

Zentrum für Innere Medizin, Klinik II

Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie
und Stoffwechselkrankheiten

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Georg Lamprecht

Experimentelle Studien zur Störung der Darmbarriere bei cholestatischer Lebererkrankung

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen
Grades Doktor der Medizin
der
Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von:

Leonard Netz, geb. am 14.12.1996 in Düsseldorf
Rostock, September 2023

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004721



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Weitergabe unter gleichen
Bedingungen 4.0 International Lizenz.

Verteidigung am 27.02.2024

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Brigitte Vollmar

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ali Aghdassi

3. Gutachter: Prof. Dr. Robert Jaster

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Cholestase	1
1.1.1	Ätiologie	2
1.1.2	Pathophysiologie	2
1.1.3	Diagnostik.....	3
1.1.4	Therapie	3
1.2	Darmbarriere	4
1.2.1	Aufbau	4
1.2.2	Aufbau der Tight-Junctions (TJs)	5
1.2.3	Transepithelialer elektrischer Widerstand	6
1.2.4	Störung der Darmbarriere.....	6
1.3	Tiermodelle	7
1.3.1	<i>Bile-duct-ligation</i> (BDL)-Modell.....	8
1.3.2	Modelle mit hepatotoxischen Substanzen.....	8
1.3.3	Genetische Modelle	8
1.4	Ghrelin	9
1.4.1	Ursprung.....	9
1.4.2	Aufbau und Bildungsort	9
1.4.3	Wirkung.....	9
1.5	Ziele	12
2	Methoden.....	12
2.1	Mausmodell.....	12
2.1.1	Haltung.....	13
2.1.2	Gruppeneinteilung	13
2.1.3	Ablauf der Operation	14
2.1.4	Versuchsablauf	14

2.1.5	Tierversuche mit abweichenden Rahmenbedingungen	15
2.1.6	Ablauf Entnahme	16
2.2	Ussing-Kammer-Versuch	17
2.2.1	Ablauf Versuchsstart	17
2.2.2	Aufbau der Ussing-Kammer	17
2.2.3	Widerstands Messungen.....	18
2.2.4	FITC-Dextran Assay.....	19
2.3	Histologische Arbeiten	20
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen	20
2.3.2	Immunhistochemie-Färbung.....	21
2.3.3	Siriusrot-Färbung.....	23
2.4	Genexpressionsanalysen	23
2.4.1	mRNA-Isolation	23
2.4.2	Photometrische Erfassung der RNA-Menge	24
2.4.3	cDNA-Gewinnung durch reverse Transkription.....	24
2.4.4	Ablauf Echtzeit-PCR (TaqMan).....	25
2.5	Blutanalyse	27
2.6	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Gewichtsverläufe	28
3.2	HE-Färbungen	29
3.2.1	Qualitative Auswertung der HE-Leber Färbung	29
3.2.2	Vermessung der Mukosa und Zottenlänge an HE-Färbungen des Duodenums	31
3.3	Siriusrot-Färbung	34
3.4	Transmurale Widerstandsmessungen der Darmwand	35
3.4.1	Transmurale Widerstände von BDL- und sham-Tieren	35
3.4.2	Transmurale Widerstände von den Therapiegruppen	36

3.5	FITC-Dextran Assay	37
3.5.1	Parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie	38
3.5.2	Parazelluläre Permeabilität von Kolon der Therapiegruppen	40
3.6	Immunhistochemie-Färbungen	41
3.6.1	CD3e-Färbung am Darm.....	41
3.6.2	CD11b-Färbung am Darm.....	43
3.7	Echtzeit-PCR.....	45
3.7.1	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Jejunum.....	45
3.7.2	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Kolon	48
3.8	Blutanalyse	50
3.8.1	Elektrolyte	50
3.8.2	Enzyme und Proteine	51
3.8.3	Lipide.....	53
3.8.4	Metabolite.....	54
4	Diskussion.....	56
4.1	Gewichtsverläufe.....	56
4.2	Leber-Histologie.....	57
4.2.1	HE-Färbungen.....	57
4.2.2	Siriusrot-Färbungen.....	57
4.3	Darm-Histologie.....	58
4.3.1	HE-Färbungen.....	58
4.3.2	Immunhistochemie-Färbungen.....	58
4.4	Transmurale Widerstände	59
4.5	FITC-Dextran-Assay.....	60
4.6	Genexpressionsanalyse	62
4.6.1	Genexpressionsanalyse im Jejunum	62
4.6.2	Genexpressionsanalyse im Kolon.....	63

4.7	Blutanalyse	63
4.7.1	Elektrolyte	63
4.7.2	Enzyme und Proteine	64
4.7.3	Lipide	65
4.7.4	Metabolite	65
4.8	Integrative Betrachtungen	66
4.8.1	Auswirkungen der BDL	66
4.8.2	Wirkung von Ghrelin	67
5	Zusammenfassung	69
6	Thesen	72
7	Literaturverzeichnis	73
8	Anhang	84
8.1	Tabellenverzeichnis	84
8.2	Bilderverzeichnis	84
8.3	Abkürzungsverzeichnis	85
8.4	Materialien	87
8.4.1	Geräte	87
8.4.2	Software	88
8.4.3	Verbrauchsmaterialien	88
8.4.4	Substanzen, Lösungen und Puffer	89
8.5	Curriculum vitae	91
8.6	Danksagung	92
8.7	Eidesstattliche Erklärung	93

1 Einleitung

1.1 Cholestase

Der Leber kommen als größter Drüse des Körpers viele Aufgaben zu. Sie übernimmt umfassende Funktionen im Aminosäure-, Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Fast das gesamte Blut, das im Darm mit Nährstoffen, aber auch Toxinen angereichert wird, durchläuft die Leber. Mittels Biotransformation werden Toxine unschädlich gemacht und wasserunlösliche Stoffe, wie zum Beispiel Steroide oder manche Medikamente, mit Gallensäuren konjugiert (*first pass effect*). So können sie wasserlöslich in die Gallengänge sezerniert werden (Klinke und Silbernagl 2003).

Die Leber produziert täglich 600 bis 700 ml Primärgalle, bestehend aus Gallensalzen, Phospholipiden, Bilirubin (Gallenfarbstoff) und Cholesterin gelöst in Wasser. Der Elektrolytgehalt der Galle gleicht dabei annähernd dem des Blutplasmas (Arastéh et al. 2018).

Die Galle wird von Hepatozyten in Gallenkanälchen (*canaliculi biliferi*) sezerniert und über interlobuläre Gallengänge (*ductuli interlobularis*) im Hauptgang (*ductus hepaticus communis*) zusammengeführt. In der Gallenblase wird überschüssige Galle gespeichert, bis auf das 10-fache konzentriert und bei Bedarf zu Mahlzeiten über den *ductus choledochus* in das Duodenum sezerniert. Bei Obstruktion oder Einschränkung der Sekretion aus Leber oder Gallenblase spricht man von Gallestau oder Cholestase.

Es werden zwei Formen der Cholestase unterschieden: Bei der intrahepatischen Cholestase liegt der Defekt der Exkretion in der Leber, während er bei der extrahepatischen Cholestase in den großen Gallenwegen liegt (Klinke und Silbernagl 2003). Klinische Folgen des Gallestaus sind meist ein Ikterus (Gelbsucht), Pruritus (Juckreiz), dunkler Urin sowie heller Stuhl (Arastéh et al. 2018). Die Symptome sind auf die einzelnen Komponenten der Galle zurückzuführen. Eine Konzentration von mehr als 3mg/dL Bilirubin im Blut führt zur Gelbfärbung der Haut und die Gallensäuren können einen Juckreiz hervorrufen. Das vermehrt über die Niere sezernierte Urobilin und Sterkobilin färben den Urin dunkel und lassen bei fehlender Beimischung den Stuhl hell erscheinen (Arastéh et al. 2018).

Ebenfalls gestört ist der enterohepatische Kreislauf. Dieser Vorgang beschreibt die Wiederaufnahme und Wiederverwendung von sezernierten Gallensäuren über die Darmwand im terminalen Ileum (Blesl und Stadlbauer 2021). Üblicherweise durchlaufen die Gallensäuren diesen Kreislauf ca. 10-mal am Tag. Eine geringe Menge wird nicht resorbiert und stattdessen über den Stuhl abgegeben. Die dadurch verlorenen Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin neu gebildet (Arastéh et al. 2018).

1.1.1 Ätiologie

Unterschieden werden obstruktive und nicht-obstruktive Ursachen der Cholestase. Zu den obstruktiven Ursachen zählen insbesondere Cholelithiasis (Gallensteine), Tumore der Leber oder des Pankreas sowie Metastasen. Seltener hat die Cholestase einen kongenitalen Ursprung, wie zum Beispiel die Gallengangsatresie (Nguyen et al. 2014). Zu den nicht-obstruktiven Ursachen zählen unter anderem die primär biliäre Cholangitis (PBC), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) oder eine Zirrhose als Folge von Lebererkrankungen (sekundäre Zirrhose) (Hasegawa et al. 2021). Einige Beispiele für eine sekundäre Zirrhose sind die Virushepatitis, Alkoholhepatitis oder die Medikamenten-induzierte Zirrhose (Visentin et al. 2018). Die progressive familiäre intrahepatische Cholestase, die intrahepatische Cholestase bei Schwangerschaft und *Graft vs. Host disease* nach Lebertransplantation sind als seltene Ursachen zu nennen (Nakanishi und Saxena 2015; Nguyen et al. 2014). Trotz unterschiedlicher Pathophysiologie gleichen sich diese Erkrankungen in einer gemeinsamen Endstrecke. Bei allen kommt es bei voranschreitendem Entzündungsgeschehen zur Leberzirrhose. Der Leberzirrhose schließt sich im weiteren Verlauf häufig eine Cholestase an, sofern sie der Zirrhose nicht ohnehin bereits vorangeht (Hasegawa et al. 2021).

1.1.2 Pathophysiologie

Unabhängig von der Ursache für die Cholestase hat der Gallestau auf Dauer erhebliche Folgen für die Leber und die restlichen Organe des Körpers. Die Galle hat zytotoxische Eigenschaften. Mit voranschreitender Zeit beginnt in der Leber ein Zelluntergang. Die Kupffer-Sternzellen, ortsständige Makrophagen der Leber, setzen daraufhin Zytokine frei, welche eine Einwanderung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in das Gewebe verursachen (Klinke und Silbernagl 2003). Dadurch schreitet der Entzündungsprozess weiter voran. Die abgestorbenen Hepatozyten werden durch Bindegewebe ersetzt. Diese bindegewebigen Narben der Leber haben keine Stoffwechselfunktion und schränken zusätzlich durch Unterbrechung der Gallenwege die Sekretion der Leber ein. Der Ersatz von Hepatozyten durch Narbengewebe nach entzündlichen Prozessen nennt sich Leberfibrose (Arastéh et al. 2018). Die fortschreitende Leberfibrose reduziert die Entgiftungsleistung der Leber und beschleunigt so den Entzündungsprozess (Nakanishi und Saxena 2015).

Durch den fehlenden Abfluss der Galle kommt es zu einem Rückstau und zu einem Anstieg des portalvenösen Drucks. In Kombination mit einer geringeren Albumin-Produktion kann dies zu Wassereinlagerungen im Bauchraum führen (Aszites) (Arastéh et al. 2018).

Die Gallensäuren sind wichtig für die Aufnahme von Fetten und fettlöslichen Vitaminen. Hält dieser Zustand der Malnutrition über längere Zeit an, kann er in Kombination mit den erheblichen entzündlichen Prozessen bei kataboler Stoffwechsellage zur Kachexie führen (Arastéh et al. 2018). Wenn die Cholestase frühzeitig behoben wird und die Schäden in der Leber gering geblieben sind, hat das Organ häufig eine gute Chance, sich wieder zu erholen. Wird die Cholestase nicht behoben, oder ihre Symptomatik unbehandelt gelassen, verläuft sie in Abhängigkeit von der Grunderkrankung potenziell letal (Arastéh et al. 2018).

1.1.3 Diagnostik

Die Cholestase macht sich zuerst durch ihre klinischen Symptome bemerkbar. Der Ikterus wird dabei am häufigsten vom Patienten wahrgenommen. Er ist schon früh an den Skleren und Schleimhäuten zu erkennen (Fargo et al. 2017). Liegt eine extrahepatische Obstruktion vor, ist die Cholestase meist von kolikartigen Schmerzen begleitet (Arastéh et al. 2018). Der Verdacht auf Cholestase lässt sich durch Bestimmung der Cholestaseparameter im Blut bestätigen. Dazu zählen die Aktivitäten von Gamma-Glutamyltransferase (γ -GT) und Alkalischer Phosphatase (AP), sowie die Konzentration des Gesamtbilirubins und indirekten Bilirubins (Fargo et al. 2017). Obstruktiver Gallestau lässt sich meist schon mithilfe der Sonografie nachweisen. Im Falle einer Choledocholithiasis ist es möglich, den Gallenstein in einer endoskopischen retrograden Choledochografie (ERC) darzustellen und im selben Eingriff gegebenenfalls zu entfernen (Arastéh et al. 2018).

1.1.4 Therapie

Liegt eine gutartige extrahepatische Obstruktion vor, so lässt sie sich in den meisten Fällen durch eine Operation (ERC) beheben (Farah et al. 2008). Im Falle einer intrahepatischen Obstruktion ist es wichtig, das Entzündungsgeschehen zu mindern, bis sich das Organ erholt hat. Für einige Lebererkrankungen gibt es keine kurative Therapie, wie zum Beispiel die PBC und PSC (Appanna und Kallis 2020). Als einzige Aussicht auf langfristige Besserung bleibt die Durchführung einer Lebertransplantation. Bei Vorliegen einer PBC lässt sich der Zeitpunkt der Transplantation mit Ursodeoxycholsäure um mehrere Jahre hinauszögern (Hasegawa et al. 2021). Das Medikament ist selbst eine tertiäre Gallensäure und löst Cholesterin-Gallensteine auf. Es wirkt antiinflammatorisch auf die Leber und verlangsamt den Progress der Krankheit. Leider konnte noch kein positiver Effekt des Medikamentes bei anderen cholestatischen Krankheiten nachgewiesen werden (Lindor et al.). Neben kurativen Therapien gilt es, die Folgen der Cholestase zu lindern. Die verminderte Aufnahme von fettlöslichen Vitaminen muss durch eine intravenöse Substitutionstherapie abgefangen werden.

1 Einleitung

(Appanna und Kallis 2020). Bei chronischem Leberleiden und häufig auftretendem Aszites aufgrund von erhöhtem portalvenösem Druck ist es möglich, einen transjugularen intrahepatischen portosystemischen Shunt (TIPS) zu implantieren. Dieser bildet einen Umgehungskreislauf um die Leber und senkt so den Druck im portalvenösen System (Kurmis 2009). Der TIPS ist allerdings nur eine Übergangstherapie, bis eine Lebertransplantation durchgeführt werden kann. Die Umgehung der Leber bedeutet gleichzeitig eine Reduktion der Entgiftungsfunktion. Als Folge kann es zur hepatischen Enzephalopathie kommen (Arastéh et al. 2018).

1.2 Darmbarriere

Der Darm stellt mit seiner Länge und seiner vielfach gefalteten Struktur den größten Flächenanteil des menschlichen Körpers zur Außenwelt dar (Klinke und Silbernagl 2003). Diese Fläche von bis zu ca. 40 m² ist einerseits notwendig für die effektive Aufnahme von Nährstoffen und Wasser, bedeutet andererseits aber auch ein Risiko für die Gesundheit (Klinke und Silbernagl 2003). Anatomisch wird der Darmtrakt in vier Abschnitte von oral bis aboral eingeteilt: Duodenum, Jejunum und Ileum (Dünndarm) sowie Kolon (Dickdarm). Diese Abschnitte unterscheiden sich in ihrem funktionellen und histologischen Aufbau (Arastéh et al. 2018). Der gesamte Darm ist von einer Vielzahl verschiedener Bakterienarten besiedelt (Arastéh et al. 2018). Die meisten Bakterien helfen dem Körper bei der Verdauung. Gelangen sie oder ihre Toxine in den Körper, können sie jedoch erheblichen Schaden anrichten (Blesl und Stadlbauer 2021). Die Darmbarriere bietet Schutz, ermöglicht aber gleichzeitig die verlustarme Aufnahme von Nährstoffen und Wasser.

1.2.1 Aufbau

Der Begriff Darmbarriere umfasst folgende Strukturen: Mukus, Darmbakterien, Epithelzellen und dendritische Zellen (Turner 2009). In der äußersten Schicht befindet sich der Schleim, der von den Becherzellen produziert wird (Arastéh et al. 2018). Der Mukus ist dicht mit Darmbakterien besiedelt und bedeckt die Epithelzellen. Zwischen den Epithelzellen befinden sich verschiedene Verbindungskomplexe mit unterschiedlichen Funktionen. Dazu zählen Zonula adhaerens (engl.: *adherens junction*), Desmosome, Nexus (engl.: *gap junctions*) und Zonula occludens. Letztere werden auch Tight-Junctions (TJs) genannt (Abbildung 1-1) (Klinke und Silbernagl 2003; Turner 2009). Die vorliegende Arbeit fokussiert sich besonders auf TJs, da diese vor allem mit der Dichtigkeit einer Zell-Zell-Verbindung assoziiert werden (Zeisel et al. 2019; Turner 2009; Anderson und van Itallie 2009; Schneeberger und Lynch 2004). Der Wandaufbau in den vier Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon) unterscheidet sich sowohl histologisch als auch molekular. Je nach Abschnitt sind

sowohl die Verteilung von Immunzellen, sezernierenden Zellen und Epithelzellen als auch die Verteilung von dichten und kanalikulären TJs (siehe 1.2.2) unterschiedlich (Arastéh et al. 2018; Fujita et al. 2006; Garcia-Hernandez et al. 2017).

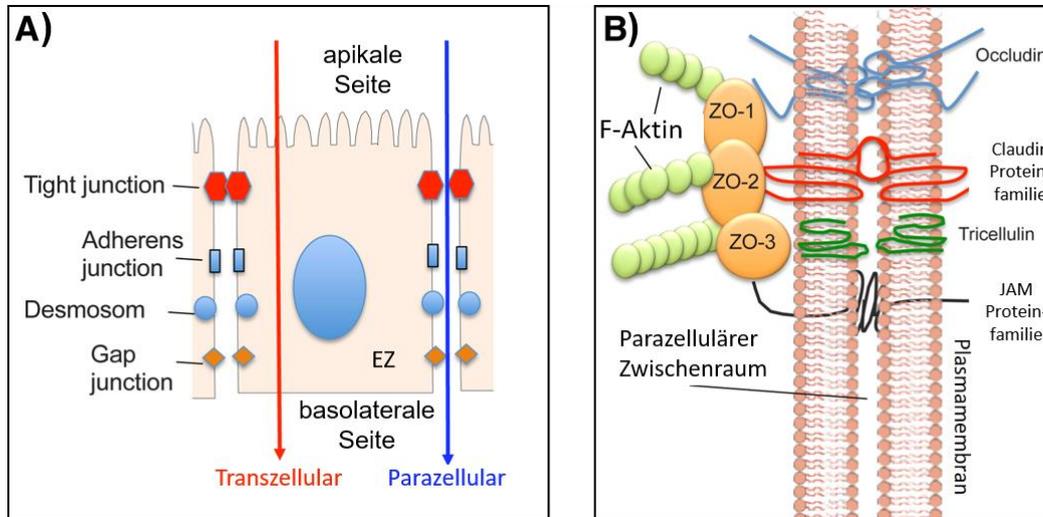


Abbildung 1-1 – Aufbau der Tight Junctions: vereinfachte schematische Darstellung der Lage der zellulären Übergänge in nebeneinander liegenden Epithelzellen (EZ). Die tight Junctions (TJs) bilden die apikalste Verbindung und verbinden seitlich benachbarte Zellen im Epithel miteinander. TJs ermöglichen die selektive Diffusion von Flüssigkeiten, Elektrolyten und kleinen Molekülen durch den parazellulären Raum und bilden gleichzeitig eine hochselektive Barriere für größere Moleküle, wodurch die parazelluläre Permeation von Ionen und anderen Molekülen reguliert wird. Adhärenz junctions sind an der Zell-Zell-Adhäsion und der intrazellulären Signalübertragung beteiligt. Andere basolaterale epitheliale Verbindungen sind Desmosomen und gap junctions, die an der Zell-Zell-Adhäsion bzw. der intrazellulären Kommunikation beteiligt sind. B) TJs bestehen aus mehreren Arten von Occludinen, JAM-Proteinen (engl.: junctional adhesion molecule) und Mitgliedern der Claudin-Proteinfamilie, die die Ladungsselektivität der TJ beeinflussen. Bei all diesen Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine, die intermolekulare und interzelluläre Verbindungen innerhalb des parazellulären Raums bilden. Alle transmembranen Junctionsproteine interagieren mit intrazellulären Gerüstproteinen (wie ZO-1, -2 und -3), die mit anderen Proteinen, einschließlich Aktin im Zytoskelett, interagieren. Grafik und Beschriftung übersetzt aus (Wells et al. 2017).

1.2.2 Aufbau der Tight-Junctions (TJs)

Die TJs setzen sich aus einzelnen TJ-Proteinen zusammen. Zu ihnen gehören die Familie der Claudine und das Protein Occludin. Die TJ-Proteine sind intrazellulär mit dem Cytoskelett verankert und bilden extrazellulär untereinander Verbindungen (Schneeberger und Lynch 2004). Diese Verbindungen liegen meist apikal an Epithelzellen. Die TJs sind für Moleküle größer als 2 kDa undurchlässig (Klinke und Silbernagl 2003). Dadurch tragen sie zu dem Aufrechterhalten des baso-apikalen Transmembranpotentials bei und gewährleisten eine physische Dichtigkeit (Zeisel et al. 2019). Es wurde beobachtet, dass unterschiedliche Kombinationen der TJ-Proteine die selektive und allgemeine parazelluläre Durchlässigkeit der TJ für bestimmte Moleküle oder Ionen verändern

1 Einleitung

können (Tabelle 1-1) (Schneeberger und Lynch 2004; van Itallie et al. 2003; van Itallie et al. 2001). Es wird zwischen dichten und kanalikulären TJs unterschieden (eng.: *tight- / pore-tight-junctions*). Die Transkription der Gene der TJ Proteine wird u. a. durch Mikro-RNAs reguliert und unterscheidet sich in ihrer Ausprägung je nach Organfunktion und Bedarf des Organismus (Cichon et al. 2014).

Tabelle 1-1 – Übersicht von Funktionen ausgewählter Tight-Junction-Proteine

Name	Eigenschaften	Quelle
Claudin 2	Erhöht Durchlässigkeit von <i>Monolayer* in-vitro</i>	(van Itallie et al. 2003)
Claudin 4	Erhöht Dichtigkeit von <i>Monolayer* in-vitro</i>	(van Itallie et al. 2001)
Claudin 7	Erhöht Dichtigkeit von <i>Monolayer* in-vitro</i> ; bildet Parazelluläre Cl ⁻ -Barriere und Na ⁺ -Pore	(Alexandre et al. 2005)
Claudin 15	Erhöht Dichtigkeit von <i>Monolayer* in-vitro</i> ; erhöht Parazelluläre Cl ⁻ -Durchlässigkeit und reduziert Na ⁺ -Durchlässigkeit	(van Itallie et al. 2003)
Occludin	scheint Dichtigkeit zu erhöhen, genaue Funktion noch unklar	(Krause et al. 2008)
ZO-1 (Zonula Occludens-1)	„Gerüstprotein“; bindet an Aktin in der Zelle und an anliegende Proteine	(Umeda et al. 2006)

**Monolayer*: Im Labor gezüchtetes Epithel, bestehend aus nur einer Zellschicht.

1.2.3 Transepithelialer elektrischer Widerstand

Die Durchlässigkeit der Darmwand für Ionen lässt sich mithilfe des transepithelialen elektrischen Widerstandes (eng.: *transepithelial electrical resistance* = TEER) annäherungsweise bestimmen. Dabei wird ein bekannter Strom über dem Gewebe angelegt und die Spannung gemessen. Der TEER lässt sich dann mithilfe des Ohm'schen Gesetzes errechnen. Je geringer der Widerstand ist, desto durchlässiger ist das Epithel für Ionen (Klinke und Silbernagl 2003). Der TEER ist ein häufig genutzter Wert um die Integrität der Darmbarriere zu beschreiben. Dabei ist wichtig zu beachten, dass der TEER sowohl vom parazellulären als auch transzellulären Ionenfluss abhängig ist (Clarke 2009).

