellen an histologischen Schnitten von adulten Katzen mit „normalem“ Ernährungszustand. Der Mittelwert der mittleren Durchmesser der Fettzellen bei der Katze lag demnach für das subkutane Fettgewebe bei 68 µm, die höchsten gemessenen mittleren Durchmesser betragen

80 μm im subkutanen Fettgewebe (Occhipinti, 1936). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie und der Arbeit von Occhipinti zeigen, dass bei normalgewichtigen Katzen subkutane Fettzellen im Vergleich zu den untersuchten Fettgewebedepots die größten mittleren Fettzellvolumina aufwiesen.

Der direkte Vergleich der in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse mit denen anderer Studien war grundsätzlich nur eingeschränkt möglich, da Unterschiede in der Methodik vorliegen, unterschiedliche Parameter zur Quantifizierung der Fettzellgröße gewählt sowie verschiedene Spezies untersucht wurden.

Di Girolamo und Mitarbeiter bestimmten die Durchmesser von isolierten Fettzellen in Suspension aus dem subkutanen, mesenterialen, epididymalen und perirenalen Fettgewebe von Ratten. Der Mittelwert für die Durchmesser der subkutanen Fettzellen lag bei 43,3 μm , der mesenterialen bei 29,4 μm , der epididymalen bei 43,5 μm und der perirenalen Fettzellen bei 37,2 μm . Die Fettzelldurchmesser des subkutanen und epididymalen Fettgewebes waren deutlich größer als die des mesenterialen Fettgewebes. Die Fettzelldurchmesser des perirenalen Fettgewebes waren größer als die des mesenterialen und kleiner als die des subkutanen und epididymalen Fettgewebes (Di Girolamo et al., 1971 [c]). Diese Befunde decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit. In der gegenwärtigen Studie waren die mittleren Fettzellvolumina der subkutanen Fettzellen bei den untersuchten normalgewichtigen männlichen kastrierten Katzen ca. um das Dreifache größer als die der mesenterialen und etwa um etwa das Doppelte größer als die der perirenalen Fettzellen.

Lee und Mitarbeiter untersuchten u.a. die Fettzelldurchmesser des subkutanen und omentalen Fettgewebes bei normalgewichtigen Schweinen der Rasse Poland China und Duroc. Sie bemaßen die Durchmesser von Fettzellen in Suspension und zeigten, dass subkutane Fettzellen größere Durchmesser als omentale Fettzellen aufwiesen (Lee et al., 1973).

Die Ergebnisse von Occhipinti, Di Girolamo und Mitarbeiter (1971) sowie Lee und Mitarbeiter (1973) gemeinsam mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, zeigen, dass das subkutane Fettgewebe normalgewichtiger Tiere im Vergleich zu den anderen untersuchten Lokalisationen die größten Fettzellen aufweist. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass es sich hierbei um ein Speicherfettgewebe

handelt, das kaum mechanischen Schutz bieten muss. Die ermittelten mittleren Fettzellvolumina für das umbilikale Fettgewebe waren kleiner als die des subkutanen Fettgewebes, aber deutlich größer als die der anderen untersuchten Lokalisationen. Diese Befunde stehen in Einklang damit, dass es sich auch bei dem umbilikalischen Fettkörper der Katze in erster Linie um ein Fettspeicherdepot handelt (Liebich, 2010).

Goldrick bestimmte die Durchmesser isolierter Fettzellen der epididymalen, retroperitonealen und subkutanen Fettgewebepots von Ratten. Die Ergebnisse seiner Untersuchungen zeigen, dass das retroperitoneale Fettgewebe signifikant größere Fettzell Durchmesser aufwies als die anderen beiden Lokalisationen (Goldrick, 1967). Die ermittelten Durchmesser betragen für das retroperitoneale Fettgewebe $95,9 \mu\text{m} \pm 0,44$, für das subkutane Fettgewebe $92,3 \mu\text{m} \pm 0,41$ und für das epididymale Fettgewebe $92,5 \mu\text{m} \pm 0,34$ (Goldrick, 1967). Die Messwerte der von Goldrick untersuchten Lokalisationen wiesen ähnliche Werte auf. Im Gegensatz zu den geringen Unterschieden der von Goldrick ermittelten Fettzell Durchmesser, wiesen die in der vorliegenden Studie ermittelten mittleren Fettzellvolumina hingegen einen deutlichen Größenunterschied auf.

Yamada und Mitarbeiter untersuchten beim Rind Osmiumtetroxid-fixierte Fettzellen aus dem subkutanen, renalen und mesenterialen Fettgewebepot in Suspension. Die subkutanen Fettzellen stammten aus der dorsolumbalen Region. Die Durchmesser der subkutanen Fettzellen wiesen kleinere Werte als die der renalen und mesenterialen Fettzellen auf (Yamada et al., 2010). Die Abweichung der Ergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit rührt möglicherweise daher, dass das subkutane Fettgewebe in Abhängigkeit von seiner Lokalisation, beispielsweise abdominal oder dorsolumbal, unterschiedlich große mittlere Fettzellvolumina aufweist.

5.3. Mittlere Fettzellvolumina übergewichtiger bzw. adipöser Tiere (BCS \geq 6)

Die mittleren Fettzellvolumina subkutaner und umbilikaler Fettzellen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten adipösen Tiere mit einem Body Condition Score von ≥ 6 waren größer als die mittleren Fettzellvolumina der aus dem Netz, Gekröse, retroperitonealen und retrobulbären Fettgewebe stammenden Fettzellen.

Die mittleren Fettzellvolumina der subkutanen Fettzellen waren signifikant größer als die der omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenenalen und retrobulbären Fettzellen. Die mittleren Fettzellvolumina der umbilikalen Fettzellen waren signifikant größer als die der pankreatischen und retrobulbären Fettzellen. Da die Irrtumswahrscheinlichkeit aufgrund des Mehrfachvergleichs eine Adjustierung des Signifikanzniveaus erforderlich machte und dieses damit deutlich herabgesetzt wurde und nicht wie üblich bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ lag, waren weitere Größenunterschiede der mittleren Fettzellvolumina verschiedener Fettgewebedepots statistisch nicht nachweisbar.

O'Connell und Mitarbeiter untersuchten die Durchmesser subkutaner und omentaler Fettzellen fettleibiger Menschen und zeigten, dass die subkutanen Fettzellen durchwegs größere Durchmesser aufwiesen als omentale Fettzellen. Diese Befunde decken sich mit den vorliegenden Ergebnissen (O'Connell et al., 2010).