1.2.4 Störung der Darmbarriere

Unter einer Darmbarrierestörung versteht man den Verlust der Fähigkeit das Körperinnere vom äußeren Milieu im Darmlumen adäquat zu trennen. So kann es bei einer verminderten Darmbarrierefunktion sowohl zum unregelmäßigen Austritt von körpereigenen Stoffen (Elektrolyte und Wasser) als auch zum Eindringen körperfremder Substanzen (Bakterien und Toxine) kommen (Arastéh et al. 2018). Dabei liegt der Defekt meist in den Zell-Zell-Verbindungen. Es werden fehlende

oder dysfunktionale TJs als Ursache vermutet (Blesl und Stadlbauer 2021; Turner 2009). Eine Änderung der Expression mehrerer TJ-Proteine in Mäusen wurde bereits bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen. So kam es zum Beispiel bei Morbus Crohn in Mäusen zu einer erhöhten Expression von Claudin 1 und 2, und einer geringeren Expression von Claudin 3, 5, 8 und 12 (Weber et al. 2008; Zeissig et al. 2007; Lameris et al. 2013). Bei Mäusen mit Colitis ulcerosa wurde eine erhöhte Expression von Claudin 1, 2, und 18 festgestellt (Prasad et al. 2005; Weber et al. 2008) und eine verringerte Expression von Claudin 3, 4 und 7 (Lameris et al. 2013; Oshima et al. 2008). Bei beiden Krankheiten ist eine erhöhte Durchlässigkeit der Darmbarriere sowohl für Bakterien als auch Wasser beschrieben (Mankertz und Schulzke 2007; Lameris et al. 2013). Eine Beeinflussung der Expression von TJ-Proteinen durch Cholestase ist ebenfalls bereits bekannt. In einer klinischen Studie von Assimakopoulos et al. wurde in Biopsien des Duodenums von Patienten mit Ikterus eine signifikant geringere Expression der Proteine Occludin, Claudin 1 und 7 und eine erhöhte Expression von Claudin 4 festgestellt (Assimakopoulos et al. 2011).

Als Auslöser einer Expressionsänderung werden Entzündungsmediatoren vermutet. Grund für eine mediorenvermittelte Expressionsänderung der TJs kann neben einer Autoimmunerkrankung eine Dysbakteriose, Infektion, Antibiotikatherapie oder Alkoholabusus sein (Blesl und Stadlbauer 2021). Das daraus resultierende Phänomen des „undichten“ Darms wird „*leaky gut*“ (eng.: durchlässiger Darm) genannt (Camilleri 2019). Dabei können Bakterien die Darmwand durchschreiten und in das Gefäßsystem eindringen. Über die Portalvenen gelangen sie in die Leber. Siedeln sie sich dort an, fördern sie entzündliche Prozesse. Auf Dauer können eine Leberzirrhose, Cholestase und geminderte Gallensäuresekretion die Folge sein. Die Gallensäuren haben eine protektive Wirkung auf die Darmbarriere (Fukui und Wiest 2016). Fällt sie weg, setzt sich ein *circulus vitiosus* in Gang, bei dem sowohl die Darmbarriere als auch die Leberfunktion weiter beeinträchtigt werden. Folgen einer stark beeinträchtigten Darmbarriere und Leberfunktion sind Sepsis und Tod (Arastéh et al. 2018).

1.3 Tiermodelle

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Cholestase auf die Darmbarrierefunktion bieten sich Tiermodelle an. Tiermodelle haben gegenüber *in-vitro*-Versuchen den Vorteil der Betrachtung von Pathomechanismen in lebensnaher Konstellation und stehen so dem Ablauf der eigentlichen Krankheit näher als ein *in-vitro*-Aufbau (O'Brien et al. 2016; Liedtke et al. 2013). Einige relevante Tiermodelle werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

1.3.1 Bile-duct-ligation (BDL)-Modell

Eines der ältesten Modelle zur Untersuchung von Cholestase ist die Gallengangsligatur (*Bile-duct-ligation*; BDL). Die ersten Entwürfe dieses Modells wurden an Ratten durchgeführt (Cameron und Oakley 1932). Unter Narkose wurde den Tieren nach Laparotomie der Gallengang doppelt ligiert und durchtrennt. Folge war ein akuter Gallestau bei den operierten Tieren. Nach einer Zeit von ungefähr 4 Wochen zeigte sich bei den Ratten in der Leberhistologie Fibrose mit anschließender Zirrhose (Kountouras et al. 1984). Bei Mäusen beginnt dieser Prozess deutlich früher. Bei ihnen setzt die Zirrhose nach eineinhalb bis zwei Wochen ein (Georgiev et al. 2008). Als Ursache wird vermutet, dass Ratten ohne Gallenblase besser an Cholestase adaptiert sind (Liu et al. 2013). Zu den Vorteilen des BDL-Modells zählen seine gute Reproduzierbarkeit und relativ kurze Versuchslaufzeit. Bei Mäusen beträgt diese häufig nicht länger als 2 bis 3 Wochen (Georgiev et al. 2008).

1.3.2 Modelle mit hepatotoxischen Substanzen

Eine weitere Möglichkeit, Leberschäden zu induzieren, ist die Verwendung von Lebernoxen. Am bekanntesten ist dabei der Wirkstoff Carbon Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4). Dieser wird den Mäusen über längere Zeit regelmäßig verabreicht. In der Leber wird CCl_4 zu Trichlormethan umgesetzt. Dieser Metabolit hat eine toxische Wirkung und ruft eine Entzündungsreaktion hervor. Nach 4 bis 6 Wochen entwickelt sich bei den Versuchstieren eine Leberzirrhose. Es wurde eine unterschiedlich starke Ausprägung der Leberzirrhose zwischen verschiedenen Mausstämmen festgestellt, sodass ein Vergleich zwischen verschiedenen Mausstämmen nur eingeschränkt möglich ist (Liedtke et al. 2013). Tetrachlorkohlenstoff kann über variable Zeiträume und auf unterschiedlichen Wegen appliziert werden (inhalativ; intragastrische, subkutane oder intraperitoneale Injektion) (Liedtke et al. 2013). Dadurch sind Anpassungen des Modells an unterschiedliche Fragestellungen bezüglich des Verlaufes und Schweregrades der chronischen Lebererkrankungen möglich.

Es existieren weitere Noxen, die sich durch die möglichen Applikationsformen, ihre Lebertoxizität und die resultierenden Fibrosemuster unterscheiden. Einige Beispiele sind: Thioacetamid (TAA), Dimethyl- oder Diethylnitrosamin (DMN und DEN), α -Napthothylisothiocaynit (ANIT) und 3,5-Diethoxy-carbonyl-1,4 Dihydroxycollodin (DDC) (Liu et al. 2013; Liedtke et al. 2013).

1.3.3 Genetische Modelle

Eine weitere Variante von Schädigungsmodellen bieten GEMMs (eng.: *genetically engineered mouse models*). Häufig beruhen die Modelle auf der Einschränkung der Leberfunktion durch Knockout (KO) verschiedener Gene in genmodifizierten Mausstämmen. Nach Ausschalten der Gene entwickeln die

Tiere dann das Vollbild oder zumindest einzelne Symptome einer Leberzirrhose. Ein Beispiel hierfür ist das *multi-drug-resistant gene 2 (MDR2)*. Nach Inaktivierung dieses Gens in Mäusen wurde eine geringere Sekretion von Phosphatidylcholin festgestellt. In Folge der dauerhaft niedrigen Phospholipid-Spiegel entwickelt sich eine Cholangitis. Die fortschreitende Entzündung beginnt kurz nach der Geburt und erreicht nach 3 bis 6 Monaten ihre volle Ausprägung in Form einer Zirrhose (Liedtke et al. 2013).

GEMMs eignen sich zur Untersuchung individueller Gene und der von ihnen kodierten Proteine (Mariotti et al. 2018).

1.4 Ghrelin

1.4.1 Ursprung

Ghrelin wurde ursprünglich als Stimulans des GHS-R 1a (*Growth hormone secretagogue-Receptor*) entdeckt. Der Name des Peptids leitet sich sowohl von dieser Funktion (*Growth Hormone Release Inducing*) als auch dem proto-indo-europäischen Wortursprung „ghre“ für wachsen ab (Kojima et al. 1999).

1.4.2 Aufbau und Bildungsort

Als Hauptbildungsort wurden die Belegzellen des Magens sowie die ϵ -Zellen des Pankreas identifiziert (Kojima et al. 1999). Es wird eine Abhängigkeit der Ghrelinsekretion von parasympathischer Stimulation durch den Vagusnerv vermutet (Williams et al. 2003). Geringere Mengen einer Vorstufe des Hormons werden in Hypothalamus und Hypophyse produziert (Yanagi et al. 2018). Ghrelin ist ein 28 Aminosäuren langes Peptid, wobei Serin an der dritten Stelle O-acyliert ist. Die O-Acylierung ist essenziell für die Bindungsaktivität des Peptids (Zhao et al. 2010) und geschieht durch das Enzym Ghrelin O-Acyltransferase.

1.4.3 Wirkung

Nach Isolierung des Peptids und Verabreichung in Tierversuchen zeigte sich in fast allen Studien eine stark erhöhte Nahrungsaufnahme bei den Tieren (Pradhan et al. 2013; Tschöp et al. 2000; Asakawa et al. 2001). Eine erhöhte Sekretion des Hormons unter Fastenbedingungen und vor Mahlzeiten ließ es als das „Hungerhormon“ bekannt werden (Pradhan et al. 2013). Es zeigte sich jedoch kein verändertes Essverhalten bei Knockout-Mäusen ohne Ghrelin-Produktion oder GHS-R 1a. Dies verstärkte die Annahme, dass das Hormon nicht zwingend für die Regulierung der

1 Einleitung

Nahrungsaufnahme notwendig ist, sondern vielmehr den Organismus darauf vorbereitet (Yanagi et al. 2018; Sun et al. 2003; Sleeman und Spanswick 2014).

In einer Tierversuchsstudie wurde anästhesierten Ratten Ghrelin intravenös verabreicht und im Verlauf die Magenmotilität mittels Ballonmanometrie und die Magensäuresekretion gemessen. Die Tiere zeigten unter Ghrelin-Therapie vermehrte Magensäuresekretion und Magenmotilität (Masuda et al. 2000).

Bei Knockout der Ghrelinproduktion in ob/ob-Mäusen (von engl.: *obese* = übergewichtig) zeigten die an Diabetes erkrankten Tiere eine erhöhte Insulin-Sekretion und geminderten Blutzucker gegenüber den reinen ob/ob-Mäusen (Sun et al. 2006). Dem gegenüber steht eine verringerte Insulin Sekretion und verstärkte Diabetes-Symptomatik in Mäusen mit *GHS-R* Knockout (Ma et al. 2012). Die Hintergründe dieser gegenteiligen Wirkung wurden noch nicht abschließend geklärt. Als mögliche Erklärung werden unterschiedliche Plasmaglukosespiegel der Tiere im Versuchsaufbau diskutiert. Die Insulinsekretion wird von der Plasmaglukosekonzentration beeinflusst, was den Effekt von Ghrelin verschleiern kann. Ein Einfluss von Ghrelin auf den Glukosehaushalt ist jedoch eindeutig.

Ghrelin spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der Regulierung des Energiehaushaltes: C57BL/6J-Mäusen, denen Ghrelin-Antikörper verabreicht wurden, nahmen weniger Nahrung auf als Tiere der Kontrollgruppe, verbrauchten mehr Sauerstoff und strahlten mehr Hitze ab (Zakhari et al. 2012). Mäuse ohne *GHS-R* wogen meist weniger als Tiere der Kontrollgruppen (Sun et al. 2004; Lin et al. 2011). Bei ihnen ließ sich außerdem eine erhöhte Körperkerntemperatur messen (Lin et al. 2011).

Nach Ghrelinzugabe wurde *in-vitro* eine Proliferation von Osteoblasten dokumentiert (Fukushima et al. 2005). Zusätzlich dämpfte Ghrelin in Mäusen mit Lungenkrebs den Muskelabbau (Tsubouchi et al. 2014). Dieser Effekt wurde auch bei Mäusen mit einer Angiotensin-II-induzierten Kachexie beobachtet (Sugiyama et al. 2012).

Ghrelin KO-Mäuse hatten nach Koronarligatur eine signifikant höhere Herzfrequenz als die Wildtyp Mäuse. Eine Ghrelintherapie senkte die sympathische Nervenaktivität am Herzen und hob so diesen Effekt auf (Mao et al. 2012). Daher wird eine kardioprotektive Wirkung von Ghrelin vermutet.

Es wird vermutet, dass Ghrelin eine entzündungshemmende Wirkung hat. In BDL-Ratten, die mit Ghrelin behandelt worden waren, wurden geringere Flächen von fibrosiertem Leber-Gewebe gemessen als in unbehandelten Tieren. Dies legt einen Einfluss des Hormons auf Fibrosierungs- und Entzündungsprozesse nahe (Moreno et al. 2010). In *Ghr*^{-/-} Mäusen, in denen eine Leberfibrose mit CCl₄ induziert wurde, konnte eine größere Fläche von fibrosiertem Lebergewebe gemessen werden als in *Ghr*^{+/+} Mäusen, die ebenfalls CCl₄ erhalten hatten (Moreno et al. 2010; Yanagi et al. 2018). In

mehreren Studien zeigte Ghrelin durch die entzündungsmindernde Wirkung eine Stärkung der Darmbarriere in Mäusen mit Colitis. (Cheng et al. 2015; Gonzalez-Rey et al. 2006; Maduzia et al. 2015; Matuszyk et al. 2016; Wu et al. 2009). In einer Studie von Gonzalez-Rey et al. wurde die Wirkung von Ghrelin bei Mäusen mit TNBS (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid Solution) induzierter Colitis bewertet. Dabei wurden nach Ghrelintherapie eine verminderte inflammatorische Reaktion, vermittelt durch vermehrt auftretende regulatorische T-Zellen, sowie ein deutlicher Rückgang der Erkrankungsschwere festgestellt (Gonzalez-Rey et al. 2006).

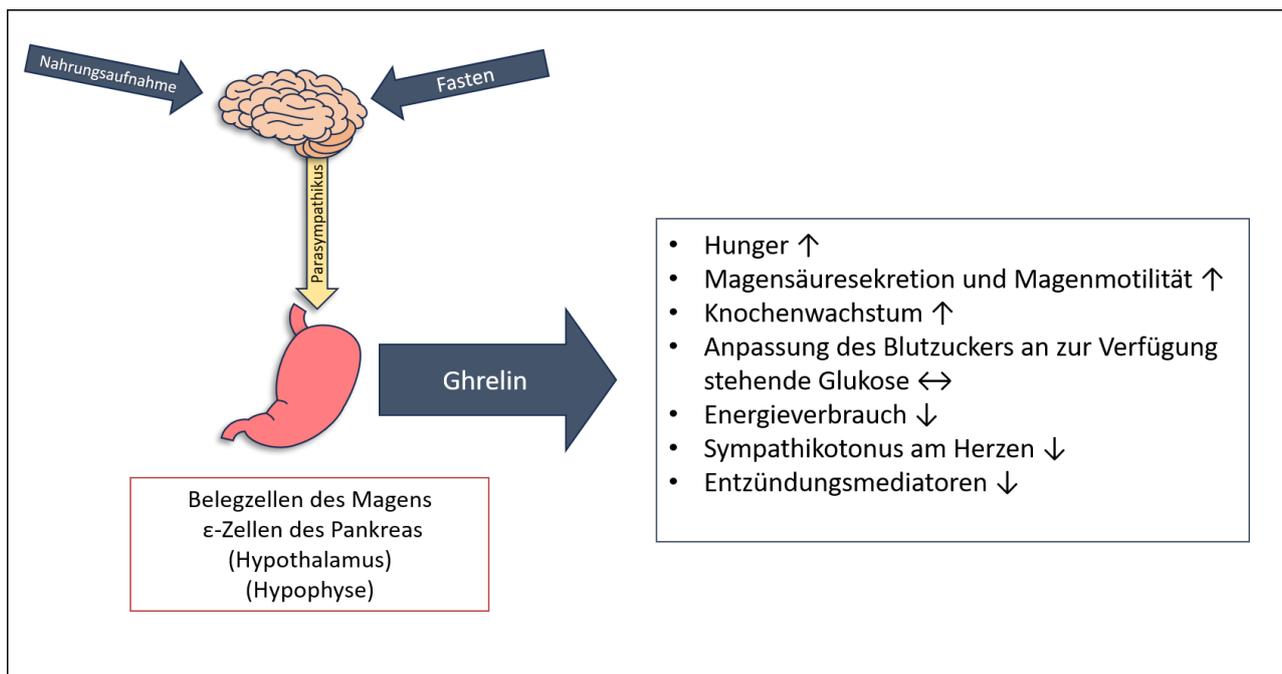


Abbildung 1-2 – Wirkschema Ghrelin: Das Bild zeigt schematisch die bisher bekannten Wirkweisen von Ghrelin. Eine bevorstehende Nahrungsaufnahme oder länger andauerndes Fasten führen parasymphatisch vermittelt zu einer Ausschüttung von Ghrelin durch Belegzellen des Magens, ε-Zellen des Pankreas sowie aus einigen wenigen Zellen der Hypophyse und des Hypothalamus (Pradhan et al. 2013). Das Hormon steigert das Hungergefühl, erhöht die Magensäuresekretion und Magenmotilität und fördert das Knochenwachstum (Masuda et al. 2000; Fukushima et al. 2005). Ghrelin stabilisiert den Blutzucker (Sun et al. 2006; Ma et al. 2012), senkt den allgemeinen Energieverbrauch des Körpers (Lin et al. 2011; Sugiyama et al. 2012) und reduziert den Sympathikotonus (Mao et al. 2012). Unter Ghrelineinfluss werden weniger Entzündungsmediatoren exprimiert (Moreno et al. 2010; Cheng et al. 2015).

Ghrelin ist ein vielseitiges Hormon dessen Funktionen noch nicht alle hinreichend erklärt sind (Abbildung 1-2). Die Stoffwechselwege, die zu Ghrelinsekretion führen, bleiben bisher weitgehend unbekannt. Weitere Eigenschaften dieses Hormons sind Fokus mehrerer Studien (Yanagi et al. 2018; Sleeman und Spanswick 2014; Quiñones et al. 2020).

1.5 Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen einer schweren cholestatischen Leberschädigung und Störungen der Darmbarrierefunktion mechanistisch zu untersuchen. Verwendet wurde hierfür das Gallengangligaturmodell (BDL-Modell) in der Maus. In der Literatur wird eine Erhöhung der Permeabilität der Darmbarriere nach einer BDL beschrieben (Chen et al. 2015; Abdeldayem et al. 2007; Du et al. 2016). In den eigenen Versuchen erfolgte zunächst eine präzise Messung der parazellulären Permeabilität mittels sogenannter Ussing-Kammer-Versuche. Weiterhin wurden auf RNA-Ebene molekulare Bestandteile der Darmbarriere, wie zum Beispiel verschiedene Claudine, qualitativ und quantitativ analysiert.

In einem zweiten Teil der Arbeit sollte erforscht werden, ob die Auswirkungen der BDL durch eine Therapie beeinflussbar sind. Dafür wurde Ghrelin als vielversprechendes Hormon ausgewählt. Die orexigene Wirkung von Ghrelin stellte eine mögliche Linderung der häufig beschriebenen Malnutrition bei Lebererkrankungen in Aussicht (Meyer et al. 2020). Außerdem werden Ghrelin sowohl darmbarrierestärkende Effekte (Das 2011; Wu et al. 2009) als auch hepatoprotektive Effekte (Gonzalez-Rey et al. 2006; Cheng et al. 2015) zugeschrieben, was den Einsatz von Ghrelin im Kontext einer BDL interessant macht. Der Verlauf der Arbeit wurde von folgenden Hypothesen geleitet:

- Die BDL erhöht die Durchlässigkeit der Darmbarriere in Mäusen.
- Die BDL verringert die Expression von Proteinen, die die Darmbarriere aufrechterhalten.
- Ghrelin verringert die Durchlässigkeit der Darmbarriere.
- Ghrelin steigert die Nahrungsaufnahme und wirkt einer Mangelernährung entgegen.
- Ghrelin steigert die Expression von Proteinen, die die Darmbarriere aufrechterhalten.
- Die Auswirkungen der BDL und der Ghrelin-Therapie sind von der Darmmorphologie und -physiologie sowie dem Aufbau der Darmbarriere abhängig und deshalb in den einzelnen Darmabschnitten potenziell unterschiedlich.

2 Methoden

2.1 Mausmodell

Für die vorliegende Arbeit wurden männliche C57BL/6J Mäuse in einem Alter von ca. 3 Monaten und mit einem Gewicht von 25-30 g verwendet. Die Mäuse stammen aus den Jackson Laboratories von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld) und wurden in der Core Facility Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock gehalten und gezüchtet. Die Haltung, Züchtung und Fütterung der Tiere erfolgte nach Richtlinie *2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche*

Zwecke verwendeten Tiere der EU-Kommission und nach den Hygienevorschriften der FELASA-Richtlinien. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten, waren einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und hatten jederzeit uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei M-V, unter den Aktenzeichen 7221.3-1-046/18 und 7221.3-1-015/20 registriert und genehmigt. Die Durchführung der Arbeiten am lebenden Tier oblag den Projektleitern Dr. Luise Ehlers und Prof. Dr. Robert Jaster.

2.1.1 Haltung

Zwei Tage vor Versuchsstart wurden die Tiere in Einzelhaltung überführt und dort für die Dauer des Versuches gehalten. Das Wohlergehen der Mäuse wurde während der gesamten Versuchsdauer täglich mittels eines Wellnesscores (Tabelle 2-1) erfasst. Des Weiteren wurden die Tiere täglich gewogen. Bei einem Unterschreiten von 75 % des erhobenen Startgewichtes oder einem Score von 4 oder niedriger, wurde die jeweilige Maus aus dem Versuch genommen und eingeschläfert. Alle Tiere erhielten für die gesamte Versuchsdauer, beginnend mit d -1 (ein Tag vor Operationstag), das Schmerzmittel Metamizol mit einer Verdünnung von 1,25 g/L über ihr Trinkwasser.

Tabelle 2-1 – Wellnesscore zur Beurteilung des Wohlergehens der Tiere während des Versuches

Merkmal	Score	Legende
<i>Aktivität</i>	0-2	2=normal, 1=medium, 0=gering
<i>Fell</i>	0-2	2=glatt, 1=struppig, 0=gesträubt
<i>Augen</i>	0-2	2=sauber, offen; 1=sauber, geschlossen; 0=verklebt, geschlossen
<i>Aufrechtstehen möglich</i>	0-1	1=ja, 0=nein
<i>Haltung</i>	0-2	2=normal, 1=leicht gekrümmt, 0=kauernd
<i>Fußstand</i>	0-1	1=normal, 0=hoch
<i>Schüttelfrost</i>	0-1	1=nein, 0=ja
Maximum	11	Abbruch bei einem Score von 4 oder weniger

Bei einer täglichen Visite wurde mithilfe dieses Scoresheets der Allgemeinzustand der Tiere beurteilt. Bei einem Score von 4 oder weniger wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und eingeschläfert.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden per Losverfahren einer der im Folgenden beschriebenen vier Gruppen zugeordnet (Tabelle 2-2). Es wurde nach Operationsverfahren zwischen sham-Gruppen (sham-OP, Schein-Operation) und BDL-Gruppen unterschieden. Weiter wurden die Tiere jeweils nach

2 Methoden

unterschiedlicher Therapie aufgeteilt, bestehend aus Ghrelin (Ghr) oder Lösungsmittel (LM, 0,9 % NaCl).

Tabelle 2-2 – Einteilung der Tiere in Therapie- und Kontrollgruppen

Gruppe	Abkürzung	Therapie	Anzahl der Mäuse
BDL mit Ghrelin	BDL + Ghr	Ghrelin	6
BDL mit Lösungsmittel	BDL + LM	0,9 % NaCl	8
sham mit Ghrelin	sham + Ghr	Ghrelin	5
sham mit Lösungsmittel	sham + LM	0,9 % NaCl	5

2.1.3 Ablauf der Operation

Alle Tiere, die Teil einer BDL-Gruppe waren, erhielten eine Gallengangsligatur. Dazu wurden sie zunächst mit 5 % Isofluran (2,4 % N₂O, 1,2 % O₂) narkotisiert. Zu Beginn des Eingriffs wurde der Bauch der Maus rasiert und mit Povidon-Iod desinfiziert. Unter laufender Narkose mit 1,5 % Isofluran (1,5 %-2 % N₂O, 1,3 % O₂) wurde durch einen abdominalen Zugang zur Bauchhöhle der Gallengang freipräpariert und anschließend mit 5-0 Polyester zunächst pankreasnah, dann mit zwei weiteren Knoten hilusnah abgebunden. Nach Sicherstellen einer gut sitzenden Ligatur wurde der Gallengang durchtrennt.

Bei Mäusen der sham-Gruppen wurde der Gallengang ebenfalls dargestellt, aber im Gegensatz zu den BDL-Gruppen wurde auf eine Ligatur und Durchtrennung verzichtet. Abschließend wurden die Muskel- und Hautschichten mit 6-0 Prolene vernäht und die Schmerztherapie mit einem 5 mg/kg KG (Körpergewicht) Caprofen-Depot subkutan begonnen. Während der gesamten Operation wurde auf eine sterile Arbeitsumgebung geachtet.

2.1.4 Versuchsablauf

Nach der OP (d0) blieben die Tiere bis zur Entnahme der Organe für 10 Tage in Einzelhaltung (Abbildung 2-1). Mäuse, die den Gruppen mit Ghrelin-Therapie zugeordnet waren, erhielten täglich (d0 bis d9) intraperitoneale Injektionen von 0,1 µg/µl Ghrelin, gelöst in 0,9 % NaCl. Mäuse aus den Gruppen sham + LM und BDL + LM erhielten stattdessen reine 0,9 % NaCl Injektionen. Das Injektionsvolumen betrug 2 µl/g KG. An d10 wurden die Tiere eingeschläfert und die Organe entnommen.

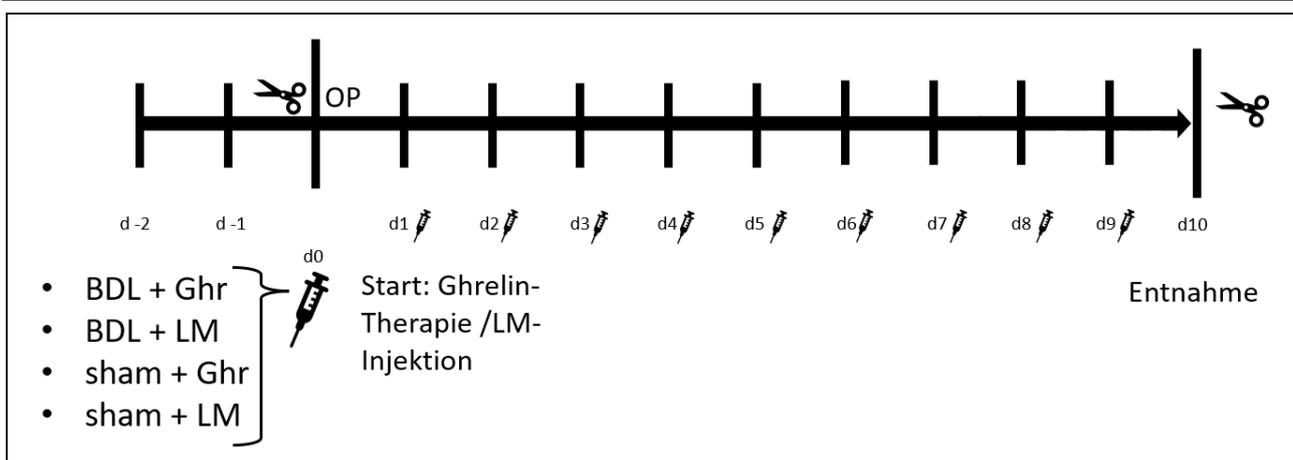


Abbildung 2-1 – Ablauf der Tierversuche: Zwei Tage vor Versuchsbeginn (d-2) wurden die Tiere in Einzelhaltung überführt. An Tag 0 (d0) fand die Operation statt. Am Operationstag und den darauffolgenden Tagen erhielten die Gruppen BDL + Ghr und sham + Ghr 0,1 µg/µl Ghrelin-Injektionen mit einem Volumen von 2 µl/g KG. Die Gruppen BDL + LM und sham + LM erhielten reine 0,9 % NaCl Injektionen, ebenfalls mit einem Volumen von 2 µl/g KG. Am 10. Tag nach der Operation wurden alle Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen.

2.1.5 Tierversuche mit abweichenden Rahmenbedingungen

Ein Teil der untersuchten Proben in dieser Promotionsarbeit stammte aus Tierversuchen mit Rahmenbedingungen, die wie folgt von dem beschriebenen Versuchsablauf abweichen (Tabelle 2-3): Die Tiere erhielten nach der BDL- bzw. sham-OP keinerlei Injektionen, blieben also unbehandelt. Die Euthanasie dieser Mäuse erfolgte teils nach 10, teils nach 14 Tagen. Dabei handelte es sich teilweise um Überschussmaterial aus Versuchen mit spezifischen Fragestellungen, die ein abweichendes Versuchsdesign erforderten. Datensätze aus Untersuchungen an diesen Tieren sind ausgewiesen als (BDL- bzw. sham-) *Gruppen ohne Therapie mit einer Versuchsdauer von maximal 14 Tagen*. Dabei wurden Daten von Tieren mit 10- bzw. 14-tägiger Versuchsdauer zusammengefasst. Statistische Untersuchungen hatten zuvor gezeigt, dass die unterschiedliche Versuchsdauer keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

Tabelle 2-3 – Anzahl der Mäuse aus Gruppen ohne Therapie

Gruppe	Abkürzung	Therapie	Anzahl der Mäuse
BDL ohne Therapie	BDL	Keine	15
sham ohne Therapie	sham	Keine	17

2.1.6 Ablauf Entnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit einer Überdosis eines Ketamin-Xylazin-Gemisches (20 µl/10 g KG), mit einer Zusammensetzung von 10 % Ketamin und 2 % Xylazin, narkotisiert. Der Tod wurde mittels zervikaler Dislokation sichergestellt. Durch Punktion des retrobulbären Venenplexus wurde Blut für Laboruntersuchungen gewonnen. Bei zu geringer Menge wurde weiteres Blut aus der Vena Cava extrahiert. Es folgte die Entnahme der zu untersuchenden Organe: Zuerst wurde das Pankreas entnommen, um der fortschreitenden Autodigestion zuvorzukommen. Danach folgte die Entnahme des Darms, welcher auf Eis in seine vier Untereinheiten geteilt wurde (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon). Die ersten 2 cm vom Jejunum und die letzten 2 cm des Kolons wurden abgesetzt (Abbildung 2-2) und in physiologischem Puffer auf Eis zur Ussing-Kammer transportiert. Abschließend erfolgte die Entnahme von Leber, Nieren und Milz. Für nachfolgende Untersuchungen zu einem anderen Zeitpunkt, wurden die Organe mit unterschiedlichen Methoden konserviert: Pankreas, Leber, Nieren und Teile aller Darmabschnitte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet (natives Gewebe) und bei -150° C aufbewahrt. Ein weiterer Teil dieser Organe wurde in Formalin fixiert (Paraffingewebe) und am Folgetag in einer Histokinette vom Typ STP 58599 von MICROM International GmbH entwässert. Abschließend wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Von Leber und Darm wurden außerdem Proben in Tissue-Tek® eingebettet und bei -80° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt (Kryogewebe). Die Proben von Nieren und Milz fanden in dieser Arbeit keine Verwendung.

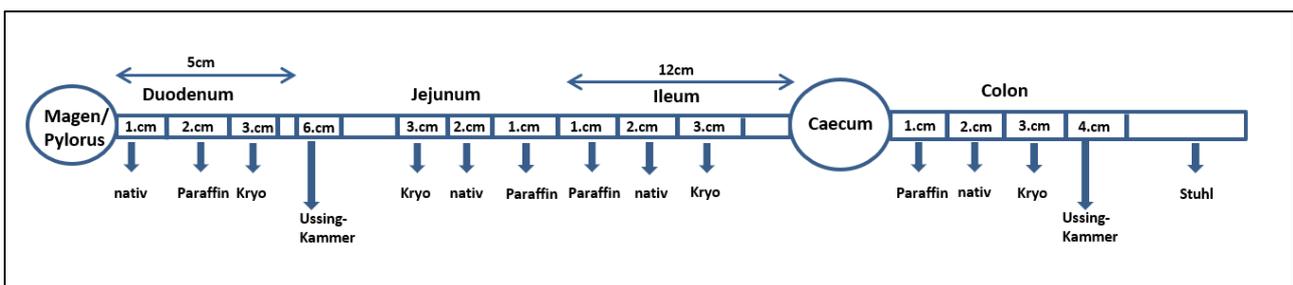


Abbildung 2-2 – Entnahmeschema Darm: Ausgehend von den Landmarken Pylorus und Caecum wurde jeweils der erste Zentimeter des Duodenums schockgefrostet (nativ). Der zweite Zentimeter wurde in Formalin fixiert (Paraffin) und der dritte Zentimeter in TissueTek® eingebettet (Kryo). Die Abschnitte von Jejunum, Ileum und Kolon wurden nach anderer Reihenfolge aufgeteilt: 1.cm: Paraffin, 2.cm: nativ, 3.cm: Kryo. Jeweils die ersten zwei Zentimeter vom Jejunum und die letzten zwei Zentimeter vom Kolon wurden für die Ussing-Kammer verwendet.

2.2 Ussing-Kammer-Versuch

Mit der Ussing-Kammer lassen sich transepitheliale Widerstände und Ströme von Geweben darstellen und messen.

2.2.1 Ablauf Versuchsstart

Die Zeit zwischen Organentnahme und Einspannen in die Ussing-Kammer wurde so gering wie möglich gehalten und betrug maximal 15 Minuten. Zum Einsetzen in die Ussing-Kammer wurde das Darmgewebe auf einem gekühlten Paraffinblock in Basispuffer mit einer Nadel fixiert und längs aufgeschnitten. Jeglicher Darminhalt wurde mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Daraufhin wurde das Gewebe an allen vier Ecken mit Nadeln fixiert und so aufgespannt, dass Faltenbildung vermieden wurde. Dann folgte das Einsetzen in die Kammer.

2.2.2 Aufbau der Ussing-Kammer

Die Kammer besteht aus zwei Hälften, zwischen die das Gewebestück aufgespannt wird (Abbildung 2-3). Das Gewebestück separiert die Räume der Hälften voneinander. Epitheliales Gewebe wurde immer so eingesetzt, dass die apikale Seite (luminal) nach links ausgerichtet war und die basolaterale Seite (serosal) nach rechts zeigte.

Das Gewebe wurde mittels kleiner Nadeln an der linken Kammerhälfte rund um das Verbindungsloch fixiert und glatt gehalten. Dadurch werden während des Versuches Falten vermieden, die zu unterschiedlich großen exponierten Gewebeflächen in dem 0,24 cm² großen Loch führen könnten. Jede Hälfte der Kammer hat einen Zufluss für Gas. Über diese wird das Gewebe fortlaufend von beiden Seiten mit Carbogen (5 % CO₂ / 95 % O₂) begast. Vor dem Verbindungsloch (gewebenah) der jeder Hälfte befinden sich Löcher für die Spannungselektroden. Auf der gegenüberliegenden Seite der jeweiligen Hälfte (gewebefern) befinden sich Löcher für die Stromelektroden. In dem Versuchsaufbau dieser Arbeit wurden Ag-AgCl-Elektroden verwendet.

Der Versuchsaufbau sieht eine Messung an vitalem Gewebe vor. Daher wurde die Versuchsumgebung dementsprechend angepasst. Von Entnahme bis Einspannen in die Ussing-Kammer wurde das Gewebe ohne Unterbrechung gekühlt, um Abbauprozesse der Zellen nach dem Tod des Tieres zu bremsen. Außerdem wurden die Organe in frisch angesetztem, modifiziertem Krebs-Puffer (Krebs und Henseleit 1932) (Tabelle 2-4) mit einem pH von 7,35 (±0,1) asserviert, um isotonische und pH-neutrale Verhältnisse zu gewährleisten. Derselbe Puffer wurde für das Befüllen der Hälften der Kammer verwendet. Zum Start des gewählten Assays wurde der Puffer in der Kammer auf 37 °C erwärmt.

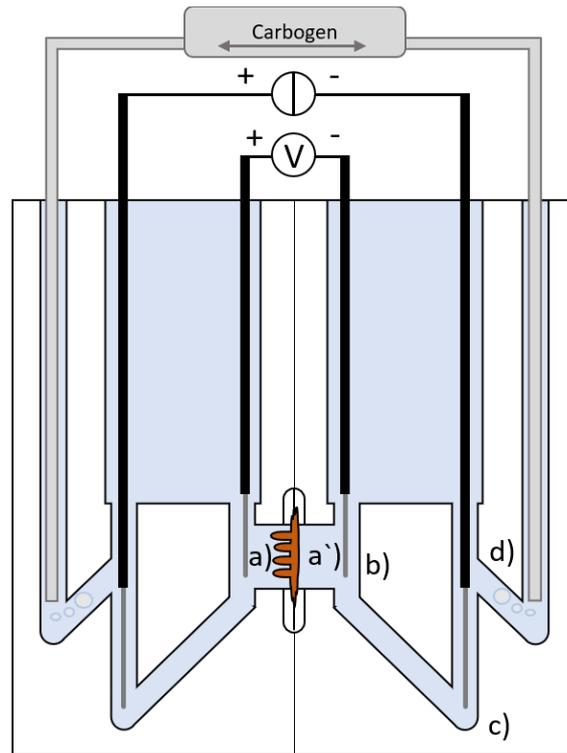


Abbildung 2-3 – Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer: Die Ussing-Kammer ist mit Puffer gefüllt und mit Carbogen begast (d). In der Mitte ist das Darmepithel als Trennwand zwischen den beiden Hälften der Kammer eingespannt. Links ist die apikale Seite des Epithels (a), rechts die basolaterale Seite (a'). Gewebenah befinden sich die Spannungselektroden (b). Gewebefern sind die Stromelektroden angebracht (c).

Tabelle 2-4 – Zusammensetzung des modifizierten Krebspuffers

Substanz	Zielkonzentration in mmol/L	g für 1 L
NaH ₂ PO ₄	2,4	0,331
Na ₂ HPO ₄	0,4	0,071
KCl	5,0	0,373
NaHCO ₃	25,0	2,100
CaCl ₂	1,2	0,176
MgCl ₂	1,2	0,244
NaCl	115,0	6,720
Glucose	5,0	0,901

2.2.3 Widerstands Messungen

Der transmurale Widerstand wurde mit dem Gerät Voltage/Current Clamp VCC6 (Dipl. Ing. K. Mussler – Scientific Instruments) im Open Circuit Modus gemessen. Dabei wird über das Gewebe ein bekannter Strom (I_1) für die bekannte Fläche ($0,24 \text{ cm}^2$) über eine kurze Zeitdauer angelegt und

die anfallende Spannung (U_1) erhoben. Die Anwendung des Ohm'schen Gesetzes (Formel 2-1) erlaubt nun die Errechnung des Widerstands (R_1). Dabei muss der Widerstand von Puffer und Elektroden berücksichtigt werden. Dafür wurde vor jeder Messung der individuelle Widerstand R_0 jeder Kammer (Kammer mit Puffer und ohne Gewebeprobe) erhoben. Der transmurale Widerstand (R_t) des Gewebes ergibt sich nun aus dem gemessenen Widerstand R_1 minus dem Leerwert R_0 (Formel 2-2). Alle Messungen wurden mit einer Stromstärke von $20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ über eine Dauer von 200 ms in einem Abstand von 6 Sekunden durchgeführt. Die ersten 5 gemessenen Widerstände wurden für jede Probe gemittelt.

Formel 2-1 – Ohm'sches Gesetz

$$R = \frac{U}{I}$$

Formel 2-2 – Berechnung des transmuralen Widerstands

$$R_1 - R_0 = R_t$$

2.2.4 FITC-Dextran Assay

Mit dem FITC-Dextran Assay lässt sich die Permeabilität des Gewebes veranschaulichen. Dabei wird Fluoresceinisothiocyanat (FITC), ein fluoreszierender Stoff, an Dextran, ein Polysaccharid, gekoppelt. Für diesen Zucker gibt es im untersuchten Gewebe keine Transporter, daher kann er nur parazellulär durch das Epithel gelangen (Aguanno et al. 2021). In dieser Arbeit wurde FITC-Dextran mit einer mittleren Größe von 4kDA verwendet. Eine Messung der Fluoreszenz im Puffer gibt Aufschluss über die Menge des diffundierten Zuckers.

Zuerst wurde auf der basalen Seite des Epithels eine Probe genommen (Leerwert, t_0), um eine mögliche Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln. Um die Messung zu beginnen, wurden apikal $250 \mu\text{l}$ FITC-Dextran hinzugegeben. Dann wurden 3 h lang alle 30 min basal $50 \mu\text{l}$ -Proben abgenommen und in eine 96-well Platte überführt. Die abgenommenen Probenmengen wurden jeweils durch die gleiche Menge Basispuffer ersetzt, um das Mengengleichgewicht zwischen den Kammern nicht zu beeinflussen. Nach Ablauf der 3 h wurde die Fluoreszenz der Proben mit dem NanoPhotometer P300 (Implen GmbH München) gemessen. Um eine Vergleichbarkeit der Fluoreszenzwerte der unterschiedlichen Tiere und Kammern zu erreichen, wurde jeder Messwert durch den Wert der Hintergrundfluoreszenz seiner Kammer geteilt. Die errechneten Werte geben den Anstieg der Fluoreszenz in Relation zur zuvor gemessenen Hintergrundfluoreszenz wieder.

2.3 Histologische Arbeiten

2.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbungen

Hämatoxylin-Eosin-Färbungen dienen der Beurteilung der mikroskopischen Beschaffenheit des zu untersuchenden Gewebes. Dabei färbt Hämatoxylin basophile Zellbestandteile wie z.B. den Zellkern blau an und Eosin acidophile Zellbestandteile rot bis rosa. Für die vorliegende Arbeit wurden Pankreas und Leber sowie alle Darmabschnitte separat (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon) mittels HE beurteilt.

Mit dem Mikrotom wurden dafür zunächst aus Paraffingewebe 4 µm dicke Schnitte angefertigt und über Nacht getrocknet. Die Färbung verlief nach folgendem Schema (Tabelle 2-5):

Tabelle 2-5 – Färbeablauf HE

Nr.	Lösung	Dauer in min	Vorgang
1.	Xylol	10:00	Entparaffinieren
2.	Xylol	10:00	Entparaffinieren
3.	Ethanol 96 %, vergällt	05:00	Wässern
4.	Ethanol 96 %, vergällt	03:00	Wässern
5.	Ethanol 70 %, vergällt	02:00	Wässern
6.	Aqua dest.	02:00	Wässern
7.	Hämatoxylin, nach Gill/Harris	04:00	Färben der Kerne
8.	Leitungswasser	04:00	Bläuen
9.	Aqua dest.	00:05	Spülen
10.	Eosin 0,2 %, alkoh., Standard + 2% Essigsäure	01:00	Färben d. Gewebes
11.	Aqua dest.	00:05	Spülen
12.	Ethanol 70 %, vergällt	00:05	Entwässern
13.	Ethanol 96 %, vergällt	00:05	Entwässern
14.	Ethanol 96 %, vergällt	00:05	Entwässern
15.	Xylol	00:30	Entwässern
16.	Xylol	00:30	Entwässern

Die gefärbten Schnitte wurden mit Pertex fixiert und mit einem Deckglas versiegelt.

Die Digitalisierung und Auswertung erfolgte mit dem Mikroskop Axio Observer.Z1/7 bei 10-facher Vergrößerung. Die Vermessungen der Schnitte wurden mit der Software Zen 3.2 (blue edition) nach folgendem Muster durchgeführt (Abbildung 2-4).

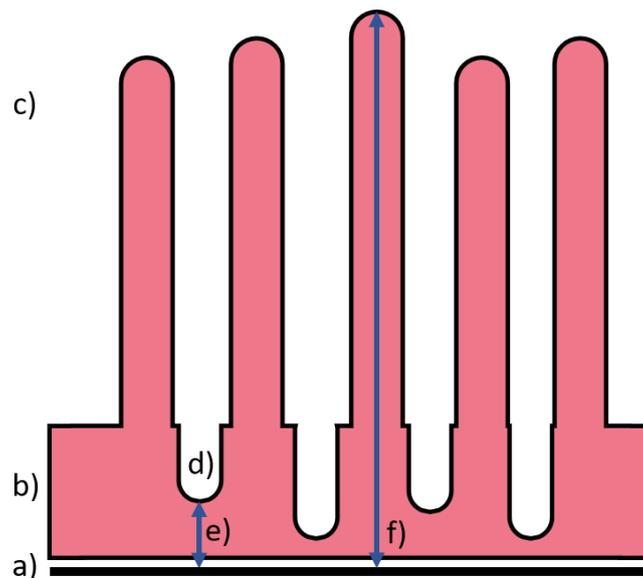


Abbildung 2-4 – Messschema HE: Die Mukosahöhe (e) wurde vom lumenseitigen Rand der Serosa (a) senkrecht bis zum lumenseitigen niedrigsten Rand der Mukosa (b) gemessen. Dabei wurde die Tiefe von Krypten (d) der Mukosahöhe nicht zugerechnet. Die Zottenhöhe (f) wurde ebenfalls vom lumenseitigen Rand der Serosa (a) senkrecht bis zum Ende der örtlich längsten Zotte (c) gemessen. Jeder Messwert wurde pro Organ 6-mal erhoben und gemittelt. Die Auswertung geschah verblindet.

Die Mukosahöhe wurde vom lumenseitigen Rand der Serosa senkrecht bis zum lumenseitigen niedrigsten Rand der Mukosa gemessen. Die Zottenhöhe wurde ebenfalls vom lumenseitigen Rand der Serosa senkrecht zur Serosa bis zum Ende der örtlich längsten Zotte gemessen. Jeder Messwert wurde pro Organ 6-mal erhoben und gemittelt. Die Auswertung geschah verblindet (Berlin et al. 2019).

2.3.2 Immunhistochemie-Färbung

Mit der Immunhistochemie-Färbung lassen sich ausgewählte Zellen mittels spezifischer Antikörpermarkierung nachweisen. In dieser Arbeit diente die Methode dazu, CD3e- und CD11b-positive Zellen im Darmgewebe der Mäuse zu detektieren. Dafür wurde das ImmPRESS-AP Kit von *Vector Laboratories* (Burlingame, USA) verwendet, das eine Anfärbung von Paraffinschnitten mit nur geringer Hintergrundfärbung zulässt.

Die Färbung fand an 4 µm dicken Paraffinschnitten statt. Das Gewebe wurde zunächst mit 2,5 % Pferdeserum geblockt. Blocken verhindert unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers und mindert so die Hintergrundfärbung. Danach wurden die Schnitte mit Primärantikörpern für die zu markierende Struktur für eine halbe Stunde inkubiert. Dafür wurden polyklonale Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, verdünnt in 2,5 % Pferdeserum. Der CD3e-Antikörper (Invitrogen: MA 1-90582) wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt und der CD11b Antikörper (Novus Biologicals: NB110-89474) mit einer Verdünnung von 1:600. Darauf folgte die Zugabe des gegen den

2 Methoden

Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers (*ImmPress-AP Reagent Pferd gegen Kaninchen*). An den Sekundärantikörper ist eine alkalische Phosphatase (AP) gebunden, welche das danach hinzugegebene *AP-Substrat* zu einem sichtbaren Farbstoff umsetzt. So kommt es zur Anfärbung der mit Primärantikörper markierten Strukturen. Um eine Übersicht über das Gewebe zu behalten, wurde zum Schluss eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Dieses markiert basophile Strukturen, unter anderem Zellkerne. Ein detaillierter Färbeablauf ist in Tabelle 2-6 zu sehen:

Tabelle 2-6 – Färbeablauf Immunhistochemie

Nr.	Lösung	Dauer in min	Vorgang
1.	Xylol	10:00	Entparaffinieren
2.	Xylol	10:00	Entparaffinieren
3.	Ethanol 96 % vergällt	05:00	Entparaffinieren
4.	Ethanol 96 % vergällt	03:00	Entparaffinieren
5.	Ethanol 70 % absolut	03:00	Entparaffinieren
6.	Aqua dest.	02:00	
7.	Citrat-Puffer 1x und 2100 Antigen Retriever (Aptum Biologics Ltd. Southampton)	Abkühlen Über Nacht (min. 2 h)	Antigenrückgewinnung (hitzevermittelt)
8.	TBS (pH: 7,4)	05:00	Waschen
9.	TBS (pH: 7,4) + 0,025 % Triton	05:00	Waschen
10.	Ready-to-use (2,5 %) normales Pferdeserum	20:00	Blocken
11.	Primär-Antikörper (Kaninchen) verdünnt in ready-to-use (2,5 %) normales Pferdeserum	30:00	Antigen-Markierung CD3e: 1:100 CD11b: 1:600
12.	TBS (pH: 7,4) + 0,025 % Triton	05:00	Waschen
13.	ImmPRESS-AP-Reagent (gegen Kaninchen)	30:00	Antikörper-Markierung
14.	TBS (pH: 7,4)	05:00	Waschen
15.	TBS (pH: 7,4)	05:00	Waschen
16.	AP-Substrat	05:00 – 20:00	Aktivierung des AP-Reagent
17.	TBS (pH: 7,4)	05:00	Waschen
18.	Leitungswasser	05:00	Waschen
19.	Hämalaun	04:00	Gegenfärbung
20.	Lauwarmes Leitungswassr	05:00 – 10:00	Bläuen
21.	Ethanol absl.	00:05	Entwässern
22.	Ethanol absl.	00:05	Entwässern
23.	Xylol	00:05	Entwässern
24.	Xylol	00:05	Entwässern

2.3.3 Siriusrot-Färbung

Für diese Arbeit wurden Siriusrot-Färbungen verwendet, um kollagenhaltiges Bindegewebe in der Leber darzustellen. Die Färbung wurde an 4 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Der detaillierte Ablauf ist in Tabelle 2-7 aufgelistet.