Garaulet und Mitarbeiter bemaßen an Gefrierschnitten die Durchmesser von Fettzellen aus dem periumbilikalen subkutanen, omentalen und periviszeralen Fettgewebedepot fettleibiger Menschen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der gegenwärtigen Studie und der Arbeit von O'Connell und Mitarbeitern waren einerseits die Messwerte für das subkutane, periviszerale und omentale Fettgewebe nahezu gleich, andererseits lag der durchschnittliche Wert für die omentalen Fettzellen über dem der subkutanen Fettzellen (Garaulet et al., 2006).

5.4. Mittlere Fettzellvolumina normalgewichtiger und übergewichtiger bzw. adipöser Tiere im Vergleich

Die Fettzellen der untersuchten Tiere mit einem $BCS \geq 6$ wiesen in allen Lokalisationen größere mittlere Fettzellvolumina auf als die der Tiere mit einem $BCS < 6$. Die Fettzellvolumina des subkutanen, umbilikalen und omentalen Fettgewebes adipöser Tiere wiesen um die 90% größere mittlere Fettzellvolumina als normalgewichtige Katzen auf. Die mesenterialen Fettzellen waren bei adipösen Tieren doppelt so groß im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren. Peripankreatische Fettzellen waren bei adipösen Katzen durchschnittlich 50% größer, perirenale Fettzellen durchschnittlich 68% größer als bei normalgewichtigen Katzen. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Di Girolamo und Mitarbeitern sowie Marques und Mitarbeitern die aufzeigten, dass die von ihnen untersuchten fettlei-

bigen Tiere im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren größere Fettzell-durchmesser aufwiesen (Di Girolamo et al., 1971 [c]; Marques et al., 1998). Lee und Mitarbeiter stellten fest, dass auch unterernährte Schweine kleinere subkutane und omentale Fettzelldurchmesser besaßen als normalgewichtige Schweine (Lee et al., 1973).

Katzen mit einem BCS von ≥ 6 zeigten im Vergleich zu Katzen mit einem BCS $< 6 > 2$ einen geringen Unterschied der mittleren Fettzellvolumina retrobulbärer Fettzellen auf. Auch Bianchi stellte in seinen Untersuchungen beim Pferd fest, dass die orbitalen Fettzellen, beispielhaft für das Baufettgewebe, sowohl im histologischen Schnittbild als auch in Suspension die kleinsten Durchmesser aufwiesen (Bianchi, 1989). Occhipinti zeigte, dass bei Menschen, Hunden, Katzen, Meerschweinchen, Ratten und Rindern die orbitalen Fettzellen die kleinsten Durchmesser besaßen. Die Ergebnisse der gegenwärtigen Studie, gemeinsam mit den Ergebnissen von Occhipinti (1936) und Bianchi (1989), deuten darauf hin, dass Fettgewebe wie das retrobulbäre, wenn es vorrangig dem mechanischen Schutz dient, unabhängig vom Ernährungsgrad, aus kleinen Fettzellen, die von prominenten Bindegewebesepten umgeben sind, besteht. Diese Befunde stehen in Einklang damit, dass retrobulbäres Fettgewebe als Struktur- und Baufettgewebe nicht vorrangig der Energiebereitstellung sowie -speicherung dient, sondern in erster Linie mechanische Aufgaben besitzt.

6. Korrelation des BCS und der mittleren Fettzellvolumina in der jeweiligen Lokalisation

Bei der Untersuchung der Korrelation von Fettzellvolumina der jeweiligen Lokalisationen mit dem Body Condition Score, lag eine signifikante Korrelation zwischen den Fettzellvolumina im subkutanen, umbilikalen und mesenterialen Fettgewebe und dem Body Condition Score vor.

Die Regressionsgeradensteigung der Korrelation von Fettzellvolumina mit dem Body Condition Score aller untersuchten Tiere war für das subkutane und umbilikale Fettgewebe am steilsten, für das retrobulbäre Fettgewebe am flachsten. Dies bedeutet, dass im subkutanen und umbilikalen Fettgewebe neben der Korrelation der mittleren Fettzellvolumina mit dem Body Condition Score auch die absoluten Zunahmen der mittleren Fettzellvolumina mit zunehmendem BCS die größten

waren. Demgegenüber steht das retrobulbäre Fettgewebe als Bau- und Struktur-fettgewebe, dessen mittlere Fettzellvolumina nicht mit dem Ernährungsgrad (BCS) korrelierten. Aufgrund der Streuung der Daten sowie der geringen unter-suchten Tierzahl war ein statistischer Nachweis der Unterschiede zwischen den Regressionsgeraden nicht möglich.

Untersuchungen zur adipozytären Hypertrophie bzw. Hyperplasie verschiedener Fettgewebedepots an männlichen Ratten haben gezeigt, dass bei länger bestehen-der positiver Energiebilanz das mesenteriale und epididymale Fettgewebe haupt-sächlich mit adipozytärer Hypertrophie, wohingegen retroperitoneale und inguina-le Fettgewebedepots eher mit adipozytärer Hyperplasie reagierten (Di Girolamo et al., 1998).

Diese Erkenntnisse sind nur bedingt mit denen der vorliegenden Arbeit zu ver-gleichen, da es sich einerseits um eine andere Spezies handelt, andererseits keine Fettzellvolumina, sondern Fettzelldurchmesser von Fettzellen in Suspension be-stimmt wurden und nicht die gleichen Fettgewebedepots untersucht wurden. Ver-gleicht man jedoch die Ergebnisse der gleichsam untersuchten Fettgewebedepots, mesenterial und retroperitoneal, so stimmen die Ergebnisse dahingehend überein, dass auch bei männlichen kastrierten Katzen die mesenterialen Fettzellen bei Fett-leibigkeit eine geringfügig größere Fähigkeit zur adipozytären Hypertrophie besa-ßen als die perirenenalen Fettzellen. Die Bewertung einer vorrangig hypertrophen bzw. hyperplastischen Wachstumsform der Fettzellen verschiedener Lokalisatio-nen bei Katzen unterschiedlichen Ernährungsgrades ist jedoch nicht ausschließlich über einen Vergleich der mittleren Fettzellvolumina möglich. Hierzu ist der Ver-gleich der absoluten Anzahl der Fettzellen im jeweiligen Fettgewebedepot erfor-derlich. Die Bestimmung der Anzahl der Fettzellen wurde in der gegenwärtigen Arbeit nicht durchgeführt, da eine entsprechende Wägung bzw. Gesamtvolumen-bestimmung der einzelnen untersuchten Fettgewebedepots nicht mit hinreichender Genauigkeit möglich war (siehe IV.1.1).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Fettzellen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation sowie in Abhängigkeit des Ernährungs-grades der Katze stark in ihrer Größe variieren. Die Fähigkeit zur adipozytären Hypertrophie scheint für subkutane, umbilikale, omentale, mesenteriale und peri-

renale Fettzellen ähnlich zu sein, wobei das subkutane und umbilikale Fettgewebe die größten mittleren Fettzellvolumina aufwies. Das peripankreatische Fettgewebe zeigte in dieser Arbeit geringere Unterschiede der mittleren Fettzellvolumina zwischen normalgewichtigen und adipösen Tieren im Vergleich zu den anderen viszerale Fettgewebedepots. Das retrobulbäre Fettgewebe scheint hingegen in keinem Zusammenhang mit dem Ernährungsgrad zu stehen.