Tabelle 2-7 – Färbeablauf Siriusrot-Färbung

Nr.	Lösung	Dauer in min	Vorgang
1.	Xylol	10:00	Enparaffinisieren
2.	Xylol	10:00	Enparaffinisieren
3.	Ethanol 96 % vergällt	05:00	Wässern
4.	Ethanol 96 % vergällt	03:00	Wässern
5.	Ethanol 70 % vergällt	02:00	Wässern
6.	Aqua dest.	02:00	Wässern
7.	Weigerts Hämatoxylin	08:00	Kernfärbung
8.	Aqua dest.	00:30	Spülen
9.	Leitungswasser	01:00	Bläuen
10.	Filtrierte Siriusrot Lösung	00:00	Kollagen-Färbung
11.	0,5 % Essigsäure	00:30	Spülen
12.	Ethanol absl.	00:05	Entwässern
13.	Ethanol absl.	00:05	Entwässern
14.	Xylol	00:05	Entwässern
15.	Xylol	00:05	Entwässern

Abschließend wurden die Schnitte in Pertex eingebettet und mit einem Deckglas versiegelt.

2.4 Genexpressionsanalysen

Dieses Verfahren stellt die Expression von Genen dar. Dazu wurde zunächst aus nativem Gewebe (schockgefrostenes Gewebe) der Tiere mRNA isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Mit dieser konnte anschließend mithilfe der *Taqman-Technologie* eine Quantifizierung der Expression der Zielgene durchgeführt werden.

2.4.1 mRNA-Isolation

Die Genexpression wurde für die Darmabschnitte Jejunum und Kolon untersucht, von den Gruppen BDL/sham + Ghr/LM. Die mRNA-Isolation wurde mit dem *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben vollzogen. Dazu wurden bis zu 30 mg der zuvor bei -150° C gelagerten Organe mit einem Gewebehomogenisator (Tissuelyzer LT) in *RLT*-Puffer zu feinem Pulver verarbeitet. Daraufhin wurden zu je 350 µl des zerkleinerten Gewebes 350 µl 70 % Ethanol hinzugegeben. Im nächsten

Schritt wurde das Lysat auf eine *RNeasy Mini spin column* übertragen und bei 16.000 x g für 15 s zentrifugiert. Die *RNeasy Mini spin column* besteht aus einem oberen Teil mit einem Filterboden und einem unteren Teil, in dem die Lösungen, die den Filter passieren, aufgefangen werden. Als nächstes wurde die *RNeasy Mini spin column* mit 350 µl RW1-Puffer bei 16.000 x g gespült. Um eventuell bestehende DNA-Reste zu entfernen, wurden 10 µl DNase, gelöst in 70 µl RDD-Puffer, hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 15 min belassen. Danach wurde der Filter mit 350 µl RW1 Puffer ein weiteres Mal bei 16.000 x g zentrifugiert und gespült. Im Anschluss wurde die *RNeasy Mini spin column* zweimalig mit 500 µl RPE-Puffer bei 16.000 x g zuerst für 15 sek und dann für 2 min durchspült. Zum Schluss wurde die übrige mRNA mit 50 µl Nuklease-freiem destilliertem Wasser bei 16.000 x g für 1 min eluiert. Die gelösten 50 µl wurden ein weiteres Mal mit gleicher Kraft durch den Filter zentrifugiert, um eine höhere Konzentration der mRNA zu erlangen.

2.4.2 Photometrische Erfassung der RNA-Menge

Die Konzentration der gewonnen mRNA wurde mithilfe eines Nanophotometers bestimmt. Das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Phenolen und Proteinen liegt hingegen bei 280 nm. Durch die Messung dieser beiden Absorptionswerte und den Vergleich mit einer Leerprobe kann sowohl die Konzentration als auch die Reinheit der mRNA errechnet werden. Die Reinheit ergibt sich hierbei aus dem Quotienten der Konzentrationen der Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm ($[260 \text{ nm}]/[280 \text{ nm}]$). Proben, die einen geringeren Quotienten als 1,8 aufwiesen, wurden nicht für die cDNA-Gewinnung weiterverwendet. Vor der Weiterverarbeitung wurde die mRNA bei -80 °C gelagert, allerdings nie länger als eine Woche.

2.4.3 cDNA-Gewinnung durch reverse Transkription

Mittels Reverser Transkriptase (RT) wurde mRNA in cDNA umgeschrieben. Die RT ist eine RNA-abhängige Polymerase, die unter Zugabe von Desoxyribonucleosidtriphosphaten (dNTPs) und zufälligen Primer-Nonameren mRNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umschreibt. Damit aus jeder Probe annähernd gleich viel cDNA entstand, wurde jeweils 1 µg RNA in 10 µl Nuklease-freiem Wasser (Diethyldicarbonat-Wasser, DEPC-Wasser) gelöst. Die Inkubation der RT mit der mRNA geschah mit dem RT-Mastermix (High Capacity RTKit 200 R Thermo Fisher Scientific) (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8 – Zusammensetzung des Mastermixes für die Reverse Transkriptase

Bestandteil	Menge für 1 Probe (10µl)
10x Puffer	2,0 µl
dNTPs	0,8 µl
Random Primer	2,0 µl
RT	1,0 µl
DEPC-Wasser	4,2 µl

Jeweils 10 µl Mastermix und 1 µg mRNA in 10 µl RNase-freiem Wasser wurden wie folgt inkubiert (Tabelle 2-9):

Tabelle 2-9 – Inkubationszeiten für die reverse Transkription

Dauer in Minuten	Temperatur
10:00	25 °C
120:00	37 °C
05:00	85 °C

Die gewonnene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.4 Ablauf Echtzeit-PCR (TaqMan)

Mithilfe der „*TaqMan-Methode*“, einer Form der Echtzeit-PCR, ist ein Vergleich der Expression verschiedener Zielgene zwischen den Versuchsgruppen möglich. Dabei laufen Amplifikation, Detektion und Quantifizierung simultan ab. Für jedes Zielgen wurde eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde verwendet, welche sich zu dem cDNA-Transkript des Gens komplementär verhält und zwischen zwei ebenfalls sequenzspezifischen Primern bindet. An ihrem 5´ Ende befindet sich der Fluoreszenzmarker, während am 3´ Ende ein Quencher gebunden ist. Dieser unterdrückt das Fluoreszenzsignal solange die Sonde intakt ist. Der Reaktionsansatz wird zusammen mit der Taq-Polymerase, einer Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, inkubiert. Wenn die Taq-Polymerase die Primer verlängert, erreicht sie dabei die Sonde und spaltet diese durch 5´-3´ Exonukleaseaktivität. Die räumliche Nähe von Quencher und Farbstoff ist aufgehoben und ein Fluoreszenzsignal wird detektierbar. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der vervielfältigten cDNA. Zu dem Zeitpunkt, zu dem das Signal exponentiell zu steigen beginnt, lässt sich ein Rückschluss auf die Menge der zu vergleichenden mRNA ziehen. Die Dauer bis zur exponentiellen Vervielfachung wird in Inkubationszyklen gemessen und nennt sich Ct-Wert (*Cycle threshold*). Je früher der Ct-Wert erreicht wird, desto mehr Ausgangsmaterial des Zielgens hat sich in der Probe befunden. Zum Ausgleich probenspezifischer Unterschiede wurde die Expression jedes Zielgens ins Verhältnis zu einem *Housekeeping* Gen gesetzt. Verglichen wird am Ende, wie hoch die

2 Methoden

Differenz der Ct-Werte der Zielgene zu den Ct-Werten des *Housekeeping* Gens der jeweiligen Probe ist.

Jeweils 2,5 µl der cDNA-Reaktionsansätze wurden zusammen mit 10 µl rtPCR-Mastermix (Low ROX Probe MMdTTP blue von Takyon™) versetzt, in dem sich Taq-Polymerase, dNTPs, Primer und die Sonden zu den Zielgenen (Tabelle 2-11) befanden. Von jeder Probe wurden 3 Replikate gemessen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren später ausschließen zu können. Die Proben wurden nach folgendem Muster im ViiA 7 Real-Time PCR System (ThermoFisher) inkubiert (Tabelle 2-10):

Tabelle 2-10 – Inkubationszeiten Echtzeit-PCR

Stufe	Wiederholungen	Temperatur	Dauer in Minuten	Arbeitsschritt
1	1	95,0 °C	05:00	Initiale Denaturierung
2	45	95,0 °C	00:15	Denaturierung
		60,0 °C	01:00	Annealing und Extension

Nach Abschluss der Inkubation und Fluoreszenzmessung wurde mithilfe des Programmes *Quant Studio Real Time PCR* (Version 1.2) der Ct-Wert der Zielgene bestimmt. Die drei Ct-Werte einer Probe wurden gemittelt. Für Proben aus dem Jejunum wurde *Villin* und für Proben aus dem Kolon *Keratin 8* als *Housekeeping* Gen verwendet. Die relative Expression der Zielgene im Vergleich zum *Housekeeping* Gen errechnete sich wie folgt (Formel 2-3):

Formel 2-3 – Berechnung von ΔCt

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Housekeeping Gen}}$$

Zur Darstellung der Expression in linearisierter Form erfolgte eine Umrechnung mittels folgender Exponentialfunktion (Formel 2-4):

Formel 2-4 – Berechnung der Expressionsmenge im Vergleich zu den *Housekeeping* Genen

$$2^{-\Delta Ct}$$

Die $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von Replikaten wurden gemittelt und mit dem SEM (*standard error of mean*) dargestellt.

Tabelle 2-11 – Liste der verwendeten rtPCR-Sonden

Gen	Hersteller	Nummer
<i>Villin</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00494146_m1
<i>Keratin 8</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm004209403_g1
<i>Claudin 2</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00516703_s1
<i>Claudin 4</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00515514_s1
<i>Claudin 7</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00516817_m1
<i>Claudin 15</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00517635_m1
<i>Occludin</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00500312_m1
<i>ZO-1</i>	Thermo Fisher Scientific	Mm00493699_m1

2.5 Blutanalyse

Das entnommene Blut wurde vom Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der UMR auf folgende Parameter (Tabelle 2-12) untersucht. Das Blut wurde mit heparinisierten Kapillaren entnommen und in speziellen Lithium-Heparin Röhrchen zu Plasma prozessiert (Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 3000 x g).

Tabelle 2-12 – Liste der untersuchten Blutparameter

Elektrolyte	Enzyme	Lipide	Proteine	Metabolite
<ul style="list-style-type: none"> • Natrium • Kalium • Calcium • Magnesium • Phosphat 	<ul style="list-style-type: none"> • ASAT (Aspartat-Aminotransferase) • ALAT (Alanin-Aminotransferase) • AP (Alkalische Phosphatase) • Pseudo-Cholinesterase • α-Amylase • Lipase • γ-GT (Glutamyltransferase) 	<ul style="list-style-type: none"> • Cholesterol • Triglyceride 	<ul style="list-style-type: none"> • Albumin • CRP (C-reaktives Protein) • Präalbumin 	<ul style="list-style-type: none"> • Bilirubin (direkt) • Bilirubin (indirekt) • Kreatinin • Glucose • Harnsäure • Harnstoff

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit SPSS Version 27 (IBM). Zunächst wurden die Gruppen mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Waren alle betrachteten Gruppen normalverteilt, folgte die Anwendung des t-Tests. Bei mehr als zwei Gruppen folgte die Anwendung einer ANOVA mit anschließendem Post-hoc-Test nach Bonferroni.

3 Ergebnisse

Bei nicht gegebener Normalverteilung aller betrachteten Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft, ob unter den Gruppen zwei oder mehr Gruppen existieren, die möglicherweise nicht Teil einer gemeinsamen Population sind. War dies der Fall, fand der Mann-Whitney-U-Test Anwendung. Bei nur zwei zu vergleichenden Gruppen wurde auf den Kruskal-Wallis-Test verzichtet und direkt geprüft, ob die beiden Gruppen Teil einer Grundgesamtheit sind. Zur Veranschaulichung der Varianzen sind alle Daten als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Gewichtsverläufe

Die Mäuse wurden jeweils vor Beginn der Operation gewogen. Ihr Gewicht an den folgenden Tagen wurde in Relation zu ihrem Startgewicht gesetzt ($d0 = 100\%$). Der Gewichtsverlauf einer Gruppe ist in dem Diagramm als Mittelwert mit \pm SEM dargestellt (Abbildung 3-1).

Die sham-Mäuse zeigten im Verlauf kaum Änderungen gegenüber ihrem Startgewicht. Dabei machte es keinen Unterschied, ob sie Ghrelin oder Lösungsmittel als Therapie erhielten. Die BDL-Mäuse verloren im Mittel in den ersten zwei Tagen nach der OP fast 20 % ihres Gewichtes. In den nächsten fünf Tagen hielten die Tiere ihr Gewicht. In den letzten drei Tagen zeigte sich bei den BDL-Gruppen ein weiterer langsam beginnender Gewichtsverlust, der jedoch die 75 %-Marke nicht unterschritt. Die unterschiedliche Therapie (LM vs. Ghr) der BDL-Gruppen zeigte darauf keinen statistisch signifikanten Effekt.

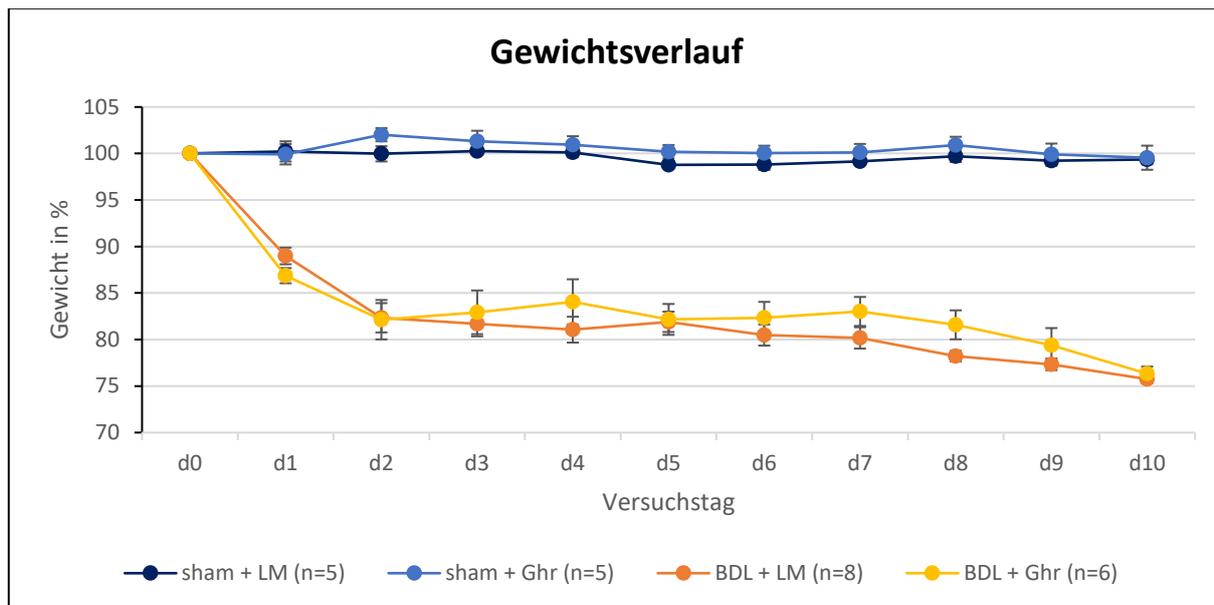


Abbildung 3-1 – Gewichtsverläufe: C57BL/6J-Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Anschließend wurden beide Gruppen wiederum geteilt und entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert. Während der Versuchslaufzeit wurden die Mäuse täglich gewogen. Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe mit SEM. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Startgewicht der Mäuse am Tag der Operation (d0).

3.2 HE-Färbungen

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung erlaubt eine Beurteilung der Beschaffenheit von Gewebe auf mikroskopischer Ebene. Durch das Hämatoxylin wurden die Zellkerne blau gefärbt und mit Eosin wurde Zytosol, sowie Bindegewebe rot bis rosa angefärbt. Nekrosen sind durch verblassende Zellkerne und aufgehobene Zellgrenzen zu erkennen.

In dieser Arbeit wurde die HE-Färbung verwendet, um eine mögliche Leberschädigung in den Präparaten der Gruppen sham und BDL exemplarisch zu zeigen und Unterschiede in der Darmmorphologie aller Gruppen quantitativ zu untersuchen.

3.2.1 Qualitative Auswertung der HE-Leber Färbung

In Abbildung 3-2 sind jeweils Ausschnitte des Lebergewebes einer Maus aus der Gruppe sham oder BDL mit jeweils unterschiedlicher Therapie (Keine Therapie vs. LM vs. Ghr) in 10-facher Vergrößerung abgebildet. In den sham-Gruppen zeigte sich in den untersuchten Präparaten das Bild einer gesunden Leber (Abbildung 3-2 a; b; c).

3 Ergebnisse

Bei den Leberpräparaten der BDL-Gruppen zeigten sich unabhängig von der Therapie ausgeprägte Nekrosen bei allen untersuchten Tieren (* in Abbildung 3-2 d; e; f) sowie Fibrosierungen im Bereich der Zentralvene (# in Abbildung 3-2 e). Es wurden jeweils 3 Tiere jeder Gruppe untersucht.

HE-Färbung der Leber:

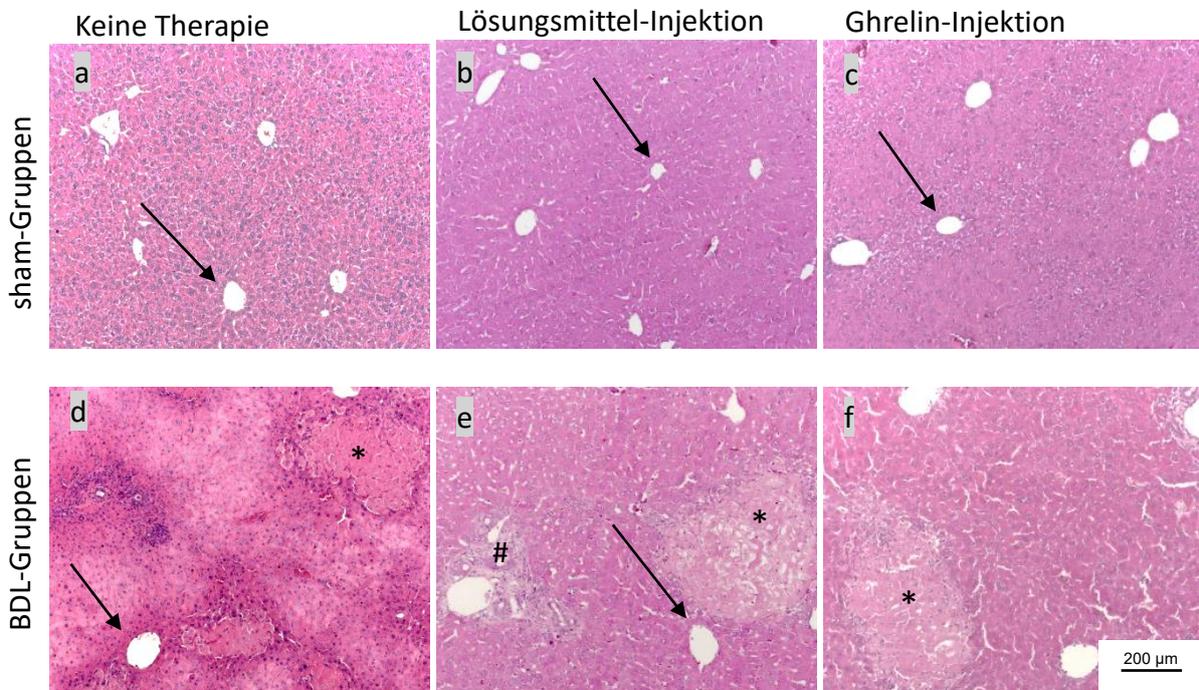


Abbildung 3-2 – HE-Färbung der Leber: C57BL/6J-Tiere erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Danach wurden sie entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Jeweils eine BDL und eine sham Gruppe erhielten keine Injektionen, resultierend in sechs verschiedene Gruppen. Nach maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die Leber wurde in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit dem HE-Verfahren gefärbt wurden. Hämatoxylin markiert basophile Zellbestandteile (Zellkern) blau bis lila und Eosin markiert acidophile Zellbestandteile (Zytosol) rot bis rosa. Dargestellt sind Ausschnitte der Leber in 10-facher Vergrößerung. An gefärbten Schnitten wurde mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Axiophot, Carl Zeiss AG) eine qualitative Beurteilung durchgeführt. Zentralvenen sind mit Pfeilen (→) markiert, nekrotische Bereiche mit Sternchen (*) und Bindegewebsvermehrung mit Rauten (#). Die gefärbten Organe sind typisch für n=3 einer Gruppe.

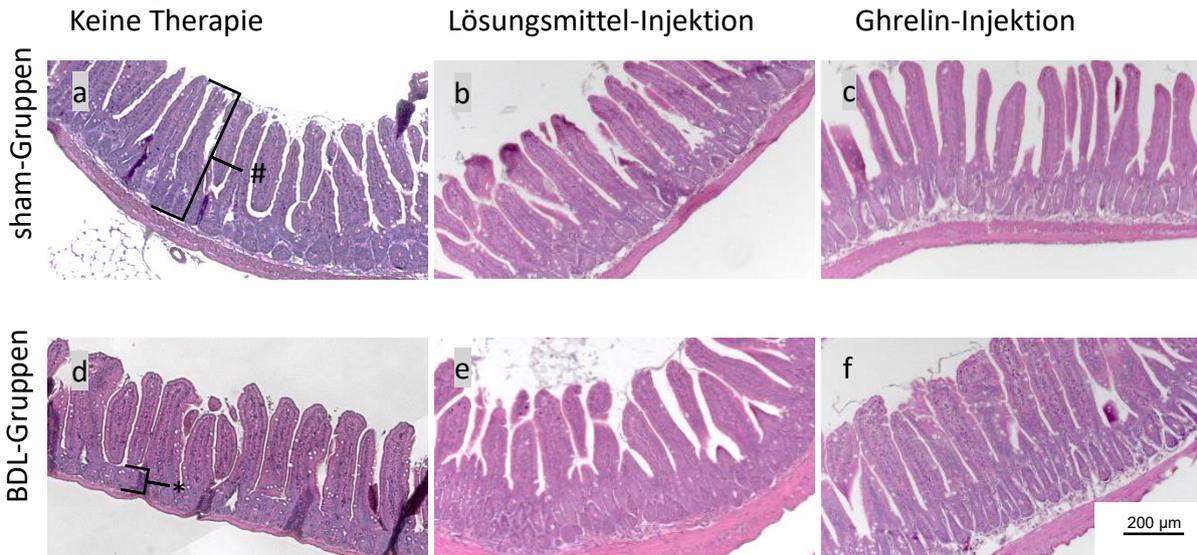
3.2.2 Vermessung der Mukosa und Zottenlänge an HE-Färbungen des Duodenums

Eine qualitative Untersuchung des Darmgewebes zeigte in allen Darmabschnitten unabhängig von der Gruppe und der Therapie eine morphologisch weitgehend unauffällige Darmschleimhaut (Jejunum hier beispielhaft für Dünndarm und Kolon für Dickdarm aufgeführt: (Abbildung 3-3)). Daraufhin wurden Darmabschnitte der Gruppen sham und BDL (Duodenum, Jejunum, Ileum und Kolon) genutzt, um die Mukosahöhe und Zottenlänge zu vermessen. Das genaue Messverfahren ist im Methodenteil (Kapitel 2.3.1) erklärt.

In keinem der Darmabschnitte wurde bezüglich der Mukosahöhe ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sham und BDL festgestellt (Duodenum hier beispielhaft aufgeführt: Abbildung 3-4 A). Bei der Vermessung der Zotten im Duodenum fiel ein signifikanter Unterschied zwischen sham und BDL auf ($p=0,001$; t-Test). Die Zotten der sham-Gruppe waren im Mittel $441,0 \mu\text{m}$ lang, während die Zotten der BDL-Gruppe im Mittel mit $542,1 \mu\text{m}$ um ca. $100 \mu\text{m}$ länger waren (Abbildung 3-4 B). In Jejunum und Ileum gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Zottenlänge (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden auch in allen Gruppen mit Therapie die Mukosahöhe und Zottenlänge im Duodenum vermessen. Die Mukosahöhe unterscheidet sich im Mittel nur um wenige Mikrometer (Abbildung 3-5 A), während sich die Zottenlänge stärker unterscheidet (Abbildung 3-5 B). Die mittlere Länge der Zotten aus der Gruppe BDL + LM liegt bei $556,5 \mu\text{m}$, während die Messwerte der Gruppe sham + LM im Mittel bei $502,4 \mu\text{m}$ liegt. Die mittlere Länge der Zotten aus der Gruppe BDL + Ghr beträgt $509,4 \mu\text{m}$ und die mittlere Länge der Zotten aus Gruppe sham + Ghr beträgt $487,5 \mu\text{m}$. Tendenziell lässt sich somit in Übereinstimmung mit dem Vorversuch ohne Therapie (Abbildung 3-4) erkennen, dass die Zotten im Duodenum der BDL-Tiere länger sind als die der sham-Tiere. Dieser Unterschied zwischen den vier Gruppen ist nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test). Ein Ghrelin-Effekt ließ sich nicht nachweisen.

HE-Färbung des Jejunums:



HE-Färbung des Kolons:

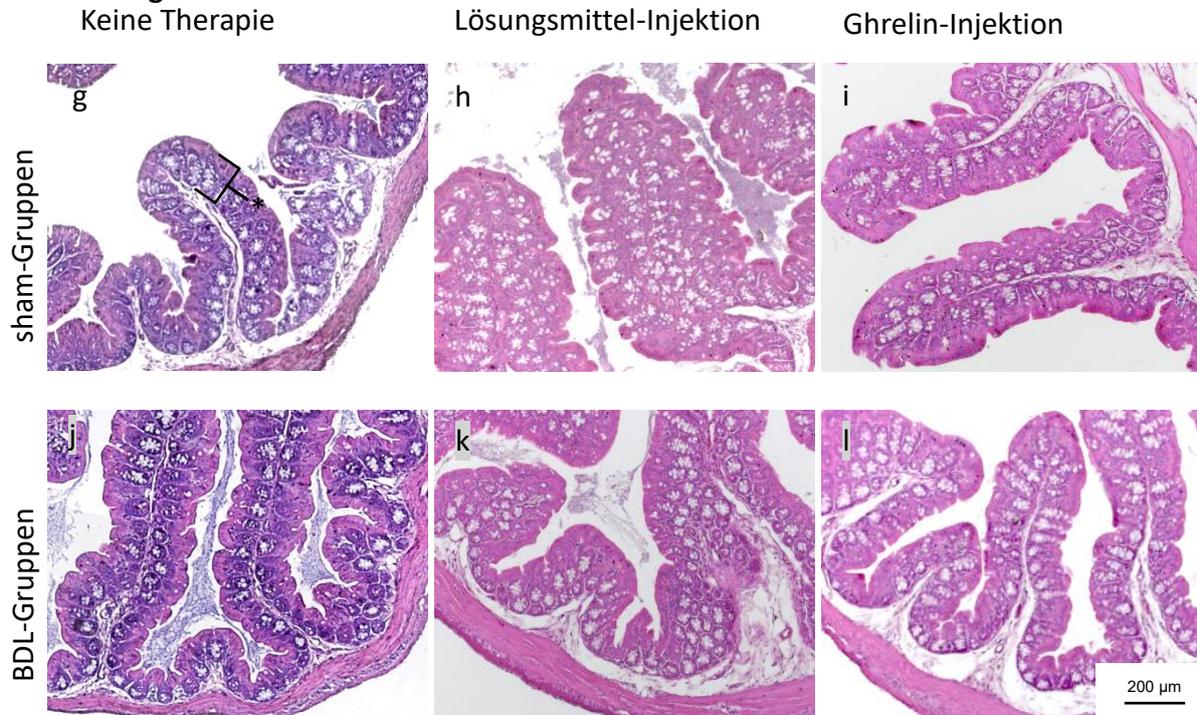


Abbildung 3-3 – HE-Färbung von Jejunum und Kolon: C57BL/6J-Tiere erhielten entweder eine Gallengangligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Danach wurden entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Jeweils eine BDL und eine sham Gruppe erhielten keine Injektionen, resultierend in sechs verschiedene Gruppen. Nach maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon) wurden in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit dem HE-Verfahren gefärbt wurden. Hämatoxylin markiert basophile Zellbestandteile (Zellkern) blau bis lila und Eosin markiert acidophile Zellbestandteile (Zytosol) rot bis rosa. Dargestellt sind Ausschnitte von Jejunum und Kolon in 10-facher Vergrößerung. An gefärbten Schnitten wurde mithilfe der Software ZEN 3.2 (blue edition) die Mukosadicke und die Zottenlänge vermessen (Messschema: Abbildung 2-4). Die Mukosahöhe ist mit Sternchen (*) markiert und die Zottenlänge mit Rauten (#). Die gefärbten Organe sind typisch für die Tiere ihrer Gruppe.

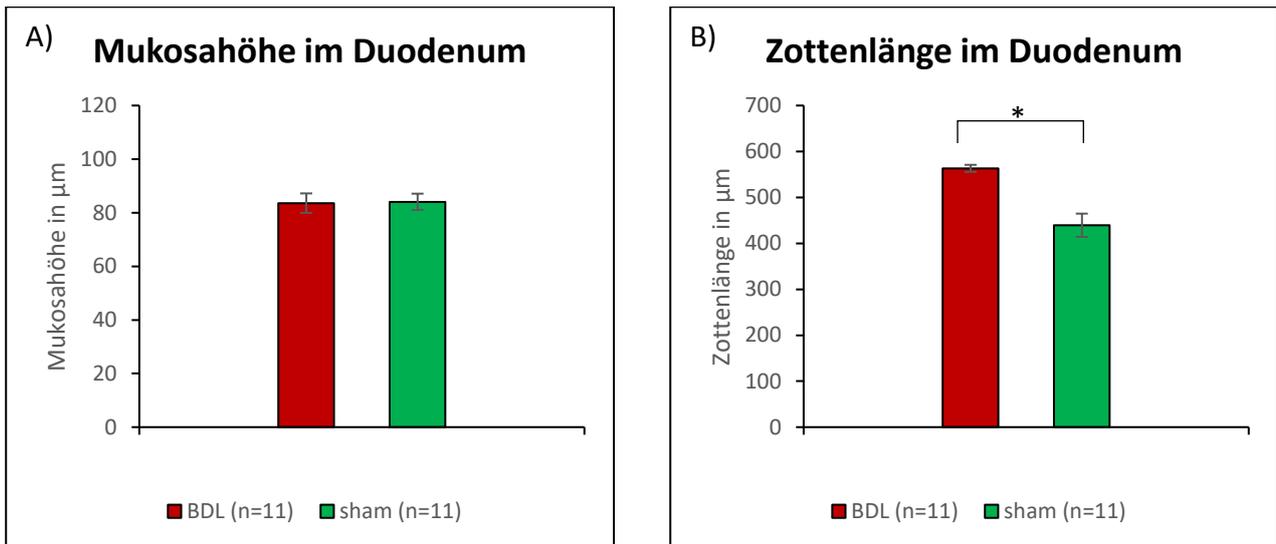


Abbildung 3-4 – Mukosahöhe und Zottenlänge im Duodenum von Gruppen ohne Therapie: C57BL/6J-Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Nach maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Definierte Abschnitte vom Duodenum wurden in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 μm dicke Schnitte angefertigt, welche mit dem HE-Verfahren gefärbt wurden. An digitalisierten, gefärbten Schnitten des Duodenums wurde mithilfe der Software ZEN 3.2 (blue edition) die Mukosadicke (A) und die Zottenlänge (B) vermessen (Messschema: Abbildung 2-4). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von den Gruppen BDL (n=11) und sham (n=11). * $p=0,001$, t-Test.

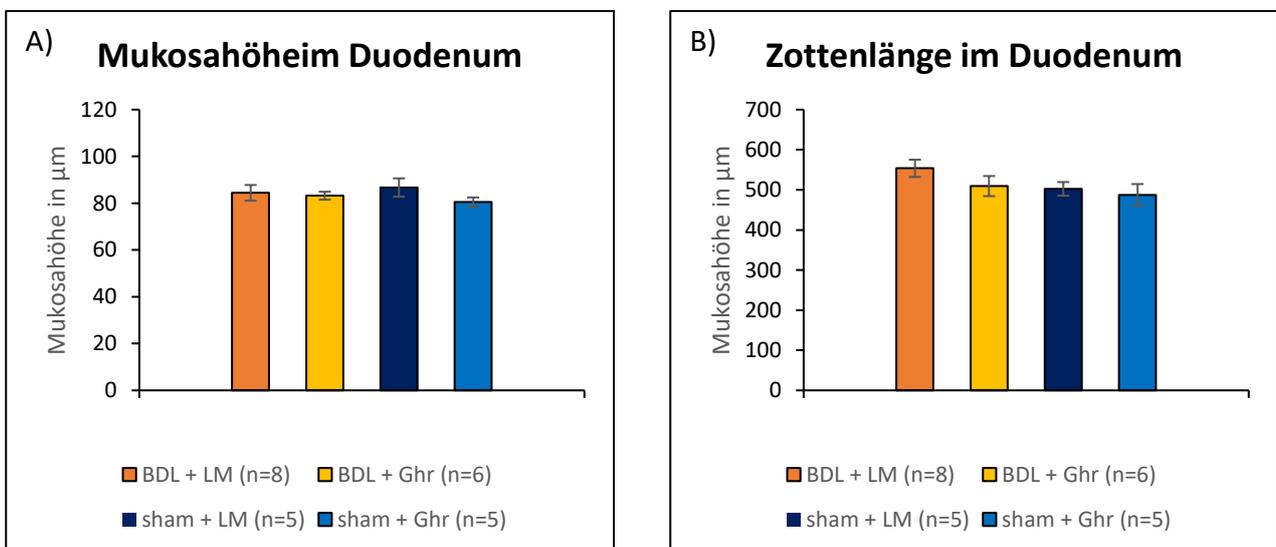


Abbildung 3-5 – Mukosahöhe und Zottenlänge im Duodenum von Therapiegruppen: C57BL/6J-Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) kombiniert mit einer täglichen Injektion von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) mit einem Volumen von 0,2 $\mu\text{l}/\text{g}$ KG. Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Definierte Abschnitte vom Duodenum wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 μm dicke Schnitte angefertigt, welche mit dem HE-Verfahren gefärbt wurden. An digitalisierten, gefärbten Schnitten des Duodenums wurde mithilfe der Software ZEN 3.2 (blue edition) die Mukosadicke (A) und die Zottenlänge (B) vermessen (Messschema: Abbildung 2-4). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von den Gruppen (BDL + LM: n=8; BDL + Ghr n=6; sham + LM: n=5; sham + Ghr: n=5). Keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

3.3 Siriusrot-Färbung

Mithilfe der Siriusrot-Färbung können Kollagenfasern im Lebergewebe der Tiere rot angefärbt werden. Mit dieser Methode sollte exemplarisch bei Tieren der Gruppen sham und BDL eine mögliche Bindegewebsvermehrung dargestellt werden. Die Bilder zeigen jeweils den Ausschnitt des Lebergewebes einer Maus aus der Gruppe sham oder BDL in 5-facher, 10-facher und 20-facher Vergrößerung (Abbildung 3-6).

In Präparaten der sham-Gruppe lassen sich keine Zeichen einer Fibrosierung erkennen (Abbildung 3-6 a; b; c). Bei Tieren aus der BDL-Gruppe ist in allen Präparaten eine Rotfärbung und damit vermutlich eine Fibrosierung vorhanden (* in Abbildung 3-6 a'; b'; c'). Die Bindegewebsvermehrung ist am stärksten an und um Lebervenen (Pfeil in Abbildung 3-6 a'; b'; c') zu erkennen.

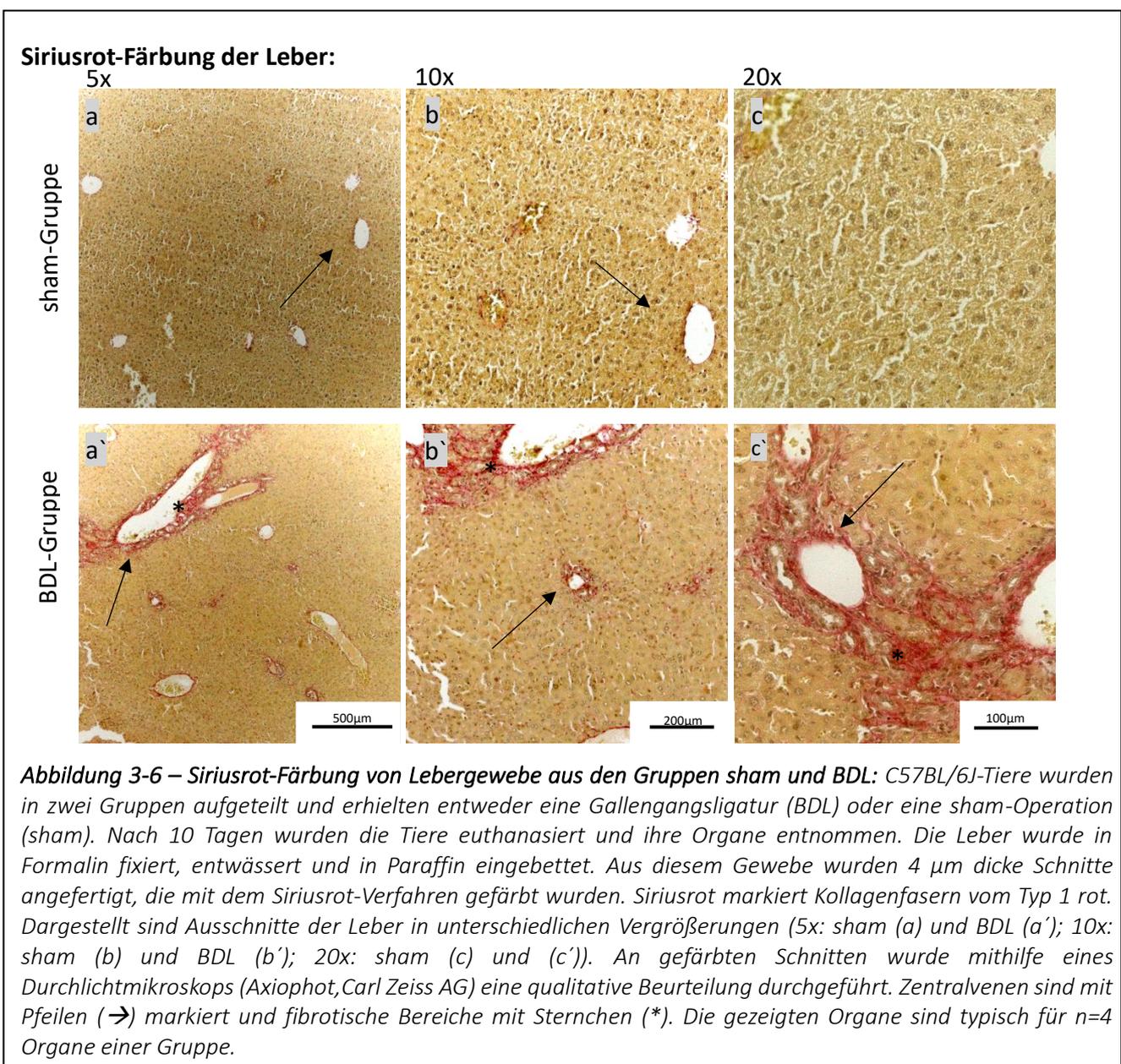


Abbildung 3-6 – Siriusrot-Färbung von Lebergewebe aus den Gruppen sham und BDL: C57BL/6J-Tiere wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die Leber wurde in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit dem Siriusrot-Verfahren gefärbt wurden. Siriusrot markiert Kollagenfasern vom Typ 1 rot. Dargestellt sind Ausschnitte der Leber in unterschiedlichen Vergrößerungen (5x: sham (a) und BDL (a'); 10x: sham (b) und BDL (b'); 20x: sham (c) und (c')). An gefärbten Schnitten wurde mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Axiophot, Carl Zeiss AG) eine qualitative Beurteilung durchgeführt. Zentralvenen sind mit Pfeilen (→) markiert und fibrotische Bereiche mit Sternchen (*). Die gezeigten Organe sind typisch für n=4 Organe einer Gruppe.

3.4 Transmurale Widerstandsmessungen der Darmwand

Zu Beginn jedes Ussing-Kammer-Versuches wurde über den eingespannten Darmabschnitten der transmurale Widerstand gemessen. Die Messpunkte einer Gruppe sind in Form von Boxplots dargestellt (Abbildung 3-7, Abbildung 3-8). Die untere und obere Grenze der Box entsprechen der 25. und 75. Perzentile, die Antennen dem Minimum und Maximum. Der Mittelwert ist durch ein Kreuz gekennzeichnet und der Median durch eine Linie in der Box. Mit dieser Messung sollten Veränderungen in der Durchlässigkeit für Ionen detektiert werden. Je höher der transmurale Widerstand, desto geringer ist die Durchlässigkeit für Ionen anzunehmen. Zusätzlich diente dieser Test auch als Kontrolle für das korrekte Einspannen des Gewebes in die Ussing-Kammer. Bei einem Widerstand von 0Ω war ein Schaden im Darmepithel sehr wahrscheinlich und die entsprechende Probe wurde nicht in die Auswertung mit aufgenommen.

3.4.1 Transmurale Widerstände von BDL- und sham-Tieren

Die gemessenen transmuralen Widerstände im Jejunum lagen für die BDL Gruppe im Mittel bei $48,1 \Omega$ und für die sham-Gruppe bei $62,5 \Omega$ (Abbildung 3-7 A). Für die beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Der transmurale Widerstand im Kolon lag für die BDL Gruppe im Mittel bei $26,0 \Omega$ und für sham-Gruppe bei $49,0 \Omega$ (Abbildung 3-7 B) und somit für ihre jeweilige Gruppe niedriger als im Jejunum. Der Unterschied der Messwerte zwischen der BDL Gruppe und der sham Gruppe im Kolon ist signifikant (* $p < 0,05$, t-Test).

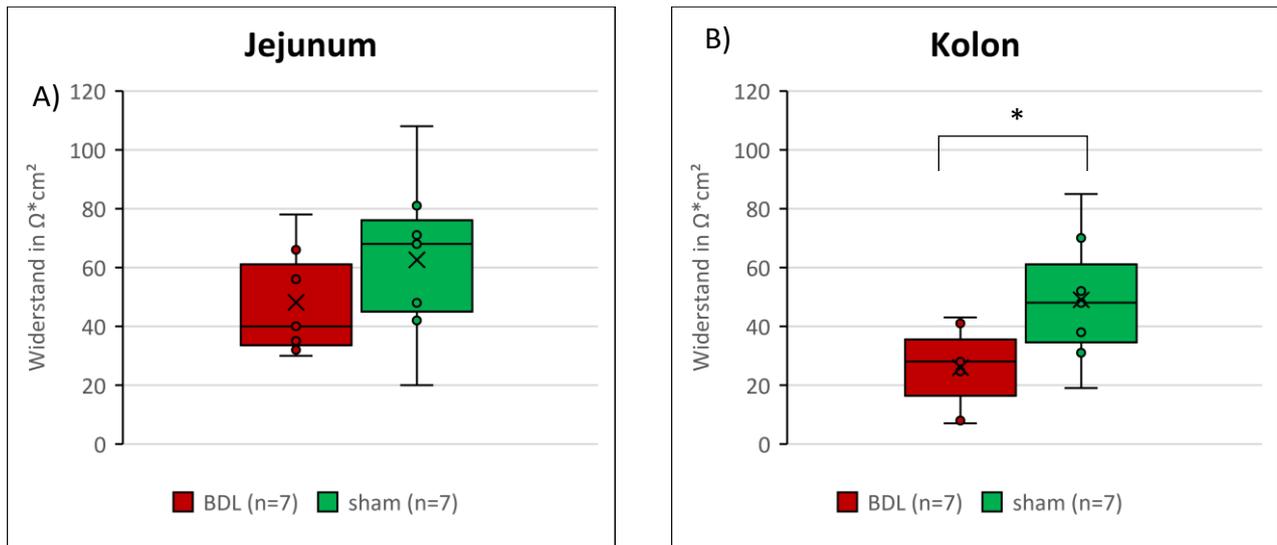
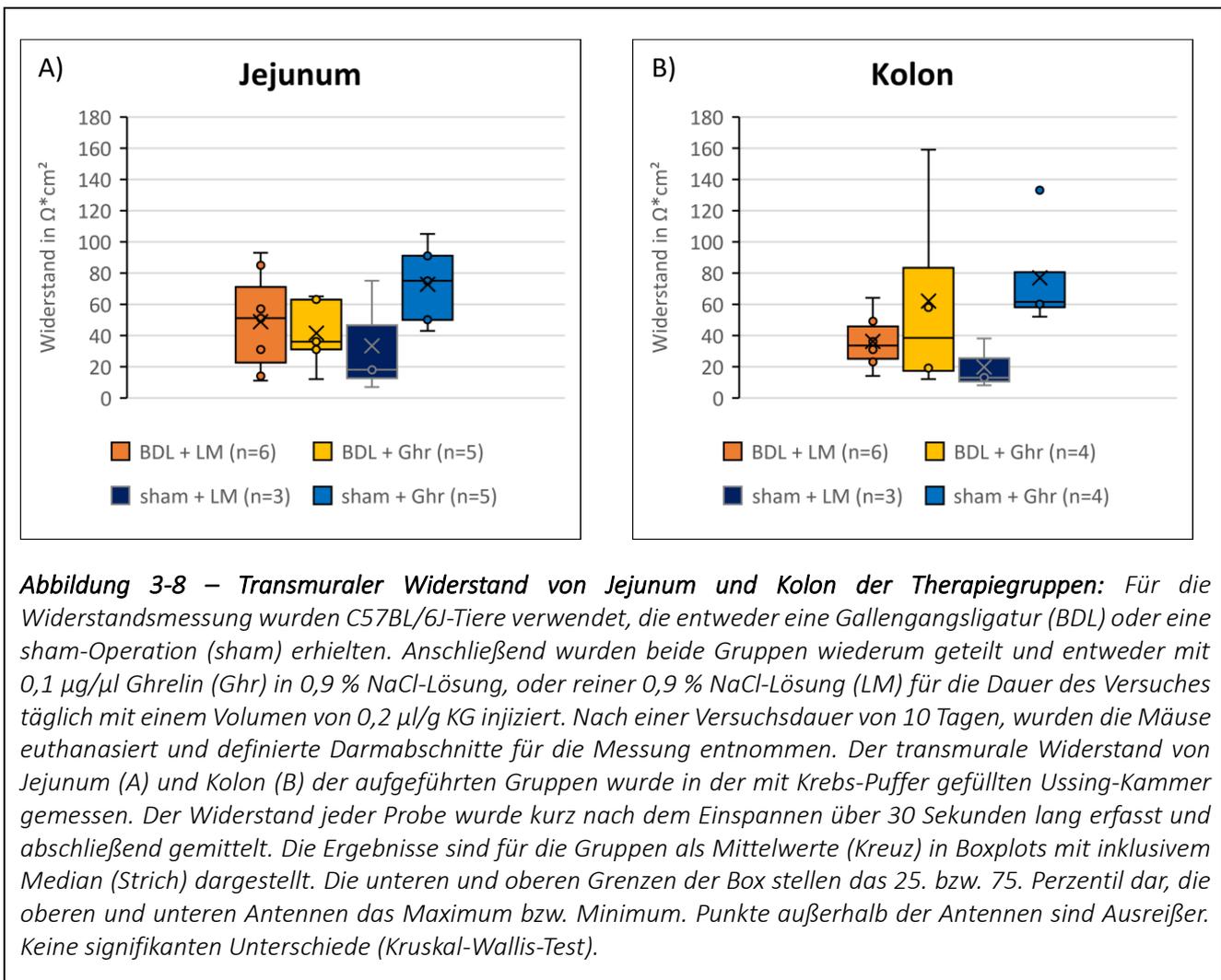


Abbildung 3-7 – Transmurale Widerstände in Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie: Für die Widerstandsmessung wurden C57BL/6J-Tiere verwendet, die entweder eine Gallengangligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) erhalten hatten. Nach einer Versuchsdauer von maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Mäuse euthanasiert und definierte Darmabschnitte für die Messung entnommen. Der transmurale Widerstand von Jejunum (A) und Kolon (B) der aufgeführten Gruppen wurde in der mit Krebs-Puffer gefüllten Ussing-Kammer gemessen. Der Widerstand jeder Probe wurde kurz nach dem Einspannen über 30 Sekunden lang erfasst und abschließend gemittelt. Die Ergebnisse sind für die Gruppen BDL und sham als Mittelwerte (Kreuz) in Boxplots mit inklusivem Median (Strich) dargestellt (n=7). Die unteren und oberen Grenzen der Box stellen das 25. bzw. 75. Perzentil dar, die oberen und unteren Antennen das Maximum bzw. Minimum. * $p < 0,05$, t-Test.

3.4.2 Transmurale Widerstände von den Therapiegruppen

Die gemessenen transmuralen Widerstände im Jejunum für die Gruppe BDL + LM lagen im Mittel bei 54,7 Ω und für die Gruppe BDL + Ghr bei 41,4 Ω . Bei der Gruppe sham + LM lag der mittlere transmurale Widerstand bei 33,3 Ω und bei der Gruppe sham + Ghr bei 72,8 Ω (Abbildung 3-8 A). Innerhalb dieser vier Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Im Kolon lag der mittlere transmurale Widerstand der Gruppe BDL + LM bei 36,2 Ω und der Gruppe BDL + Ghr bei 62,0 Ω . Die Widerstände der Gruppe sham + LM lagen im Mittel bei 19,7 Ω und der Gruppe sham + Ghr bei 77,0 Ω (Abbildung 3-8 B). Es fällt auf, dass der zuvor beobachtete signifikant höhere Widerstand des Kolons sham- vs. BDL-operierter Tiere (Abbildung 3-8 B) hier bereits in den Kontrollgruppen ohne Ghrelingabe nicht nachweisbar war. Hierfür könnten die abweichenden experimentellen Rahmenbedingungen der Therapieserie, aber auch die kleinere Probenzahl (mit) verantwortlich sein. Insbesondere in den sham-Gruppen waren aufgrund messtechnischer Probleme nur wenige Präparate auswertbar.