Die Vergrößerung der Fettzellvolumina (adipozytäre Hypertrophie) im abdominalen subkutanen und viszerale Fettgewebe wird beim Menschen als Prädisposition für das Auftreten von Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II vermutet. Fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen umfassen bei Katzen neben Diabetes mellitus unter anderem die peripankreatische Fettgewebenekrose, da diese überwiegend bei übergewichtigen Katzen auftritt (Ludwig, 2005). Untersuchungen von Katamoto und Mitarbeiter zeigten, dass Fettzellen von übergewichtigen/fettleibigen Rindern mit mesenterialen und perirenale Fettgewebenekrosen in der Umgebung der Fettgewebenekrosen größere Fettzelldurchmesser aufwiesen als gesunde Rinder in diesen beiden Lokalisationen (Katamoto et al., 1996). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lieferten hingegen keine Hinweise darauf, dass peripankreatische Fettzellen übergewichtiger bzw. adipöser Katzen auffallend große mittlere Fettzellvolumina im Vergleich zu den anderen Lokalisationen besaßen. In diesem Sinne liefert die vorliegende Arbeit keinen Erklärungsansatz für die akute peripankreatische Fettgewebenekrose.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch die Anwendung nicht modellbasierter quantitativer stereologischer Untersuchungsmethoden (Disektor Methode) war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit möglich, die mittleren Fettzellvolumina in Fettgeweben verschiedener Lokalisationen bei normalgewichtigen und übergewichtigen bzw. fettleibigen Katzen zu ermitteln.

Die Befunde der Studie zeigten, dass Fettzellen in Abhängigkeit der Lokalisation des Fettgewebedepots unterschiedlich große mittlere Fettzellvolumina aufwiesen. Subkutane und umbilikale Fettzellen besaßen die größten mittleren Fettzellvolumina. Mittlere Fettzellvolumina aller Fettgewebedepots männlicher kastrierter Katzen mit einem BCS ≥ 6 waren durchwegs größer als die der männlichen kas-

trierten Katzen mit einem BCS < 6 , wobei die mittleren Fettzellvolumina der Tiere mit einem BCS ≥ 6 mit Ausnahme des retrobulbären Fettgewebes in den untersuchten Lokalisationen etwa doppelt so große Werte im Vergleich zu den normalgewichtigen Tieren aufwiesen. Darüber hinaus korrelierten die mittleren Fettzellvolumina der Speicherfettgewebedepots des subkutanen, umbilikalen und mesenterialen Fettgewebes signifikant mit dem Ernährungsgrad. Die absolute Zunahme der mittleren Fettzellvolumina war mit steigendem Body Condition Score für das subkutane und umbilikale Fettgewebe am höchsten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass abdominal subkutane und abdominal viszerale Fettzellen bei länger bestehender positiver Energiebilanz eine ähnliche Kapazität zu adipozytärer Hypertrophie zu besitzen scheinen. Demgegenüber korrelierten die mittleren Fettzellvolumina des retrobulbären Fettgewebes, ein Bau- und Strukturfettgewebe, nicht mit dem Ernährungsgrad (BCS). Retrobulbäre Fettzellen scheinen bei länger bestehender positiver Energiebilanz somit keine ausgeprägte Fähigkeit zu adipozytärer Hypertrophie zu besitzen. Die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe normalgewichtiger Katzen unterschied sich nicht vom Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe adipöser Tiere. Des Weiteren bestand zwischen dem subkutanen Fettgewebe und den viszeralen Fettgewebedepots kein signifikanter Unterschied in der Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe. Das retrobulbäre Fettgewebe hingegen, das vorrangig dem Schutz und Halt des Bulbus dient, wies im Vergleich zu den anderen untersuchten Fettgewebedepots den höchsten Bindegewebeanteil am Fettgewebe auf.

Auf Grundlage der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten wird die Bestimmung der Innervations- und Vaskularisationsdichte, als mögliche Einflussfaktoren der adipozytären Hypertrophie und Hyperplasie in Fettgewebe verschiedener Lokalisationen von normalgewichtigen und fettleibigen Katzen Gegenstand weiterführender Folgeuntersuchungen sein. Darüber hinaus werden Expressionsanalysen auf RNA und Proteinebene von für die Entwicklung adipozytärer Hypertrophie und Hyperplasie relevanten Adipokinen wie Leptin oder IGF-I in Probenmaterial von abdominal subkutanen und viszeralen Fettgewebe normalgewichtiger und fettleibiger Katzen durchgeführt.

Basierend auf den Erkenntnissen aus der Humanmedizin, dass das Ausmaß der Hypertrophie abdominal subkutaner und viszeraler Fettzellen eine deutliche Kor-

relation mit fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen wie Diabetes mellitus aufweist, werden sich zukünftige Untersuchungen damit befassen, diese Zusammenhänge auch bei Katzen zu erforschen.

Die Ergebnisse der geplanten Folgeuntersuchungen werden hoffentlich einen Beitrag für das Verständnis der Relevanz von hypertrophen/hyperplastischen Wachstumsvorgängen von Fettzellen in unterschiedlichen Speicherfettgewebedepots für die Pathogenese von fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen der Katze leisten.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Übergewicht, Fettleibigkeit und fettleibigkeitsassoziierte Erkrankungen wie Diabetes mellitus und koronare Herzkrankheiten weisen insbesondere in Wohlstandsgesellschaften seit Jahrzehnten stetig steigende Prävalenzen auf und führen neben einer drastischen Einschränkung der Lebensqualität der betroffenen Patienten auch zu immensen finanziellen Belastungen der öffentlichen Gesundheitssysteme. Ebenso wie beim Menschen steigen auch bei Hauskatzen, v.a. in westlichen Haushalten, Vorkommenshäufigkeit und Inzidenz von Übergewicht, Adipositas und fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen fortwährend an. Etwa 30% der Hauskatzenpopulation sind hiervon betroffen, wobei kastrierte Kater mit 30-40% überproportional häufig vertreten sind.