3.5 FITC-Dextran Assay

Es sollte untersucht werden, ob die Cholestase einen Effekt auf die Integrität der Darmbarriere hat. Dazu wurde mithilfe des FITC-Dextran-Assays die parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon von sham- und BDL-Mäusen verglichen. Die Darmabschnitte wurden gewählt, um dem histologisch unterschiedlichen Aufbau von Dünndarm und Dickdarm gerecht zu werden. Der FITC-Dextran-Assay eignet sich dazu, die parazelluläre Permeabilität von Epithelien unter verschiedenen Einflüssen zu vergleichen (Aguanno et al. 2021). Gemessen wird die Fluoreszenz des FITC-Dextrans, welches über den Verlauf von drei Stunden durch die Darmepithelien diffundiert. Das gemessene Fluoreszenzsignal wird in Relation zur zuvor gemessenen Hintergrundfluoreszenz gesetzt. Dargestellt sind pro Gruppe jeweils die gemittelten Werte der Messzeitpunkte in Prozent \pm SEM. Je höher die relative Fluoreszenz, desto mehr FITC-Dextran ist diffundiert und desto höher ist die parazelluläre Permeabilität des Gewebes.

3.5.1 Parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie

Die gemessene mittlere relative Fluoreszenz der sham-Tiere im Jejunum stieg über den Verlauf von drei Stunden gleichmäßig ungefähr auf ein Dreifaches der Ausgangsfluoreszenz an (Abbildung 3-9 A).

Die gemessene mittlere relative Fluoreszenz der BDL-Tiere stieg im Jejunum nach drei Stunden auf mehr als das Neunfache des Ausgangswertes an. Eine Stunde nach Messstart unterschieden sich die relativen Fluoreszenzen der beiden Gruppen signifikant ($p < 0,05$ Mann-Whitney-U-Test).

Im Kolon stieg die relative Fluoreszenz bei den sham-Tieren auf ein Neunfaches und bei den BDL-Tieren auf ein Dreizehnfaches des Ausgangswertes an (Abbildung 3-9 B). Die relative Fluoreszenz der beiden Gruppen im Kolon unterschieden sich nach eineinhalb Stunden fortlaufend signifikant ($p < 0,05$ t-Test). Sowohl bei sham als auch bei BDL wurde zum Endpunkt nach drei Stunden eine höhere Fluoreszenz im Kolon als im Jejunum gemessen. Für die sham Gruppen war dieser Unterschied ab dem Messpunkt nach zwei Stunden signifikant ($p < 0,005$ Mann-Whitney-U-Test).

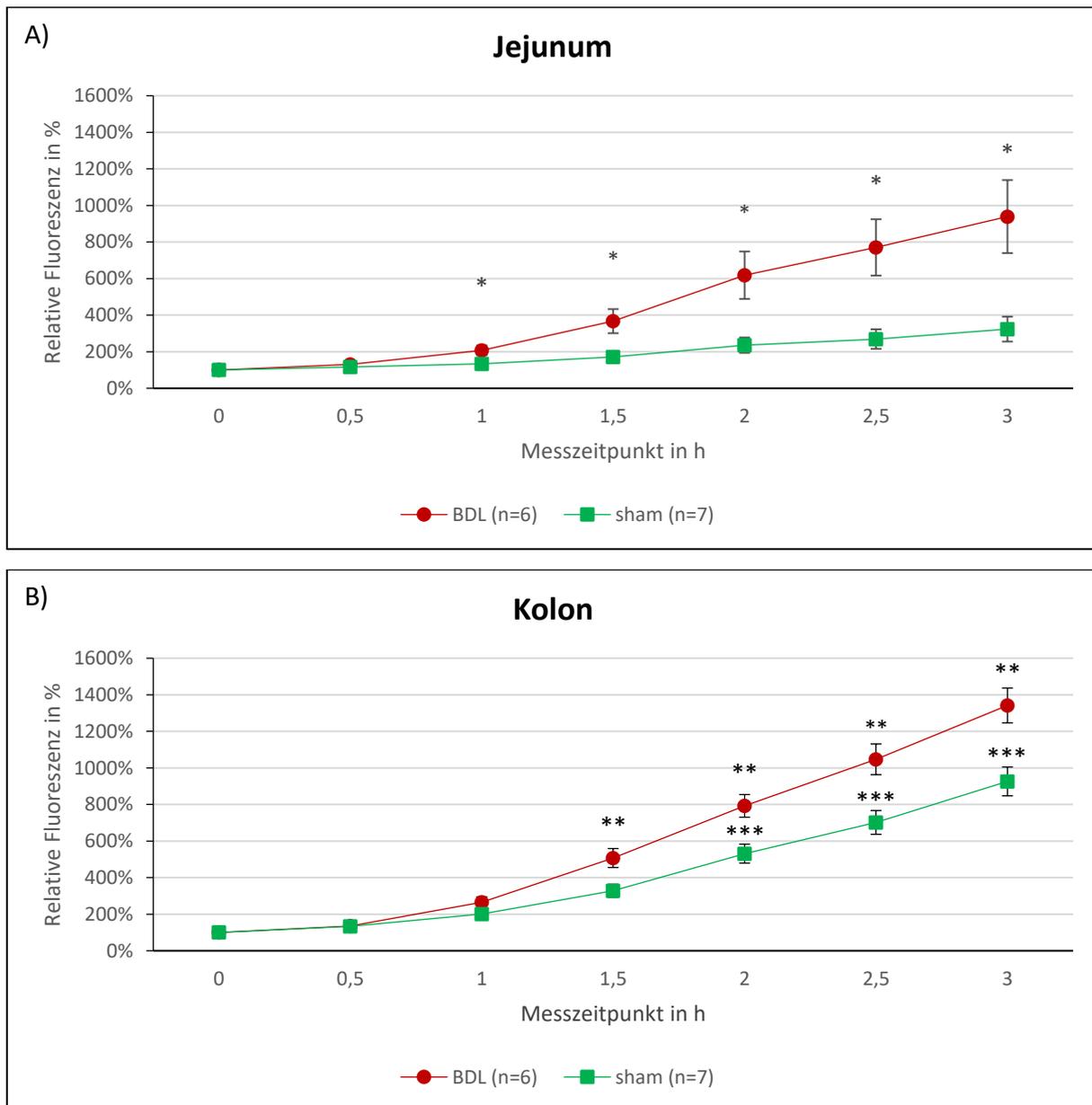


Abbildung 3-9 – Parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie: Für den FITC-Dextran-Assay wurden C57BL/6J-Tiere verwendet, die entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) erhielten. Nach einer Versuchsdauer von maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Mäuse euthanasiert und definierte Darmabschnitte für die Messung entnommen. Das Gewebe aus Jejunum (A) und Kolon (B) der Mäuse wurde für den FITC-Dextran-Assay in die mit Krebs-Puffer gefüllte Ussing-Kammer eingespannt. Auf der luminalen Seite des Darms wurde initial 250 μ l FITC-Dextran zu dem Puffer hinzugegeben. Dann wurde über einen Zeitraum von drei Stunden jede halbe Stunde auf der basalen Seite eine 50 μ l Probe genommen und deren Fluoreszenz gemessen. Die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals wurde in Relation zur zuvor gemessenen Hintergrundfluoreszenz des Puffers gesetzt. Die Werte jeder Gruppe (BDL: n=6, Sham: n=7) sind für jeden Zeitpunkt gemittelt (\pm SEM) in Prozent dargestellt. * $p < 0,05$, vs. sham, Mann-Whitney-U-Test; ** $p < 0,05$, vs. sham, t-Test; *** $p < 0,005$ Kolon sham vs. Jejunum sham, Mann-Whitney-U-Test.

3.5.2 Parazelluläre Permeabilität von Kolon der Therapiegruppen

Aufgrund messtechnischer Gegebenheiten konnten die Werte für die Jejuna der Therapiegruppen nicht verwendet werden. Eine ausführlichere Begründung wird in der Diskussion aufgeführt (Kapitel: 4.5). Im Kolon (Abbildung 3-10) stieg die mittlere relative Fluoreszenz nach drei Stunden in den Gruppen BDL + Ghr, sham + Ghr und sham + LM auf etwas mehr als den fünffachen Wert der Ausgangsfluoreszenz und bei der Gruppe BDL + LM auf fast die achtfache Ausgangsfluoreszenz an. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden nicht, wofür die geringe Probenzahl mitverantwortlich sein könnte. Im Trend wurde jedoch der unter 3.5.1 beschriebene Effekt einer erhöhten FITC-Dextran-Permeabilität nach einer BDL durch die Lösungsmittel-behandelten Gruppen (BDL + LM vs. sham + LM) bestätigt. Auffällig ist weiterhin, dass die Gabe von Ghrelin die mittlere relative Fluoreszenz nach einer BDL (BDL + Ghrelin) numerisch auf das Niveau der Sham-Gruppen absenkte. Dagegen verliefen die Messkurven bei sham-operierten Mäusen mit und ohne Ghrelingabe nahezu deckungsgleich (Gruppen sham + LM und sham + Ghrelin).

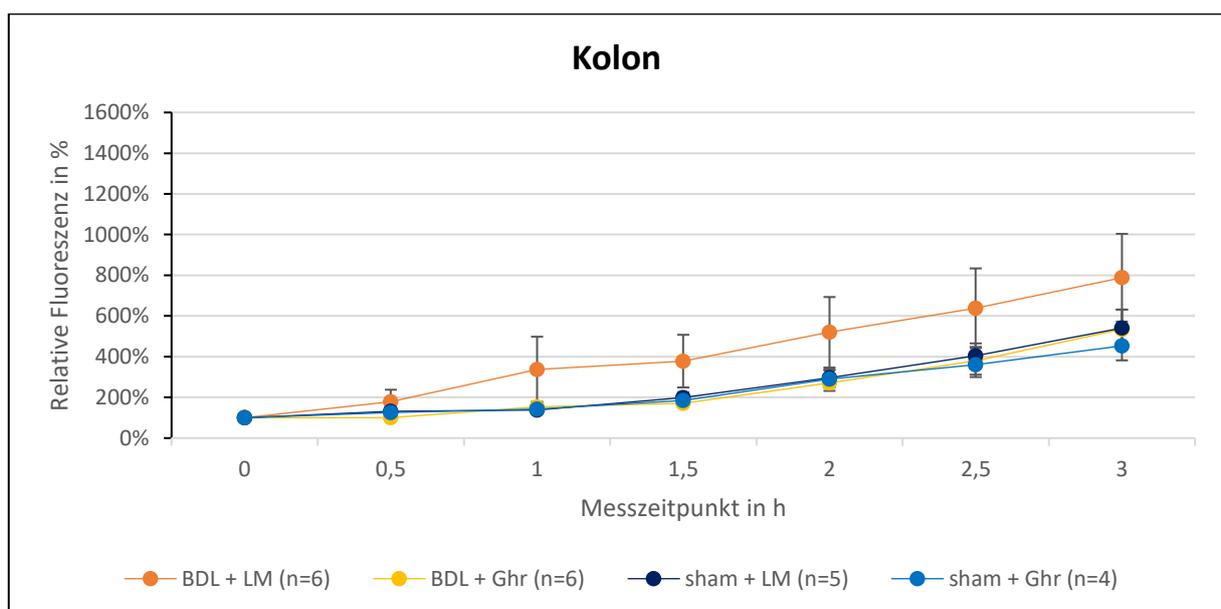


Abbildung 3-10 – Parazelluläre Permeabilität vom Kolon der Therapiegruppen: Für den FITC-Dextran-Assay wurden C57BL/6J-Tiere verwendet, die entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) erhielten. Anschließend wurden beide Gruppen wiederum geteilt und mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder mit reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Nach einer Versuchsdauer von 10 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert und definierte Darmabschnitte für die Messung entnommen. Das Kolon der Mäuse wurde für den FITC-Dextran-Assay in die mit Krebs-Puffer gefüllte Ussing-Kammer eingespannt. Auf der luminalen Seite des Darms wurde initial 250 µl FITC-Dextran hinzugegeben. Dann wurde über einen Zeitraum von drei Stunden jede halbe Stunde auf der basalen Seite eine 50 µl Probe genommen und deren Fluoreszenz gemessen. Die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals wurde in Relation zur zuvor gemessenen Hintergrundfluoreszenz des Puffers gesetzt. Die Werte jeder Gruppe (BDL + LM: n=6; BDL + Ghr n=6; sham + LM: n=5; sham + Ghr: n=4) sind für jeden Zeitpunkt gemittelt (± SEM) in Prozent dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

3.6 Immunhistochemie-Färbungen

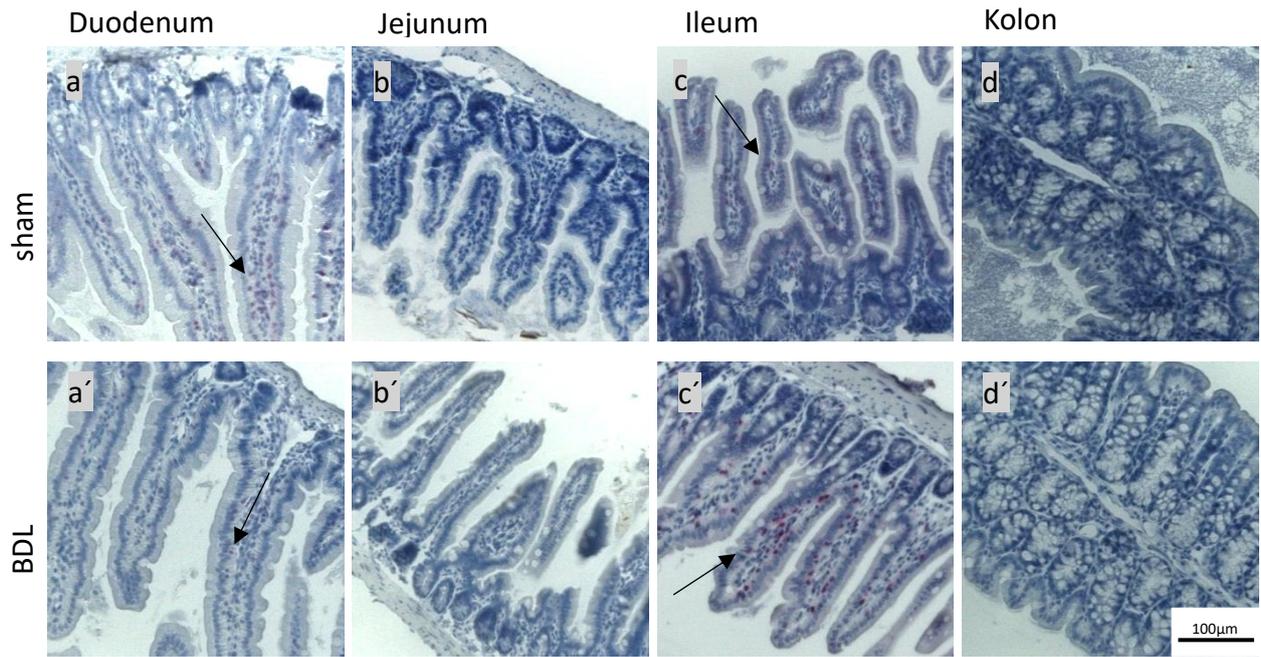
Immunhistochemische Färbungen (ImmPress-Färbetechnik (*Vector Laboratories*, Burlingame, USA)) wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Ansiedlung von Zellen des Immunsystems in den Darmabschnitten der Mäuse sichtbar zu machen. Mit Antikörpern markierte Zellen sind in den Färbungen rot angefärbt. Zellkerne wurden mit Hämalaun blau angefärbt. Es wurden jeweils 3 Tiere aus den Gruppen sham, BDL, sham + Ghr und BDL + Ghr untersucht.

3.6.1 CD3e-Färbung am Darm

CD3e wird überwiegend auf T-Zellen exprimiert. Eine Markierung dieses Komplexes sollte durch Hervorheben der T-Zellen eine Reaktion des spezifischen Immunsystems im Gewebe sichtbar machen.

In Duodenum und Ileum der Gruppen ohne Therapie (sham und BDL) zeigen sich in den Zotten regelmäßig mehrere markierte Zellen (Abbildung 3-11 (a), (a'), (c), (c')). Bei den Gruppen mit Ghrelintherapie (sham + Ghr und BDL + Ghr) sind in *allen* untersuchten Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon) markierte Zellen vorhanden (Abbildung 3-11 (e bis h), (e' bis h')). In den Dünndarmabschnitten befinden sich diese Zellen hauptsächlich in den Zotten. Beim Vergleich der sham-Gruppen mit den jeweiligen BDL-Gruppen (sham vs. BDL und sham + Ghr vs. BDL + Ghr) sind keine Unterschiede aufgefallen. Die Kontrollfärbungen fallen für alle Präparate negativ aus.

CD3e-Anfärbung des Darmes:



CD3e-Anfärbung:

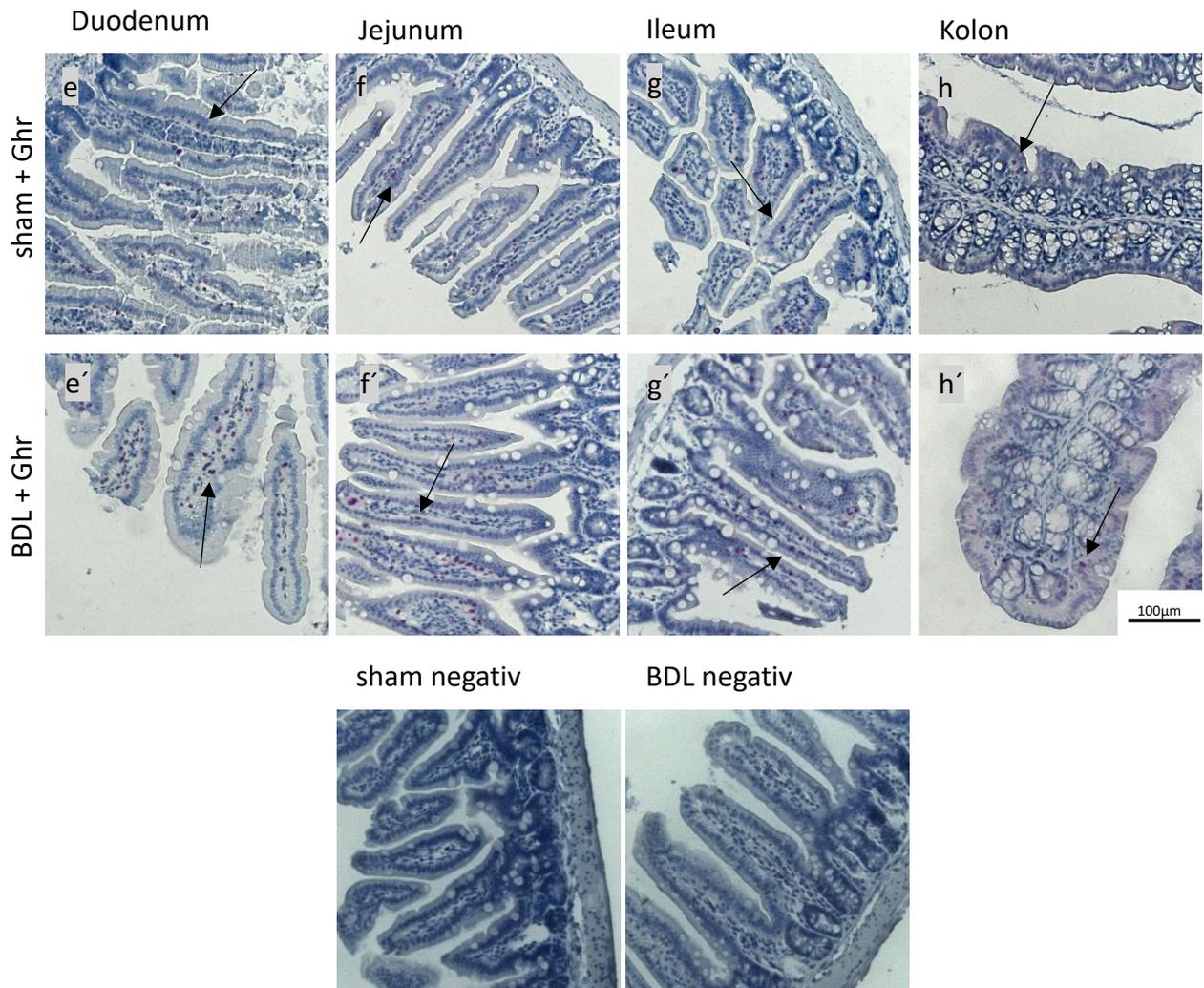


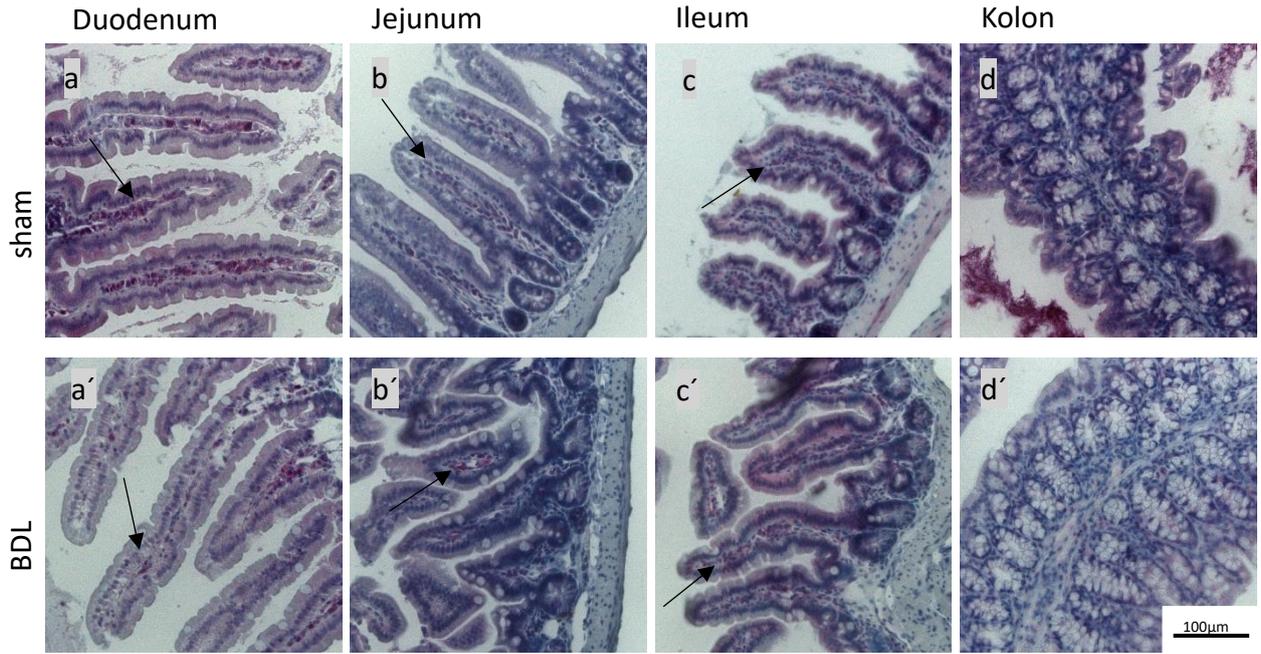
Abbildung 3-11 – Immunhistochemie-Färbung von CD3e in Darmabschnitten: C57BL/6J-Tiere erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Danach wurden sie entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Jeweils eine BDL und eine sham Gruppe erhielten keine Injektionen, resultierend in sechs verschiedene Gruppen. Nach maximal 14 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die Darmabschnitte (Duodenum a; a'; e; e', Jejunum b; b'; f; f'; Ileum c; c'; g; g'; Kolon d; d'; h; h') wurden in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, welche mit dem ImmPRESS-AP-Kit (Vector Laboratories) gefärbt wurden. Mit Antikörpern markierte Zellen stellen sich rot bis violettrot dar. Die Gegenfärbung mit Hämalaun färbt Zellkerne blau an. An gefärbten Schnitten wurde mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Axiophot, Carl Zeiss AG) eine qualitative Beurteilung durchgeführt. Die Gruppen sham + LM und BDL + LM sind nicht aufgeführt. Mit Antikörpern markierte Zellen sind mit Pfeilen (→) gekennzeichnet. Die gefärbten Organe sind jeweils typisch für n=3 Tiere einer Gruppe.

3.6.2 CD11b-Färbung am Darm

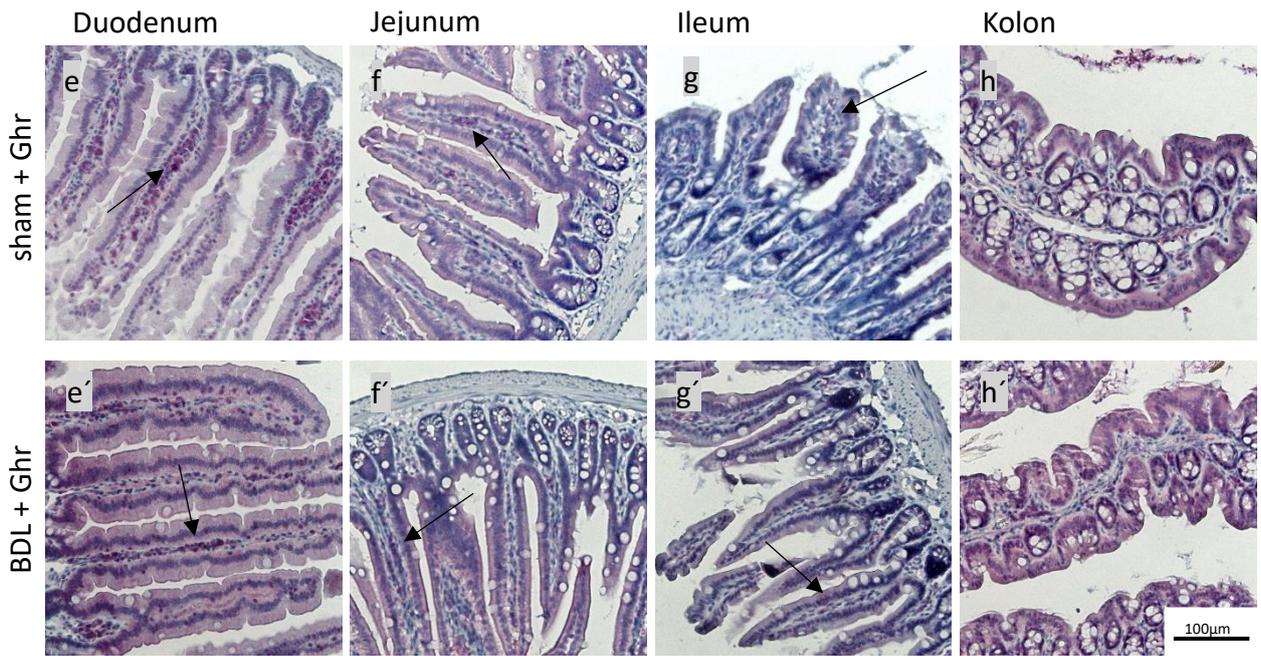
CD11b findet sich auf vielen Zellen des unspezifischen Immunsystems, im Einzelnen: Monozyten, Neutrophile, Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Eine Markierung von CD11b soll durch Hervorheben genannter Zellen eine Reaktion des unspezifischen Immunsystems im Gewebe erkennbar machen.

In den Zotten aller untersuchten Dünndarmabschnitte konnten regelmäßig markierte Zellen aufgefunden werden (Abbildung 3-12 (a bis c), (a' bis c'), (e bis g), (e' bis g')). Im Kolon blieb eine Anfärbung von CD11b-positiven Zellen aus (Abbildung 3-12 (d), (d'), (h), (h')). Beim Vergleich der sham-Gruppen mit den jeweiligen BDL-Gruppen konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Auch fielen keine Effekte einer Ghrelin-Behandlung auf. Die Kontrollfärbungen fielen für alle Präparate negativ aus.

CD11b-Anfärbung des Darmes:



CD11b-Anfärbung



sham + Ghr negativ

BDL + Ghr negativ

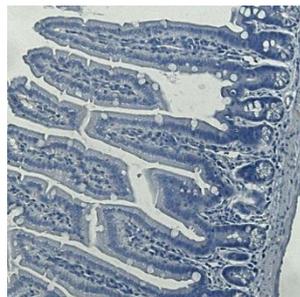
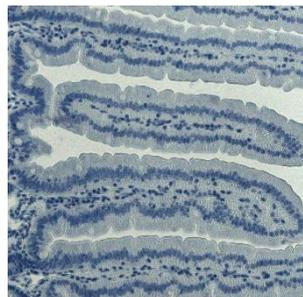


Abbildung 3-12 – Immunhistochemie-Färbung von CD11b in Darmabschnitten: C57BL/6J-Tiere erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Danach wurden sie entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Jeweils eine BDL und eine sham Gruppe erhielten keine Injektionen, resultierend in sechs verschiedene Gruppen. Nach maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Die Darmabschnitte (Duodenum a; a'; e; e'; Jejunum b; b'; f; f' Ileum c; c'; g; g' Kolon d; d'; h; h') wurden in Formalin fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Aus diesem Gewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, welche mit dem ImmPRESS-AP-Kit (Vector Laboratories) gefärbt wurden. Mit Antikörpern markierte Zellen stellen sich rot bis violettrot dar. Die Gegenfärbung mit Hämalaun färbt Zellkerne blau an. An gefärbten Schnitten wurde mithilfe eines Durchlichtmikroskops (Axiophot, Carl Zeiss AG) eine qualitative Beurteilung durchgeführt. Die Gruppen sham + LM und BDL + LM sind nicht aufgeführt. Mit Antikörpern markierte Zellen sind mit Pfeilen (→) gekennzeichnet. Die gefärbten Organe sind jeweils typisch für n=3 Tiere einer Gruppe.

3.7 Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR sollte Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss sowohl die Gallengangsligatur als auch die Ghrelintherapie auf die Expression bestimmter Gene hat. Um einen möglichen Zusammenhang zur Dichtigkeit der Darmwand herzustellen, wurden Gene von Proteinen ausgewählt die mit Tight-Junctions in Jejunum und Kolon von Mäusen assoziiert sind (Krause et al. 2008). In dieser Arbeit wurden *Claudin 2*, *Claudin 4*, *Claudin 7*, *Claudin 15*, *Occludin*, und *ZO-1* untersucht (Abbildung 3-13, Abbildung 3-14).

Zum Ausgleich probenspezifischer Unterschiede wurde die Expression jedes Zielgens ins Verhältnis zu einem *Housekeeping* Gen gesetzt. Auf Basis von Literaturrecherche und eigenen Untersuchungen wurde für Proben aus dem Jejunum Villin und für Proben aus dem Kolon Keratin 8 als *Housekeeping* Gen verwendet (Bastmeyer 2019; Flint et al. 1994).

Die jeweilige mittlere Expression der Zielgene ist in den Diagrammen als Potenz der Differenz zum *Housekeeping* Gen dargestellt ($2^{-\Delta CT}$). Die Antennen zeigen den SEM.

3.7.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Jejunum

Für die Gene *Occludin* und *ZO-1* lassen sich im Jejunum keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen in der Expression feststellen, die sich außerhalb des SEM bewegen (Abbildung 3-13 A, B). Bei *Claudin 2* grenzt sich die Gruppe sham + LM mit einer mehrfach höheren Expression von den anderen Gruppen ab (Abbildung 3-13 C). Aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Gruppe sham + LM ist dieser Effekt jedoch statistisch nicht signifikant.

Für *Claudin 4* zeigt sich in den Gruppen eine Expression in Abhängigkeit von einer Ghrelintherapie und Operation (Abbildung 3-13 D). Dabei haben die sham-Tiere eine höhere Expression des Gens als die BDL-Tiere. Eine Ghrelintherapie steigert gegenüber einer LM-Therapie numerisch die Expression

3 Ergebnisse

von *Claudin 4*. Die Gruppe BDL + LM weist die niedrigste Expression auf und die Gruppe sham + Ghr mit doppelt so hoher Expression die höchste. Der Unterschied zwischen diesen zwei Gruppen ist statistisch signifikant ($p < 0,05$; ANOVA). Ein direkter Vergleich dieser beiden Gruppen ist allerdings biologisch irrelevant, da sie sich sowohl durch Operationsverfahren, als auch durch Injektionstherapie unterscheiden. Der Effekt lässt sich keinem dieser beiden Faktoren eindeutig zuschreiben.

Die Expression von *Claudin 15* unterscheidet sich bei den Gruppen mit LM-Gabe nicht und ist somit unabhängig davon, ob eine BDL durchgeführt wurde oder nicht (Abbildung 3-13 F). Die Gabe von Ghrelin führte in beiden OP-Gruppen (BDL und sham) numerisch zu einer Verringerung der *Claudin 15*-Expression gegenüber den Gruppen mit LM-Therapie. Bei dem Vergleich BDL + Ghr vs. sham + LM konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p < 0,05$, ANOVA). Die beiden Gruppen unterscheiden sich in Therapie und Operation, was einen Vergleich biologisch irrelevant macht.

Für *Claudin 7* zeigen sich im Expressionsmuster ähnliche Tendenzen wie bei *Claudin 15* (Abbildung 3-13 E). Auch hier weisen Gruppen mit gleicher Injektionstherapie ähnlich hohe Genexpression auf. Die Ghrelin-Injektionen führte sowohl in BDL Gruppen als auch in sham Gruppen zu numerisch geringerer Expression als die LM-Injektionen. Statistisch signifikante Unterschiede traten jedoch nicht auf.

Jejunum

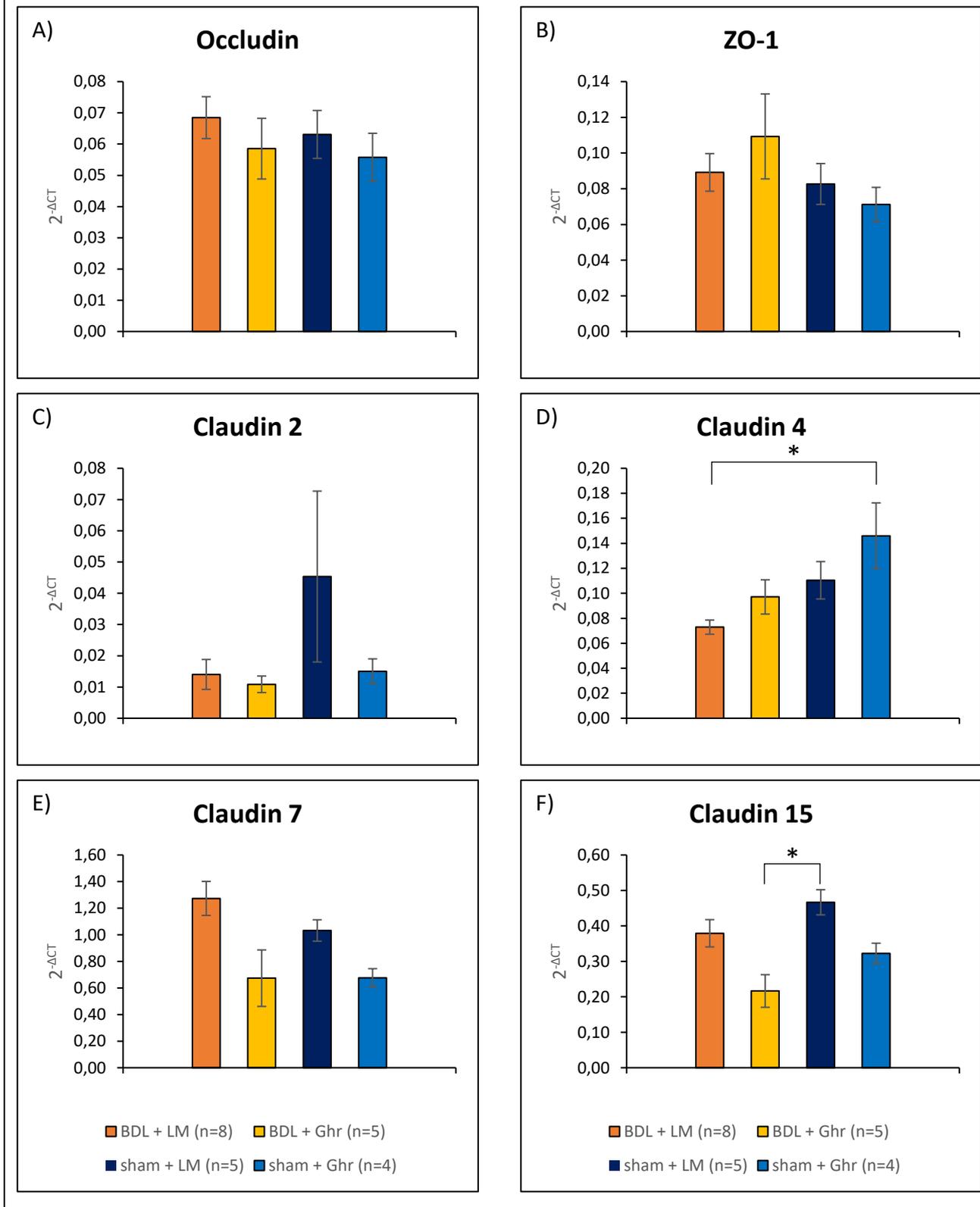


Abbildung 3-13 – Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Jejunum der Therapiegruppen: C57BL/6J-Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) kombiniert mit einer täglichen Injektion von 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG. Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Definierte Abschnitte vom Jejunum wurden schockgefrostet und bei -150 °C aufbewahrt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde aus dem schockgefrosteten Gewebe mit dem RNeasy-MiniKit

3 Ergebnisse

(Qiagen) mRNA gewonnen und mithilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. An dieser cDNA wurde die Genexpression von Tight-Junction Proteinen mittels „TaqMan Methode“ untersucht. Die Expression ist für jede Gruppe gemittelt (\pm SEM) als $2^{-\Delta Ct}$ in Bezug zu dem Housekeeping Gen Villin dargestellt. * $p < 0,05$ ANOVA, Post-hoc-Test: Bonferroni.

3.7.2 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Kolon

Für *Occludin* und *ZO-1* war die Genexpression in der Gruppe BDL + Ghr mit jeweils mehr als doppelt so hoher Expression signifikant höher als in der Gruppe BDL + LM ($p < 0,01$ (ANOVA); Abbildung 3-14 A, B). Nach einer sham-OP wurden für beide Gene zwar ähnliche Tendenzen beobachtet, jedoch keine statistisch signifikanten Effekte für Ghrelin. Die Expression von *ZO-1* ist in der Gruppe sham + Ghr signifikant höher als in der Gruppe BDL + LM ($p < 0,01$; ANOVA). Biologisch ist dieser Vergleich irrelevant, da sich die Gruppen sowohl durch Operationsverfahren als auch durch Injektionstherapie unterscheiden.

Die Expression von *Claudin 4* ist im Kolon für die Gruppe BDL + Ghr doppelt so hoch wie für die der Gruppe BDL + LM (Abbildung 3-14 D). Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,01$; Kruskal-Wallis-Test). Bei den sham-Gruppen hatte die Ghrelintherapie keinen größeren Einfluss auf die Expression dieses Gens. Sie unterscheidet sich für diese Gruppen nicht. Die Expression des Gens in den sham-Gruppen ist höher als in der Gruppe BDL + LM, aber niedriger als in der Gruppe BDL + Ghr.

Die Gene *Claudin 2* und *Claudin 7* zeigen ähnliche Expressionsmuster wie *Claudin 4* mit der höchsten Expression in der Gruppe BDL + Ghr und deutlich niedrigeren Expression in der Gruppe BDL + LM (Abbildung 3-14 C, E). Die sham Gruppen unterscheiden sich nicht innerhalb ihres SEM. Es gibt keine signifikanten Unterschiede für die Gene *Claudin 2* und *Claudin 7*. Für *Claudin 15* finden sich ebenfalls nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 3-14 F). Die Gruppe BDL + LM wies die geringste Expression dieses Gens auf, während die übrigen Gruppen sich innerhalb ihres SEM nicht unterschieden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Kolon

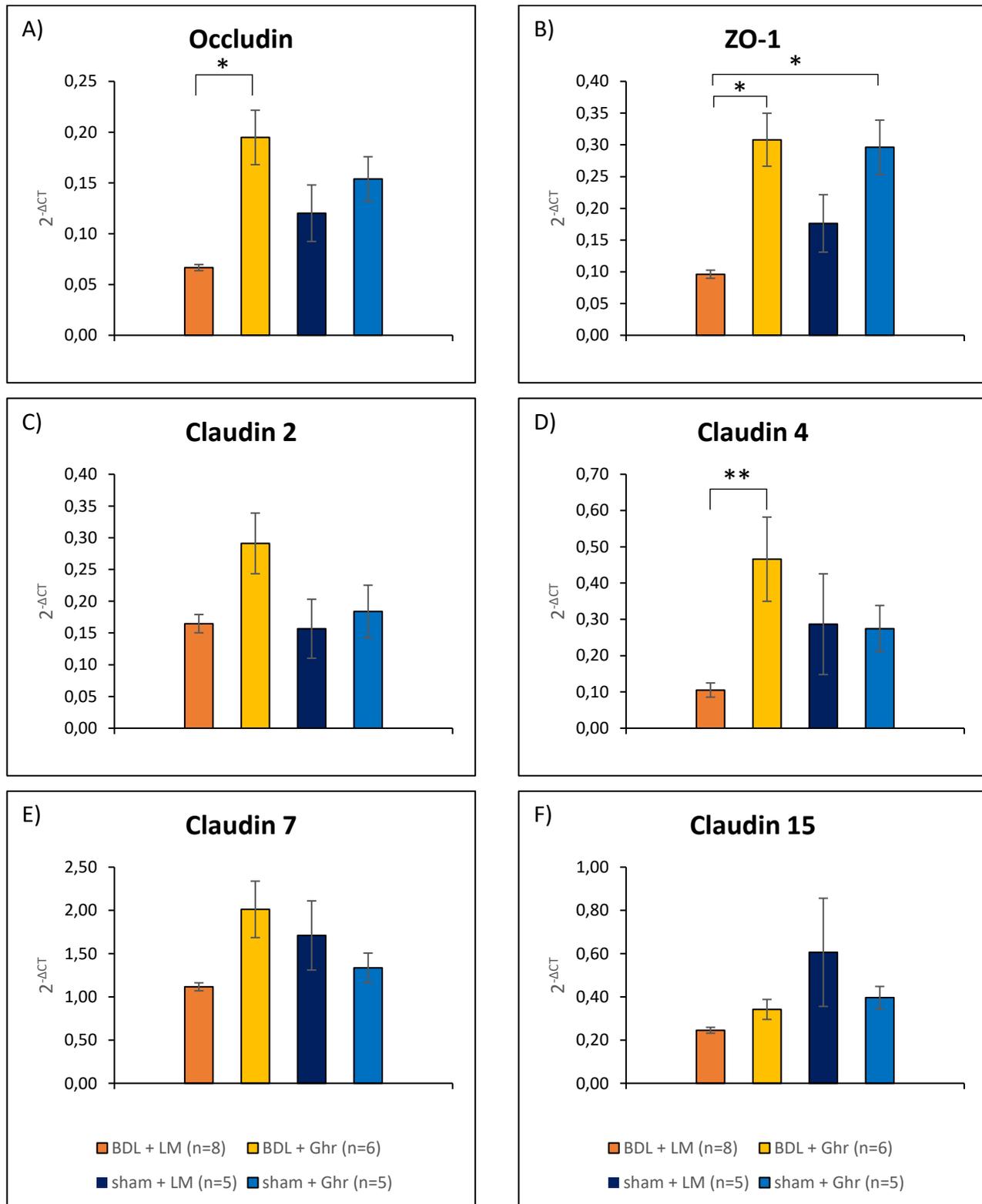


Abbildung 3-14 – Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Kolon der Therapiegruppen: C57BL/6J-Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt und erhielten entweder eine Gallengangsligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham) kombiniert mit einer täglichen Injektion von 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG. Nach 10 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. Definierte Abschnitte vom Kolon wurden schockgefrostet und bei -150 °C aufbewahrt. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde aus dem schockgefrosteten Gewebe mit dem RNeasy-MiniKit (Qiagen) mRNA

3 Ergebnisse

gewonnen und mithilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. An dieser cDNA wurde die Genexpression von Tight-Junction Proteinen mittels „TaqMan Methode“ untersucht. Die Expression ist für jede Gruppe gemittelt (\pm SEM) als $2^{-\Delta Ct}$ in Bezug zu dem Housekeeping Gen Keratin 8 dargestellt. ****** $p < 0,01$ Kruskal-Wallis-Test; ***** $p < 0,01$ ANOVA, Post-hoc-Test: Bonferroni.

3.8 Blutanalyse

Zum Ende der Versuche wurde jeder Maus Blut abgenommen. Das daraus gewonnene Blutplasma wurde am Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der UMR weiter untersucht. Die dabei gemessenen Routineparameter sind in nachfolgenden Tabellen mit SEM aufgeführt (Tabelle 3-1 bis Tabelle 3-8). Die Gruppen mit Therapie und ohne Therapie wurden jeweils voneinander getrennt einer statistischen Analyse unterzogen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind fett hervorgehoben und in den Tabellenbeschriftungen bezüglich des statistischen Verfahrens erläutert.

3.8.1 Elektrolyte

Fast alle untersuchten Elektrolyte (Kalium, Calcium, Magnesium, Phosphat) waren in der BDL-Gruppe signifikant höher konzentriert als in der sham-Gruppe ($p < 0,05$ (t-Test); Tabelle 3-1). Die Konzentration von Natrium war bei beiden Gruppen gleich.

Eine Ghrelin-Therapie hatte mit oder ohne BDL nahezu keinen Einfluss auf die Elektrolytkonzentrationen (Tabelle 3-2). Eine Ausnahme machte das Calcium, das in der Gruppe BDL + LM geringfügig, aber signifikant höhere Messwerte verzeichnete als in der Gruppe sham + Ghr ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test).

Tabelle 3-1 – Elektrolyte im Blutplasma der Tiere ohne Therapie

Blutparameter\Tiergruppe	BDL (n=15)	± SEM	sham (n=17)	± SEM
Natrium mmol/l	147,07	±5,83	153,76	±1,13
Kalium mmol/l	6,38^a	±0,41	4,82	±0,28
Calcium mmol/l	2,71^b	±0,11	2,08	±0,04
Magnesium mmol/l	1,39^b	±0,08	1,09	±0,04
Phosphat mmol/l	2,86^a	±0,21	2,3	±0,11

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham-Gruppe, t-Test; ^b $p < 0,05$ vs. sham Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 3-2 – Elektrolyte im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie

Blutparameter\ Tiergruppe	BDL + LM (n=8)	± SEM	BDL + Ghr (n=5)	± SEM	sham + LM (n=5)	± SEM	sham + Ghr (n=5)	± SEM
Natrium mmol/l	152,50	± 2,88	156,00	± 2,50	153,60	± 1,15	153,00	± 1,65
Kalium mmol/l	4,53	± 0,28	3,94	± 0,36	3,60	± 0,10	4,28	± 0,64
Calcium mmol/l	2,78^a	± 0,06	2,63	± 0,05	2,28	± 0,04	2,10	± 0,09
Magnesium mmol/l	1,25	± 0,06	1,16	± 0,03	1,04	± 0,05	1,09	± 0,07
Phosphat mmol/l	2,01	± 0,10	1,73	± 0,11	1,85	± 0,08	1,92	± 0,15

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham + Ghr, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test: Bonferroni.

3.8.2 Enzyme und Proteine

Die Konzentrationen von CRP und Präalbumin sind nicht aufgeführt, da ihre Werte unterhalb der Messschwelle lagen. (CRP < 1 mg/l; Präalbumin $< 0,03$ g/l). Für Albumin ergaben sich kaum numerische und keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen, weshalb es ebenfalls nicht aufgeführt ist.

Die BDL-Gruppe zeigte bei allen untersuchten Enzymen zum Entnahmetag stark erhöhte Werte gegenüber der sham-Gruppe (Tabelle 3-3). Für ASAT, ALAT, AP und α -Amylase sind die Werte der BDL-Gruppe um mehr als das 10-fache höher als die der sham-Gruppe. Die höheren Werte der BDL-Tiere grenzen sich signifikant zu den Werten der sham-Tiere ab ($p < 0,05$; t-Test/Mann-Whitney-U-Test).

3 Ergebnisse

Beim Vergleich der Aktivität der Enzyme in den Gruppen mit Therapie besteht ein klarer Unterschied zwischen den BDL-Gruppen und den sham-Gruppen. Die Gruppe BDL + LM grenzt sich signifikant zu den sham-Gruppen (sham + LM und sham + Ghr) ab ($p < 0,05$; ANOVA/Kruskal-Wallis-Test). Dieser Unterschied zeigt sich für die Gruppe BDL + Ghr für die Aktivität von ASAT und Pseudo-Cholinesterase ebenfalls ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Ghrelintherapie hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme. Tiere, die die gleiche Operation durchlaufen hatten, zeigten nach unterschiedlicher Therapie keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten ihrer Enzyme.