Zahlreiche Studien belegen, dass das Auftreten von Komorbiditäten der Adipositas beim Menschen sowohl mit der Verteilung des Fettgewebes im Körper, als auch mit der Größe der Fettzellen in verschiedenen Fettgewebedepots assoziiert ist. So wird das Risiko der Entstehung diverser fettleibigkeitsassoziiierter Erkrankungen beim Menschen insbesondere mit der übermäßigen Akkumulation von Fettgewebe in den viszeralen abdominalen Fettgewebedepots in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen an Labortieren und am Menschen zeigen, dass Fettgewebezunahme im Rahmen von Adipositas durch adipozytäre Hypertrophie oder Hyperplasie bedingt ist. Vor allem die Vergrößerung der Fettzellvolumina (adipozytäre Hypertrophie) im abdominalen subkutanen und viszeralen Fettgewebe wird beim Menschen als Prädisposition für das Auftreten von Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus Typ II vermutet.

Bislang liegen keine Untersuchungen zu mittleren Fettzellvolumina verschiedener Fettgewebedepots normalgewichtiger und fettleibiger Katzen vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mittleren Fettzellvolumina verschiedener Fettgewebedepots normalgewichtiger und adipöser Katzen durch quantitativ stereologische Analysen zu bestimmen und zu vergleichen. Hierzu wurden die mittleren Fettzellvolumina mehrerer abdominaler Speicherfettgewebe (abdominal subkutanes, umbilikales, omentales, mesenteriales, peripankreatisches und perirenales Fettgewebe) sowie eines Baufettgewebes (retrobulbäres Fettgewebe) normalgewichtiger

und adipöser männlicher kastrierter Katzen bestimmt. Die Einteilung des Ernährungsgrades erfolgt durch die Bestimmung des Body Condition Scores (BCS). Die untersuchten Tiere wurden entsprechend ihres Body Condition Scores in eine Gruppe normalgewichtiger ($BCS < 6$) und adipöser Tiere ($BCS \geq 6$) eingeteilt. Aus den zu untersuchenden Fettgewebedepots wurden repräsentative Fettgewebeproben systematisch zufällig ausgewählt und in Kunststoff eingebettet. Die Bestimmung der numerischen Volumendichte (Anzahl der Fettzellen pro Volumen Fettgewebe) erfolgte modellfrei durch Anwendung der physikalischen Disektor-Methode an seriellen Schnittpräparaten der in Kunststoff eingebetteten Fettgewebeproben. Die Volumendichte der Fettzellen im Fettgewebe (Volumenanteil der Fettzellen am Fettgewebe) wurde in den gleichen histologischen Präparaten planimetrisch durch Bestimmung des Flächenanteils der Fettzellanschnittprofile am Fettgewebe ermittelt. Die mittleren Volumina der Fettzellen aller untersuchten Fettgewebelokalisationen wurden aus der numerischen Volumendichte und dem Volumenanteil der Fettzellen im/am Fettgewebe errechnet.

Unabhängig vom Ernährungsgrad wiesen Fettzellen des subkutanen und umbilikalen Fettgewebes signifikant größere mittlere Volumina auf als die des omentalen, mesenterialen, peripankreatischen, perirenaln und retrobulbären Fettgewebes. Adipöse Tiere wiesen im Vergleich zu normalgewichtigen Katzen in sämtlichen untersuchten abdominalen Speicherfettgewebedepots deutlich größere mittlere Fettzellvolumina auf. Des Weiteren korrelierten die mittleren Fettzellvolumina der subkutanen, umbilikalen und mesenterialen Fettgewebe signifikant mit dem Body Condition Score.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen somit eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen zur Relevanz hypertropher/hyperplastischer Wachstumsvorgänge von Fettzellen in unterschiedlichen Speicherfettgewebedepots für die Pathogenese von fettleibigkeitsassoziierten Erkrankungen der Katze dar.

VII. SUMMARY

The prevalence of overweight, adipositas and obesity related comorbidities as diabetes mellitus and coronary heart disease is continuously increasing in developed and developing countries. Obesity and adipositas related diseases impair both life quality and expectancy of affected patients, and burden public health care systems with immense treatment costs.

Similar to the situation in humans, the prevalence and incidence of overweight, obesity and its sequelae is steadily rising in domestic cat populations in industrialized countries. Currently, approximately 30% of domestic cats are obese, of which the greatest proportion (30-40%) are male neutered cats.

Several studies demonstrated a clear association of the incidence of obesity related diseases with the distribution of fat tissue in the body, as well as with the cell-size of adipocytes in fat depots of different localizations. In humans, especially the abdominal pattern of fat accumulation is associated with the development of adipositas related metabolic disorders. Investigations of experimental animal models and humans revealed two forms of adipose tissue expansion - hypertrophy and hyperplasia. In particular, obesity related hypertrophic enlargement of adipocytes of abdominal subcutaneous and of visceral fat depots is supposed to increase the risk of development of clinical complications of adipositas, including insulin resistance, hyperinsulinemia, dyslipidemia and diabetes mellitus type II.

Detailed investigations of adipocyte sizes of different adipose tissue depots in obese and lean cats have not been subject of published studies, so far.

The primary objective of the present study was to determine and to compare the mean cellular volumes of adipocytes in different fat depots of lean and obese male neutered cats. The mean cellular volumes of adipocytes in storage fat (subcutaneous, umbilical, omental, mesenteric, peripancreatic and perirenal fat) and in a structural fat depot (orbital fat) were determined by means of quantitative stereological analysis. The body condition of examined cats was determined, using the 9 point Body Condition Score (BCS). According to their BCS, cats were assigned to either the investigated group of lean ($BCS < 6$), or obese cats ($BCS \geq 6$).

For quantitative stereological analyses, representative specimen from each analyzed fat depot were collected according to a systematic-random sampling scheme, and embedded in plastic. The numerical volume density of fat cells in the fat tissue of each fat depot (number of fat cells per volume of fat tissue) was unbiasedly estimated in serial histological sections of each plastic embedded sample, using the physical disector method. The volume density of adipocytes in the fat tissue (ratio of fat cells in the fat tissue) of each fat depot was estimated from the planimetrically determined section profile areas of fat cells within the section area of fat tissue. The mean fat cell volumes were then calculated from the numerical volume densities and the volume densities of adipocytes in the respective fat depots.

Independent of the body condition score of the investigated cats, the mean cellular volumes of adipocytes in the subcutaneous and umbilical fat were consistently significantly larger than those of the omental, mesenteric, peripancreatic, perirenal or orbital fat depots.

In all examined locations, obese cats exhibited markedly larger mean fat cell volumes, as compared to lean animals. Moreover, the mean cell volumes of adipocytes of the subcutaneous, umbilical and mesenteric fat depots displayed a significant correlation with the body condition score of the cats. Thus these findings clearly demonstrate that the size of feline adipocytes in storage fat tissues both depends on the localization of the fat depot, and on the individual body condition score.

The results of the present study provide a basis for further investigations of the pathogenetic relevance of hypertrophic and hyperplastic growth processes of different body fat depots for development of obesity associated diseases of the cat.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Ryden M, Frisen J, Bernard S, Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology.

Diabetes 2010; 59: 105-9.

Arner P, Hellstrom L, Wahrenberg H, Bronnegard M. Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions. J Clin Invest 1990; 86: 1595-600.

Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. J Am Acad Dermatol 2005; 53: 671-83.

Ballard KW. Functional characteristics of the microcirculation in white adipose tissue. Microvasc Res 1978; 16: 1-18.

Bartness TJ, Song CK. Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. J Lipid Res 2007; 48: 1655-72.

Barzilai N, Gupta G. Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 1999; 54: B89-96.

Berthoud HR, Fox EA, Neuhuber WL. Vagaries of adipose tissue innervation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 291: R1240-2.

Bianchi M. Fat cell size in various body region. A statistical analysis in Equus caballus. Anat Anz 1989; 169: 351-66.

Björntorp P, Sjöström L. Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. Metabolism 1971; 20: 703-13.

- Björntorp P. Adipose tissue distribution and function. *Int J Obes* 1991; 15 Suppl 2: 67-81.
- Bjornvad CR, Nielsen DH, Armstrong PJ, McEvoy F, Hoelmkjaer KM, Jensen KS, Pedersen GF, Kristensen AT. Evaluation of a nine-point body condition scoring system in physically inactive pet cats. *Am J Vet Res* 2011; 72: 433-7.
- Blaak EE, van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MT, Heidendal GA, Saris WH. Beta-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metabolism* 1995; 44: 183-7.
- Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev* 1993; 14: 72-93.
- Burkholder WJ, Bauer JE. Foods and techniques for managing obesity in companion animals. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 658-62.
- Butterwick R. How fat is that cat? *J Feline Med Surg* 2000; 2: 91-4.
- Carpene C, Bousquet-Melou A, Galitzky J, Berlan M, Lafontan M. Lipolytic effects of beta 1-, beta 2-, and beta 3-adrenergic agonists in white adipose tissue of mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 839: 186-9.
- Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 9-15.
- Colliard L, Paragon BM, Lemuet B, Benet JJ, Blanchard G. Prevalence and risk factors of obesity in an urban population of healthy cats. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 135-40.
- Cousin B, Casteilla L, Lafontan M, Ambid L, Langin D, Berthault MF, Penicaud L. Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism.

Endocrinology 1993; 133: 2255-62.

Crandall DL, Goldstein BM, Huggins F, Cervoni P. Adipocyte blood flow: influence of age, anatomic location, and dietary manipulation. *Am J Physiol* 1984; 247: R46-51.

Crandall DL, Goldstein BM, Lizzo FH, Gabel RA, Cervoni P. Hemodynamics of obesity: influence of pattern of adipose tissue cellularity. *Am J Physiol* 1986; 251: R314-9.

Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997; 4: 211-32.

Cushman SW. Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell. *J Cell Biol* 1970; 46: 326-41.

Di Girolamo M, Skinner NS, Jr., Hanley HG, Sachs RG. Relationship of adipose tissue blood flow to fat cell size and number. *Am J Physiol* 1971 [a]; 220: 932-7.

Di Girolamo M, Mendlinger S. Role of fat cell size and number in enlargement of epididymal fat pads in three species. *Am J Physiol* 1971 [b]; 221: 859-64.

Di Girolamo M, Mendlinger S, Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am J Physiol* 1971 [c]; 221: 850-8.

Di Girolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmann R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol* 1998; 274: R1460-7.

Dodson MV, Mir PS, Hausman GJ, Guan LL, Du M, Jiang Z, Fernyhough ME, Bergen WG. Obesity, metabolic syndrome, and adipocytes. *J Lipids* 2011; 2011: 721686.

Dogiel AS. Die sensiblen Nervenendigungen im Herzen und in den Blutgefäßen der Säugethiere. Arch f mikr Anat u Entwicklungsgesch 1898; 52: 44-70.

Ellenberger WG, G. (1908) Grundriss der vergleichenden Histologie der Haussäugetiere. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Berlin.

Esposito K, Pontillo A, Giugliano F, Giugliano G, Marfella R, Nicoletti G, Giugliano D. Association of low interleukin-10 levels with the metabolic syndrome in obese women. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 1055-8.

Fain JN, Garcija-Sainz JA. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. J Lipid Res 1983; 24: 945-66.

Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A. Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. Brain Res Bull 1982; 9: xi-xv.

Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. Am J Physiol 1978; 235: E279-86.

Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB, Sr., O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. Circulation 2007; 116: 39-48.

Frühbeck G. Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. Methods Mol Biol 2008; 456: 1-22.

Gandhi H, Upaganlawar A, Balaraman R. Adipocytokines: The pied pipers. J Pharmacol Pharmacother 2010; 1: 9-17.

Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue

from different fat depots in overweight/obese humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 899-905.

German AJ. The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr* 2006; 136: 1940S-6S.

Giordano A, Song CK, Bowers RR, Ehlen JC, Frontini A, Cinti S, Bartness TJ. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291: R1243-55.

Goldrick RB. Morphological changes in the adipocyte during fat deposition and mobilization. *Am J Physiol* 1967; 212: 777-82.

Greenwood MRC, Johnson PR (1983) *The Adipose Tissue*. In: Weiss, L. *Histology: Cell and Tissue Biology*, 5. edn. Macmillan, London. 1219: 178-199.

Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 997-1002.

Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J. Microsc.* 1977; 111: 219-23.

Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc* 1986; 143: 3-45.

Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147: 229-63.

Gundersen HJG. The nucleator. *J Microsc* 1988; 151: 3-21.

Harvey NL. The link between lymphatic function and adipose biology. *Ann N Y*

Acad Sci 2008; 1131: 82-8.

Haug H. Die Abhängigkeit der Einbettungsschrumpfung des Gehirngewebes vom Lebensalter. *Verh. Anat. Ges.* 1980; 74: 699-700.

Hausberger FX. Über die Innervation der Fettorgane. *Z. Mikr. Anat. Forsch.* 1934; 36: 231-65.

Hausman DB, Di Girolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001; 2: 239-54.

Hellmer J, Marcus C, Sonnenfeld T, Arner P. Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 15-20.

Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J Lipid Res* 1968; 9: 110-9.

Hoening M, Thomaseth K, Waldron M, Ferguson DC. Insulin sensitivity, fat distribution, and adipocytokine response to different diets in lean and obese cats before and after weight loss. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R227-34.

Hoffstedt J, Arner E, Wahrenberg H, Andersson DP, Qvisth V, Lofgren P, Ryden M, Thorne A, Wiren M, Palmer M, Thorell A, Toft E, Arner P. Regional impact of adipose tissue morphology on the metabolic profile in morbid obesity. *Diabetologia* 2010; 53: 2496-503.

Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 1979; 6: 65-70.

Hood RL, Allen CE. Cellularity of bovine adipose tissue. *J Lipid Res* 1973; 14: 605-10.

Ito T, Miura S, Ohshima K, Numakunai S. Pathological studies on fat necrosis (lipomatosis) in cattle. *Nippon Juigaku Zasshi* 1968; 30: 141-50.

Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M (2005) *Histologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Heidelberg.

Kamphues J (2004) *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung* In: 10. überarb. Aufl. Schaper, Alfeld (Leine).

Katamoto H, Yukawa T, Shimada Y. Lipogenic and lipolytic activities in isolated adipocytes from cattle with fat necrosis. *Res Vet Sci* 1996; 61: 214-7.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.

Kienzle E, Moik K. A pilot study of the body weight of pure-bred client-owned adult cats. *Br J Nutr* 2011; 106 Suppl 1: S113-5.

Koster A, Stenholm S, Alley DE, Kim LJ, Simonsick EM, Kanaya AM, Visser M, Houston DK, Nicklas BJ, Tylavsky FA, Satterfield S, Goodpaster BH, Ferrucci L, Harris TB. Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 2354-61.

Kras KM, Hausman DB, Hausman GJ, Martin RJ. Adipocyte development is dependent upon stem cell recruitment and proliferation of preadipocytes. *Obes Res* 1999; 7: 491-7.

Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat-functional implications. *J Clin Invest* 2002; 110: 1243-50.

Kreier F, Buijs RM. Evidence for parasympathetic innervation of white adipose

tissue, clearing up some vagaries. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R548-9.

Krölling O, Grau H (1960) Lehrbuch der Histologie und vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Haustiere. In: 10. vollständig neubearbeitete Auflage. Paul Parey, Berlin, Hamburg.

Lafontan M, Berlan M. Fat cell alpha 2-adrenoceptors: the regulation of fat cell function and lipolysis. *Endocr Rev* 1995; 16: 716-38.

Lavau M, Susini C, Knittle J, Blanchet-Hirst S, Greenwood MR. A reliable photomicrographic method to determining fat cell size and number: application to dietary obesity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977; 156: 251-6.

Lee H, Kim M, Choi M, Lee N, Chang J, Yoon J. Assessment of feline abdominal adipose tissue using computed tomography. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 936-41.

Lee YB, Kauffman RG, Grummer RH. Effect of early nutrition on the development of adipose tissue in the pig. II. Weight constant basis. *Journal of Animal Science* 1973; 37: 1319-25.

Lemonnier D. Effect of age, sex, and sites on the cellularity of the adipose tissue in mice and rats rendered obese by a high-fat diet. *J Clin Invest* 1972; 51: 2907-15.

Lewis-Beck M, Bryman A, Futino Liao T (2004) The sage encyclopedia of social science research methods. In: Band 1. SAGE Publications Inc., Thousand Oaks, California.

Liebich H-G (2010) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Schattauer, Stuttgart.

Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ, Taylor HA. Impact

of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 5419-26.

Ludwig E (2005) Untersuchungen zur Pathogenese der abdominalen Fettgewebsnekrose bei der Katze. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Klausner JS. Prevalence and risk factors for obesity in adult cats from private US veterinary practices. *Intern J Appl Res Vet Med* 2005; 3: 88-96.

Macqueen HA, Waights V, Pond CM. Vascularisation in adipose depots surrounding immune-stimulated lymph nodes. *J Anat* 1999; 194 (Pt 1): 33-8.

Maffeis C, Silvagni D, Bonadonna R, Grezzani A, Banzato C, Tato L. Fat cell size, insulin sensitivity, and inflammation in obese children. *J Pediatr* 2007; 151: 647-52.

Marques BG, Hausman DB, Martin RJ. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol* 1998; 275: R1898-908.

Mattfeldt T. Stereologic methods in pathology. *Norm Pathol Anat (Stuttg)* 1990; 52: 1-300.

Motoi Y, Kinno S, Minamino K, Shimbayashi K, Ushimi C. Treatment and clinicobiochemical observations of cows affected with fat necrosis. *Nippon Juigaku Zasshi* 1984; 46: 281-9.

Napolitano L. The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *J Cell Biol* 1963; 18: 663-79.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*.

Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

O'Connell J, Lynch L, Cawood TJ, Kwasnik A, Nolan N, Geoghegan J, McCormick A, O'Farrelly C, O'Shea D. The relationship of omental and subcutaneous adipocyte size to metabolic disease in severe obesity. *PLoS One* 2010; 5: e9997.

Oberholzer M (1983) *Morphometrie in der klinischen Pathologie. Allgemeine Grundlagen.* Springer Verlag, Berlin.

Occhipinti G. La grandezza delle cellule adipose nei vertebrati. *Riv. Biol., Perugia* 1936; 20: 80-107.

Patzelt V (1948) *Histologie - Der Feinbau des menschlichen Körpers und seine Entwicklung. Ein Lehrbuch für Mediziner.* Urban & Schwarzenberg, Wien.

Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 2011; 60: 1500-10.

Pond CM, Mattacks CA. In vivo evidence for the involvement of the adipose tissue surrounding lymph nodes in immune responses. *Immunol Lett* 1998; 63: 159-67.

Popkin BM, Kim S, Rusev ER, Du S, Zizza C. Measuring the full economic costs of diet, physical activity and obesity-related chronic diseases. *Obes Rev* 2006; 7: 271-93.

Prins JB, O'Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)* 1997; 92: 3-11.

Reid IM. Morphometric methods in veterinary pathology: a review. *Vet Pathol* 1980; 17: 522-43.

Reyne Y, Teyssier J, Nougues J, Tebibel S. Longitudinal study of adipose cell size in the dorsoscapular and perirenal depots of the growing rabbit. *J Lipid Res* 1985; 26: 1036-46.

Ryan TJ. Lymphatics and adipose tissue. *Clin Dermatol* 1995; 13: 493-8.

Sachs L (2004) *Angewandte Statistik - Anwendung statistischer Methoden*; Elfte, überarbeitete und aktualisierte Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

Salans LB, Knittle JL, Hirsch J. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. *J Clin Invest* 1968; 47: 153-65.

Samuelson DA (2007) *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri.

Scarlett JM, Donoghue S. Associations between body condition and disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 1725-31.

Schäffler A, Scholmerich J. Innate immunity and adipose tissue biology. *Trends Immunol* 2010; 31: 228-35.

Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006; 55: 1537-45.

Schwarz T, Morandi F, Gnudi G, Wisner E, Paterson C, Sullivan M, Johnston P. Nodular fat necrosis in the feline and canine abdomen. *Vet Radiol Ultrasound* 2000; 41: 335-9.

Sjöström L, Björntorp P, Vrana J. Microscopic fat cell size measurements on frozen-cut adipose tissue in comparison with automatic determinations of osmium-fixed fat cells. *J Lipid Res* 1971; 12: 521-30.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1023-33.

Slavin BG, Ballard KW. Morphological studies on the adrenergic innervation of white adipose tissue. *Anat Rec* 1978; 191: 377-89.

Stattrek. Random number generator. 2009: <http://stattrek.com/statistics/random-number-generator.aspx>.

Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134: 127-36.

Synilo A (2010) Pannikulitis bei Hund und Katze - eine retrospektive Studie. Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München

Tchoukalova YD, Harteneck DA, Karwoski RA, Tarara J, Jensen MD. A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing. *J Lipid Res* 2003; 44: 1795-801.

Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpyak MV, Votruba SB, Wendland E, Jensen MD. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 56-63.

Thyberg J, Moskalewski S. Influence of proteolytic enzymes and calcium-binding agents on nuclear and cell surface topography. *Cell Tissue Res* 1984; 237: 587-93.

Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 329-39.

Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 285-93.

- Valet P, Tavernier G, Castan-Laurell I, Saulnier-Blache JS, Langin D. Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res* 2002; 43: 835-60.
- Vizzotto L, Ferrario VF, Molinari-Tosatti MP, Morini M, Miani A. Considerations on the dynamics of adipose cells in relation to ponderal variations: morphoquantitative aspects. *Int J Tissue React* 1984; 6: 243-9.
- Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21: 697-738.
- Walker JD, Close CF, Jones SL, Rafferty M, Keen H, Viberti G, Osterby R. Glomerular structure in type-1 (insulin-dependent) diabetic patients with normo- and microalbuminuria. *Kidney Int* 1992; 41: 741-8.
- Wanke R (1996) Charakterisierung der renalen Alterationen Wachstumshormon-transgener Mäuse, ein Beitrag zur Morpho- und Pathogenese der progressiven Glomerulosklerose. Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Weibel ER (1979) *Stereological methods*. Academic Press, London, New York.
- Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* 2000; 43: 1498-506.
- Wirsen C. Adrenergic innervation of adipose tissue examined by fluorescence microscopy. *Nature* 1964; 202: 913.
- Yamada T, Kawakami S, Nakanishi N. Fat depot-specific differences in angiogenic growth factor gene expression and its relation to adipocyte size in cattle. *J Vet Med Sci* 2010; 72: 991-7.

Yang H, Galea A, Sytnyk V, Crossley M. Controlling the size of lipid droplets: lipid and protein factors. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24: 509-16.

Youngstrom TG, Bartness TJ. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 1995; 268: R744-51.

Youngstrom TG, Bartness TJ. White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol* 1998; 275: R1488-93.

Zoran DL. Feline obesity: clinical recognition and management. *Compend Contin Educ Vet* 2009; 31: 284-93.

Zoran DL. Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 221-39.

IX. ANHANG

1. Verwendete Materialien für die Herstellung der Kunststoffschritte

1.1. Lösungen für die GMA-MMA-Einbettung

1.1.1. Autotechnikenspüllösung

0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2 (siehe 1.1.2)	1,5	l
Saccharose (Nr. A1125, Applichem, Darmstadt)	105	g
Kaliumchlorid-Dihydrat (Nr.102383, Merck, Darmstadt)	1,105	g
Durchmischen und einstellen auf pH 7,2		

1.1.2. 0,1 M Cacodylatpuffer

Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Nr. A2140, Applichem, Darmstadt)	16,5	g
Destilliertes Wasser	1,5	l
1 molare Salzsäure (Nr. 1040.1000, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg)	6,23	ml
Einstellen auf pH 7,2		

1.1.3. Lösung A

Benzoylperoxid (Nr. 33581, Fluka, Buchs, Schweiz)	338	mg
Methylmethacrylat (Nr. 8005900, Merck Darmstadt)	20	ml
2-Hydroxyethyl-Methacrylat (Nr. 800588, Merck, Darmstadt)	60	ml
Ethylenglycolmonobutylether (Nr. 113102, Serva, Heidelberg)	16	ml
Polyethylenglycol 400 (Nr. 817003, Merck, Darmstadt)	2	ml

1.1.4. Lösung B

Lösung A (siehe 1.1.3)	40	ml
N-N-Dimethylanilin (Nr. 803060, Merck, Darmstadt)	60	µl

1.2. Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Färbung der GMA-MMA-Schnitte**1.2.1. 1% iges HCl-Äthanol**

25%ige Salzsäure (Nr. A0658, Applichem, Darmstadt)	10	ml
96%iges Äthanol (Bundesmonopol für Branntwein, Offenbach a. Main)	700	ml
Destilliertes Wasser	250	ml

1.2.2. Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung

96%iges Äthanol (Bundesmonopol für Branntwein, Offenbach a. Main)	468	ml
Stammlösung Eosin (siehe 1.2.3)	30	ml
Stammlösung Phloxin (siehe 1.2.4)	3	ml
96%ige Essigsäure (siehe 1.2.5)	2,4	ml

1.2.3. Stammlösung Eosin

Eosin gelblich (Nr. A0822, Applichem, Darmstadt)	1	g
Destilliertes Wasser	1	l

1.2.4. Stammlösung Phloxin

Phloxin (Nr. 15926, Merck, Darmstadt)	1	g
Destilliertes Wasser	1	l

1.2.5. 96%ige Essigsäure

Eisessig (Nr. 3738, Carl Roth, Karlsruhe)	96	ml
Destilliertes Wasser	4	ml

1.3. Lösung für die Herstellung der Epoxidharz-Schnitte**1.3.1. Phosphatpuffer nach Sörensen 0,067 M, pH 4,7**

Lösung I (siehe 1.3.2)	80,8	ml
Lösung II (siehe 1.3.3)	19,2	ml
Einstellen auf pH 7,4		

1.3.2. Lösung I

Kaliumdihydrogenphosphat (Nr. 120340250, Merck, Darmstadt)	2,27	g
Ad 250 ml destilliertes Wasser		

1.3.3. Lösung II

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Nr. 105099.1000, Merck, Darmstadt)	11,88	g
Ad 1 l destilliertes Wasser		

1.3.4. Osmiumtetroxid 1%

Osmiumtetroxid 2% (Nr. 006051, ChemPur, Karlsruhe)	5	ml
Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3 (siehe 1.3.5)	2	ml
Salzsäure 0,1 N (Nr. 109060, Merck, Darmstadt)	2	ml
Destilliertes Wasser	1	ml
Saccharose (Nr. 107653, Merck, Darmstadt)	0,45	g

1.3.5. Veronal-Acetat-Puffer, pH 10,3

Veronal (5,5-Diethylbarbitursäure-Natriumsalz, Nr. 6318, Merck, Darmstadt)	2,95	g
Natriumacetat (Nr. 106267, Merck, Darmstadt)	1,94	g
Ad 100 ml destilliertes Wasser		

1.3.6. Epoxidharz-Einbettungslösung

Weiche Mischung (siehe 0)	41,20	g
Harte Mischung (siehe 1.3.8)	75	g
2-4-6-Tris(dimethyl-amino-methyl)phenol (DMP 30; Nr. 3697501, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	1,5	ml

1.3.7. Weiche Mischung

Glycidether 100 (Nr. 2104502, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	38,32	g
Dodecylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) (Nr. 2075501, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	45,30	g

1.3.8. Harte Mischung

Glycidether 100 (Nr. 2104502, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	61,80	g
Methylnadicanhydride (MNA) (Nr. 2945201, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	56,34	g

1.4. Lösung für die Färbung der Epoxidharz-Schnitte

1.4.1. Toluidinblau-Lösung

di-Natriumtetraborat (Nr. 106306, Merck, Darmstadt)	1,0	g
Destilliertes Wasser	100	ml
Toluidinblau (Nr. 36693, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)	0,8	g
Filterieren der Lösung vor Gebrauch		

1.4.2. Safranin O Lösung

di-Natriumtetraborat (Nr. 106306, Merck, Darmstadt)	1,0	g
Destilliertes Wasser	100	ml
Safranin O (1B-463, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster)	1,0	g
Saccharose (Nr. 107653, Merck, Darmstadt)	40	g
37%iges Formaldehyd (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)	250	µl
Filterieren der Lösung vor Gebrauch		

2. Verwendete Materialien für die Färbung der Paraffin-schnitte

2.1. Masson-Trichrom-Färbung der Paraffinschnitte

2.1.1. Weigerts Eisenhämatoxylin

Lösung I (siehe IX.2.1.2)	100	ml
Lösung II (siehe IX.2.1.3)	100	ml

2.1.2. Lösung I

Hämatoxylin kristallisiert	10	g
96%iger Alkohol	1000	ml

2.1.3. Lösung II

Eisen(III)-chlorid	11,6	g
Aqua dest.	980	ml
25%ige Salzsäure	10	ml

2.1.4. Rote Farbe-Gebrauchslösung

Lösung I (siehe IX.2.1.5)	20	ml
Lösung II (siehe IX.2.1.6)	80	ml
Azophloxin-Lösung (siehe IX.2.1.7)	20	ml
Filtrieren der Lösung vor Gebrauch		

2.1.5. Lösung I

Aqua dest., kochen	1000	ml
Säurefuchsin (Rubin S)	5	g
Eisessig	5	ml

2.1.6. Lösung II

Aqua dest., kochen	1000	ml
Xylidine Ponceau	10	g
Eisessig	10	ml

2.1.7. Azophloxin-Lösung

Azophloxin	1,25	g
Aqua dest.	250	ml
Eisessig	0,5	ml

2.1.8. Phosphorwolframsäure-Orange G

Wolframatphosphorsäure-Hydrat	15	g
Orange G	10	g
Aqua dest.	500	ml

2.1.9. Anilinblau

Anilinblau	10	g
Aqua dest.	1000	ml
Eisessig	10	ml

2.1.10. 0,5%ige Essigsäure

Aqua dest.	999,95	ml
Eisessig	0,05	ml

X. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Hermanns danke ich herzlich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die anregenden Gespräche und Diskussionen, seine Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wanke danke ich sehr für die Beratung und Unterstützung bei den quantitativ stereologischen Analysen.

Herrn Dr. Blutke danke ich ganz besonders für die intensive Betreuung und Beratung bei der Planung des Dissertationsvorhabens sowie für die fürsorgliche und ausgesprochen geduldige Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Reese danke ich für die großartige Unterstützung bei den statistischen Auswertungen, für seine Geduld und Hilfsbereitschaft sowie für die konstruktiven Gespräche.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie möchte ich für ihre tatkräftige Hilfe und Freundlichkeit danken. Mein Dank gilt insbesondere Frau Sperling sowie Frau Siebert und Frau Pichl für ihre Unterstützung bei der Herstellung von Kunststoffschnitten. Frau Schmidt danke ich für die gute Zusammenarbeit in der Sektionshalle und die stets aufmunternden Worte. Frau O’Gorman danke ich für die Hilfe in allen formellen Angelegenheiten.

Herrn Moll danke ich herzlich für die großartige Unterstützung bei EDV-Problemen und -Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für ihren bedingungslosen Rückhalt in jeder Lebenssituation sowie für die aufbauenden und ermunternden Gespräche, die mich darin bestärkt haben, diese Arbeit zu beenden. Vor allem möchte ich meiner Mutter für die zahlreichen Stunden danken, in denen sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und die sie mit der Durchsicht dieser Arbeit verbracht hat.