Tabelle 3-3 – Enzyme im Blutplasma der Tiere ohne Therapie

Blutparameter \ Tiergruppe	BDL (n=15)	± SEM	sham (n=17)	± SEM
ASAT (GOT) U/l	1470,47^a	±225,81	116,53	±12,33
ALAT (GPT) U/l	713,15^a	±114,19	50,70	±7,92
AP U/l	1476,67^b	±182,32	78,77	±3,40
Pseudo-Cholinesterase U/l	5055,33^b	±292,07	3324,12	±58,11
α-Amylase U/l	12333,13^b	±4586,57	2892,65	±123,66
Lipase U/l	473,22^b	±143,92	60,30	±6,47

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. ASAT = Aspartat-Aminotransferase, ALAT = Alanin-Aminotransferase, AP = Alkalische Phosphatase. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham-Gruppe, t-Test; ^b $p < 0,05$ vs. sham-Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 3-4 – Enzyme im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie

Blutparameter/ Tiergruppe	BDL + LM (n=8)	± SEM	BDL + Ghr (n=5)	± SEM	sham + LM (n=5)	± SEM	sham + Ghr (n=5)	± SEM
ASAT (GOT) U/l	807,88^{a,b}	±80,35	630,60^{a,b}	±63,82	50,22	±6,45	100,88	±26,98
ALAT (GPT) U/l	526,75^{c,d}	±42,92	391,20	±46,77	21,38	±1,18	61,72	±36,51
AP U/l	1619,25^{c,d}	±99,40	1213,40	±200,13	90,96	±5,96	78,50	±2,69
Pseudo- Cholinesterase U/l	5826,25^{a,b}	±141,12	5312,00^{a,b}	±325,34	3210,00	±126,42	3330,00	±64,74
α-Amylase U/l	8104,88^{c,d}	±1730,22	4456,80	±376,82	2550,60	±98,17	2675,00	±89,93
Lipase U/l	404,74^{c,d}	±108,65	164,34	±45,49	56,78	±2,80	59,38	±7,56

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. ASAT = Aspartat-Aminotransferase, ALAT = Alanin-Aminotransferase, AP = Alkalische Phosphatase. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham + LM, ^b $p < 0,05$ vs. sham + Ghr, ANOVA; Post-hoc-Test: Bonferroni; ^c $p < 0,05$ vs. sham + LM; ^d $p < 0,05$ gegenüber sham + Ghr, Kruskal-Wallis-Test.

3.8.3 Lipide

Das Cholesterol zeigte bei den BDL-Mäusen stark erhöhte Konzentrationen (Tabelle 3-5). Diese Erhöhung ist im Vergleich zu den sham-Mäusen signifikant ($p < 0,05$; t-Test). Die Triglycerid-Konzentration im Blut der Mäuse zeigt keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Bei den Gruppen mit Therapie zeigten die BDL-Gruppen gleich hohe Cholesterol-Konzentrationen im Blut (Tabelle 3-6). In den sham-Gruppen blieben die Cholesterol-Werte hingegen niedrig. Zwischen den BDL-Gruppen und den sham-Gruppen besteht jeweils ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Die Triglycerid-Konzentrationen waren in allen Gruppen gleich niedrig. Zwischen den Gruppen mit gleicher Operation bestanden keine Unterschiede. Ein Effekt von Ghrelin ist nicht erkennbar.

3 Ergebnisse

Tabelle 3-5 – Lipide im Blutplasma der Tiere ohne Therapie

Blutparameter\Tiergruppe	BDL (n=15)	± SEM	sham (n=17)	± SEM
Cholesterol mmol/l	19,41^a	±1,43	2,26	0,09
Triglyceride mmol/l	0,70	±0,07	0,84	±0,07

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham-Gruppe t-Test.

Tabelle 3-6 – Lipide im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie

Blutparameter\ Tiergruppe	BDL + LM (n=8)	± SEM	BDL + Ghr (n=5)	± SEM	sham + LM (n=5)	± SEM	sham + Ghr (n=5)	± SEM
Cholesterol mmol/l	21,10^{a,b}	±2,01	18,70^{a,b}	±1,81	2,32	±0,12	2,26	±0,07
Triglyceride mmol/l	0,60	±0,05	0,61	±0,04	1,29	±0,14	0,98	±0,08

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ vs. sham + LM, Kruskal-Wallis; ^b $p < 0,05$ vs. sham + Ghr, Kruskal-Wallis-Test, Post-hoc-Test: Bonferroni.

3.8.4 Metabolite

Die Plasmakonzentrationen für alle Bilirubin-Werte in der BDL-Gruppe sind um mehr als das Hundertfache höher als in der sham-Gruppe ($p < 0,001$ (t-Test); (Tabelle 3-7)). Die Glucosekonzentration im Blut der BDL-Tiere war im Mittel halb so hoch wie bei den sham-Tieren. Auch dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$; Mann-Whitney-U-Test).

Bei der Betrachtung der Gruppen mit Therapie zeigt sich die gleiche Verteilung zwischen BDL- und sham Gruppen wie bei den Gruppen ohne Therapie (Tabelle 3-8). Die Bilirubin-Werte liegen bei den BDL-Gruppen um ein Vielfaches höher als bei den sham-Gruppen. Diese Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$; ANOVA/ Kruskal-Wallis-Test). Die Blutplasmakonzentration von Glucose ist in den beiden BDL-Gruppen signifikant niedriger als bei den sham-Gruppen ($p < 0,01$; ANOVA). Innerhalb der Gruppen, die die gleiche Operation durchliefen, zeigten sich keine Unterschiede nach unterschiedlicher Therapie. Ein Ghrelineffekt ist somit nicht nachweisbar.

Tabelle 3-7 – Metabolite im Blutplasma der Tiere ohne Therapie

Blutparameter\Tiergruppe	BDL (n=15)	± SEM	sham (n=17)	± SEM
Bilirubin (ges.) $\mu\text{mol/l}$	311,33^a	$\pm 19,80$	2,40	$\pm 0,23$
Bilirubin (dir.) $\mu\text{mol/l}$	164,55^a	$\pm 9,80$	0,62	$\pm 0,09$
Bilirubin (indir.) $\mu\text{mol/l}$	146,79^a	$\pm 11,21$	1,77	$\pm 0,21$
Glucose mmol/l	7,90^b	$\pm 0,83$	16,21	$\pm 1,39$

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,001$ gegenüber sham-Gruppe, t-Test; ^b $p < 0,001$ gegenüber sham-Gruppe, Mann-Whitney-U-Test.

Tabelle 3-8 – Metabolite im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie

Blutparameter\ Tiergruppe	BDL + LM (n=8)	± SEM	BDL + Ghr (n=5)	± SEM	sham + LM (n=5)	± SEM	sham + Ghr (n=5)	± SEM
Bilirubin (ges.) $\mu\text{mol/l}$	327,25^{a,b}	$\pm 5,56$	338,40^{a,b}	$\pm 13,45$	2,61	$\pm 0,16$	2,80	$\pm 0,08$
Bilirubin (dir.) $\mu\text{mol/l}$	174,75^{a,b}	$\pm 4,56$	171,00	$\pm 8,92$	0,57	$\pm 0,13$	0,74	$\pm 0,34$
Bilirubin (indir.) $\mu\text{mol/l}$	152,50^a	$\pm 4,49$	167,40^{a,b}	$\pm 7,97$	2,04	$\pm 0,28$	2,06	$\pm 0,32$
Glucose mmol/l	6,85^{c,d}	$\pm 0,53$	5,76^{c,d}	$\pm 0,29$	14,74	$\pm 1,66$	13,82	$\pm 1,89$

Dargestellt sind die Mittlere Konzentration (\pm SEM) jeder Gruppe. Fettgedruckte Zahlen weisen auf signifikante Unterschiede hin. ^a $p < 0,05$ gegenüber sham + LM, Kruskal-Wallis; ^b $p < 0,05$ gegenüber sham + Ghr, Kruskal-Wallis-Test; ^c $p < 0,01$ gegenüber sham + LM, ANOVA; ^d $p < 0,01$ gegenüber sham + Ghr, ANOVA; Post-hoc-Test: Bonferroni.

3.9 Hinweis zur Veröffentlichung der dargestellten Ergebnisse

Der Großteil der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde in einem Originalartikel veröffentlicht (Ehlers et al. 2022):

Ehlers, Luise; Netz, Leonard; Reiner, Johannes; Berlin, Peggy; Bannert, Karen; Bastian, Manuela; Zechner, Dietmar; Lamprecht, Georg; Jaster, Robert (2022): Effects of Bile Duct Ligation and Ghrelin Treatment on the Colonic Barrier and Microbiome of Mice. In: *Pharmacology* 107 (11-12), S. 564–573.

4 Diskussion

Das BDL-Mausmodell dient als Annäherung an den klinischen Verlauf einer cholestatischen Leberschädigung beim Menschen. Da gezielte Studien zu den Auswirkungen der Cholestase an menschlichem Probenmaterial nur eingeschränkt durchführbar sind, stellen Tiermodelle einen unverzichtbaren Ersatz dar. Das BDL-Modell ist eine etablierte Methode, um Folgen der cholestatischen Leberschädigung zu untersuchen (O'Brien et al. 2016; Liedtke et al. 2013). Diese Arbeit zeigt die Auswirkung von cholestatischen Lebererkrankungen auf die Darmbarriere und untersucht einen möglichen Therapieeffekt von Ghrelin.

4.1 Gewichtsverläufe

Das Gewicht der Mäuse aus den sham-Gruppen blieb über den Zeitraum des Versuches nah bei ihrem Startgewicht. Die Tiere aus den BDL-Gruppen verloren ca. 20 % ihres Startgewichtes innerhalb der ersten 2 Tage nach der Operation (Abbildung 3-1). Im weiteren Verlauf hielten die Tiere dieses Gewicht bis zwei Tage vor Ende des Versuches. Dann zeigte sich ein weiterer geringer Gewichtsverlust um ca. 5 %. Eine Ghrelintherapie zeigte weder bei sham-Tieren noch bei BDL-Tieren einen statistisch signifikanten Effekt auf diesen Gewichtsverlauf im Vergleich zur LM-Injektion.

Der starke Gewichtsunterschied zwischen BDL und sham-Mäusen weist auf das Ausmaß der pathologischen Prozesse nach der BDL hin. Im Zentrum dieser pathophysiologischen Vorgänge steht die Leberschädigung. Ausgehend von der stark eingeschränkten Leberfunktion führen mehrere Faktoren zum Gewichtsverlust. Dazu zählen erhöhter Energie- und Proteinbedarf durch unterschwellige systemische sowie lokale Entzündungsprozesse, Toxinanreicherung und Muskelschwund (Meyer et al. 2020).

Die Ghrelintherapie hatte keinen Einfluss auf die Gewichtsverläufe. Die häufig beschriebene Gewichtszunahme als Folge der hungersteigernden Wirkung von Ghrelin blieb aus (Tschöp et al. 2000; Wren et al. 2000; Asakawa et al. 2001). Die Verdauung war ohne Gallensäuresekretion in den Darm erheblich eingeschränkt. Der Hauptanteil der Fettverdauung sowie die Aufnahme fettlöslicher Vitamine benötigen Gallensäuren zur Emulgierung der Fettsäuren. Zusätzlich ist anzunehmen, dass die systemischen Auswirkungen der Leberzirrhose und die dauerhaft bestehende Cholestase auf die Körper der Mäuse zu gravierend waren, als dass eine erhöhte Nahrungsaufnahme zu einer Gewichtszunahme hätte führen können.

4.2 Leber-Histologie

4.2.1 HE-Färbungen

Die Untersuchung der Leberpräparate weist klare Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen auf. Alle BDL-Gruppen wiesen innerhalb des Lebergewebes Nekrosen sowie Zeichen beginnender Fibrosierung auf (Abbildung 3-2). Die Präparate der sham-Gruppen zeigten ohne Ausnahme das Bild einer gesunden Leber. Ein Effekt von Ghrelin ließ sich sowohl in den BDL- als auch den sham-Gruppen nicht erkennen.

Die Auswertungen der Bilder zeigen klar den leberschädigenden Effekt einer Cholestase. Aufgrund des mangelnden Galleabflusses kommt es zum Rückstau von zelltoxischen Abbauprodukten. Mehrere Faktoren führen dann zum Zelluntergang. Eine Kombination aus bakteriellen Toxinen, radikalen Sauerstoffspezies, lokaler Entzündungsreaktion und osmotischem Stress lässt sich nur schwer bis gar nicht durch Reparaturmechanismen kompensieren (Meyer et al. 2020; Nakanishi und Saxena 2015; Blesl und Stadlbauer 2021).

In der Literatur ist eine entzündungshemmende Wirkung von Ghrelin beschrieben (Moreno et al. 2010; Imazu et al. 2011). Die entzündungshemmenden Effekte wirken allerdings nur einem Teilbereich der Ursachen für die Leberschädigung entgegen. Selbst wenn die Entzündungsreaktion komplett unterdrückt werden würde, wäre das Gewebe immer noch dem Stress von Toxinen, radikalen Sauerstoffspezies und osmotischem Druck ausgesetzt.

In diesem Versuchsaufbau war die Auswirkung der BDL so gravierend, dass Ghrelin-Effekte zumindest mit qualitativen histologischen Methoden nicht feststellbar waren. Für eine genauere Analyse wären hier eine Vermessung und quantitative Bewertung der Leberschäden nötig. Da der Fokus dieser Arbeit auf der Beeinträchtigung der Darmbarriere lag, wurde darauf jedoch verzichtet. Subtile Effekte des Ghrelins auf die BDL-induzierte Leberschädigung können somit nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Siriusrot-Färbungen

In den Präparaten der sham-Gruppe waren keine Anzeichen einer Fibrose erkennbar (Abbildung 3-6). Bei den Tieren der BDL-Gruppe wurde in allen Präparaten eine Zunahme des Bindegewebes festgestellt. Die Bindegewebsvermehrung ist um die Lebervenen herum am stärksten ausgeprägt. Diese Befunde sind typisch für eine beginnende Leberfibrose. Die Cholestase führt zum vermehrten Zelluntergang. Daraus folgt eine Ausschüttung lokaler Zytokine und Entzündungsmediatoren, die zur Differenzierung von Ito-Zellen zu Myofibroblasten führen. Diese bilden vermehrt extrazelluläre Matrix, welche in der Siriusrot-Färbung markiert wird (Bataller und Brenner 2005; Liedtke et al.

2013). Es konnten in der Vergangenheit, je nach pathophysiologischem Ursprung, unterschiedliche Fibrosierungsmuster identifiziert werden. So wird zwischen periportal und perizentraler Fibrose unterschieden (periportal= von der Pfortader aus; perizentral= von der Zentralvene aus). Chronische Hepatitis und chronische Cholestase sind mit periportaler Fibrose assoziiert, wohingegen bei alkoholisch bedingten Leberschäden eine perizentrale Fibrosierung beobachtet wurde (Bataller und Brenner 2005; Pinzani 1999). Eine genaue Erklärung konnte für diese Beobachtung noch nicht gefunden werden. Die Auswirkungen der akuten Cholestase im BDL-Modell lassen sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit als perizentrale Fibrose beschreiben.

4.3 Darm-Histologie

4.3.1 HE-Färbungen

Die Vermessung der Zotten im Duodenum zeigte, dass die Zotten der BDL-Gruppe im Mittel um ca. 100 µm länger waren, als die der sham-Gruppe (Abbildung 3-3). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,001$; t-Test). Die anschließende Untersuchung der Behandlungsgruppen (BDL/sham + LM/Ghrelin) ergab keine signifikanten Unterschiede, aber auch hier hatten die BDL-Gruppen im Mittel längere Zotten im Duodenum als die sham-Gruppen.

Die längeren Zotten im Duodenum der BDL-Tiere könnten eine Anpassungsreaktion auf die Cholestase sein. Mögliche Ursachen könnten eine Darmzellhyperplasie, -hypertrophie oder eine Kombination der beiden sein. Diese Form der Adaptation ist auch bei dem Kurzdarmsyndrom bekannt (Warner 2016). Dadurch ist aber noch nicht geklärt, warum eine Zottenverlängerung nur im Duodenum stattgefunden hat und welcher Reiz genau zur Proliferation geführt hat. Hier bieten sich Ansatzpunkte für Folgestudien.

Die *qualitative* Untersuchung des Darmgewebes zeigte in allen Darmabschnitten gruppen- und therapieunabhängig eine morphologisch weitgehend unauffällige Darmschleimhaut.

In keinem Darmabschnitt konnte ein signifikanter Unterschied in der Mukosahöhe zwischen der sham- und der BDL-Gruppe festgestellt werden.

4.3.2 Immunhistochemie-Färbungen

Im Duodenum und Ileum der Gruppen ohne Behandlung (sham und BDL) fanden sich in den Zotten regelmäßig mehrere CD3e-positive Zellen (Abbildung 3-11). Aus durchflusszytometrischen Untersuchungen ist bekannt, dass sich in allen Abschnitten des Darmtraktes CD3e-positive Zellen befinden (Cesta 2006). In den Gruppen mit Ghrelintherapie (sham + Ghr und BDL + Ghr) fanden sich CD3e-positiv gefärbte Zellen in *allen* untersuchten Darmabschnitten (Duodenum, Jejunum, Ileum, 58

Kolon). Ghrelin scheint einen Einfluss auf CD3e-exprimierende Zellen zu haben. Es wurde keine genaue Quantifizierung durchgeführt, aber es ist dennoch erkennbar, dass über die Gesamtstrecke des Darmes Tiere mit Ghrelintherapie mehr CD3e-positive Zellen aufwiesen, als solche ohne Therapie. Eine Unterscheidung, ob es zu einer Vermehrung oder lediglich zu einer Migration der Zellen in das Darmgewebe gekommen ist, war nicht möglich. CD3e wird überwiegend auf T-Zellen exprimiert. Es wurde berichtet, dass Ghrelin die Vermehrung von T-Helfer-Zellen 2 (Th2) und regulatorischen T-Zellen (Treg) fördert (Da Pereira et al. 2017; Dixit et al. 2007; Souza-Moreira et al. 2013). Es scheint daher möglich, dass Ghrelin zu einer Vermehrung von Th2 und Treg-Zellen im Darmgewebe geführt hat. Die funktionellen Konsequenzen dieser Ghrelinwirkung bedürfen weiterführender Untersuchungen.

CD11b-positive Zellen wurden regelmäßig in den Zotten aller untersuchten Dünndarmabschnitte gefunden. Untersuchungen des Darmtraktes von C57BL/6J Mäusen mittels Durchflusszytometrie beschreiben ein Vorkommen von CD11b-positiven Zellen in allen Darmabschnitten (Denning et al. 2011). Im Kolon der Tiere dieser Versuchsreihe wurden keine CD11b-positiven Zellen angefärbt (Abbildung 3-12). Eine genaue Erklärung für diese Abweichung in den Ergebnissen ließ sich im Rahmen der Arbeit nicht finden. Beim Vergleich der sham-Gruppen mit den jeweiligen BDL-Gruppen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden. Auch ein Effekt der Ghrelin-Behandlung konnte nicht festgestellt werden. CD11b findet sich auf vielen Zellen des unspezifischen Immunsystems, im Genaueren: Monozyten, Neutrophile, Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. In mehreren Studien wurde von bakterieller Translokation bei BDL-Tieren berichtet. Bakterielle Translokation bezeichnet das Durchwandern der Darmbarriere von Bakterien. Eine vermehrte Immunzellinfiltration des Gewebes als Reaktion auf die bakterielle Translokation wäre nicht verwunderlich gewesen und wurde auch bereits beobachtet (Abdeldayem et al. 2007; Blesl und Stadlbauer 2021). Möglicherweise sind Mausstamm-spezifische Besonderheiten für die Unterschiede zwischen den eigenen Befunden und der Literatur verantwortlich; ohne Folgestudien bleibt diese Überlegung allerdings hypothetisch.

4.4 Transmurale Widerstände

In dieser Arbeit wurden Messungen des transmuralen Widerstands für die Darmabschnitte Jejunum und Kolon durchgeführt. Dabei wurde zunächst der Einfluss einer BDL im Vergleich zu einer sham-Operation untersucht. Anschließend ging es um die Frage, ob durch die Gabe von Ghrelin der transmurale Widerstand nach einer BDL bzw. sham-Operation beeinflusst werden kann. Für die erste

Fragestellung war die Tierzahl pro Gruppe höher und die Zahl der Versuchsgruppen geringer als für den zweiten Teil (der Therapieserie). Das ist möglicherweise auch die Erklärung dafür, warum nur im ersten Abschnitt statistisch signifikante Ergebnisse erzielt wurden.

Einheitlich über die Versuchsserien hinweg lag der transmurale Widerstand im Jejunum etwas höher als im Kolon (Abbildung 3-7). In den Untersuchungen des ersten Teils (ohne therapeutische Intervention) zeigte sich für das Jejunum eine tendenzielle und für das Kolon sogar eine signifikante Verminderung des Widerstands durch eine BDL. Dieser Effekt war unter den Bedingungen der Therapieserie für die Lösungsmittel-behandelten Kontrollgruppen nicht nachweisbar (Abbildung 3-8). Hierfür gibt es, neben den veränderten Rahmenbedingungen der Versuche, weitere mögliche Gründe: Es wurde beschrieben, dass der Strom über dem Gewebe durch Restaktivität des Darms beeinflusst wird (Clarke 2009). Bei kleineren Gruppen im zweiten Teil der Arbeit könnten diese Effekte schwerer ins Gewicht gefallen sein. Auch konnten in diesem Teil der Arbeit manche Werte wegen defekter Messinstrumente nicht verwendet werden. Dadurch konnte für die Gruppe sham + LM nur eine Gruppengröße von n=3 erreicht werden.

Der transmurale Widerstand erlaubt einen Rückschluss auf die Durchlässigkeit des Darmepithels für Ionen. Dabei gilt, dass sowohl transzelluläre als auch parazelluläre Wege in den Gesamtstrom über dem Gewebe einfließen und so die TEER beeinflussen (Clarke 2009). Wie groß der jeweilige Anteil an dem Gesamtstrom ist, lässt sich in diesem Versuchsaufbau nicht nachweisen. Vorausgehende Studien haben allerdings berechnet, dass mindestens 85 % der Ionen parazellulär fließen (Clarke 2009; Frizzell und Schultz 1972). Insgesamt sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Daten dafür, dass eine BDL den Fluss für Ionen im Kolon und potenziell auch im Jejunum erhöht.

Im Vergleich der Therapiegruppen untereinander hatte fast jede Gruppe mit Ghrelintherapie einen höheren mittleren Widerstand als die korrespondierende Gruppe mit LM-Therapie (Jejunum: sham + LM << sham + Ghr; Kolon: BDL + LM < BDL + Ghr; sham + LM << sham + Ghr). So lässt sich vermuten, dass Ghrelin die Durchlässigkeit für Ionen verringert. Eine statistische Absicherung dieser Hypothese erfordert jedoch noch Folgeversuche.

4.5 FITC-Dextran-Assay

Mit dem FITC-Dextran-Assay wurde die parazelluläre Durchlässigkeit der Darmwände untersucht. Dafür wurde 4 kDa großes, mit FITC markiertes Dextran verwendet. Für FITC-Dextran gibt es im Darmgewebe der Mäuse keine Transporter, daher muss es parazellulär auf die basale Seite der Darmwand gelangen (Aguanno et al. 2021). Es werden 3 parazelluläre Wege in der Literatur diskutiert: Der *pore pathway*, der *leak pathway* und der *unrestricted pathway* (eng.: pore = 60

Pore/Kanal; *leaky* = undicht; *unrestricted* = uneingeschränkt; *pathway* = Weg/Pfad) (Anderson und van Itallie 2009; Monaco et al. 2021). Der *pore pathway* ist teilweise selektiv und erlaubt den Durchtritt von bis zu 2 kDa großen Molekülen und soll bis zu 4 Å groß sein (Anderson und van Itallie 2009; Knipp et al. 1997). Der *leak pathway* lässt Moleküle größer als 2 kDa passieren, allerdings in niedrigerer Kapazität als der *pore pathway*. Er soll bis zu 125 Å groß sein (France und Turner 2017). Der *unrestricted pathway* ist mit Zellschäden und Apoptose assoziiert. Durch ihn gelangen größere Proteine, Viren und Bakterien durch die Darmbarriere (Monaco et al. 2021).

Wegen seiner Größe von 4 kDa kann das FITC-Dextran keine kanalikulären TJs durchqueren und ist somit auf den *leak pathway* oder *unrestricted pathway* angewiesen. Hohe Fluoreszenzwerte sind in diesem Versuchsaufbau daher in Schlussfolgerung mit einer hohen parazellulären Durchlässigkeit des jeweiligen Gewebes gleichzusetzen, die aus einer Kapazitätssteigerung *des leak pathways* oder *des unrestricted pathways* resultieren. Die relative Fluoreszenz lag sowohl im Jejunum als auch im Kolon für die BDL-Gruppen signifikant höher als für die sham-Gruppen (Abbildung 3-9). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass eine BDL zu einer höheren Durchlässigkeit der Darmwand führt. Ob die höhere Durchlässigkeit mehr von dem *leak pathway* oder dem *unrestricted pathway* bestimmt wird, bleibt offen. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Ergebnissen von Norman et al. verbinden, die in einer klinischen Studie bei Patienten mit Leberzirrhose eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit der Darmwand zeigen (Norman et al. 2012). Für BDL und sham wurde zum Endpunkt nach drei Stunden eine höhere Fluoreszenz im Kolon als im Jejunum gemessen. Dieser Unterschied war für die sham Gruppe signifikant und weist ein ähnliches Muster wie die Widerstandsmessungen auf. Ein erheblich größerer *leak pathway* oder *unrestricted pathway* gehen mit einem niedrigeren Widerstand einher (Kapitel 3.4.1). Das Kolon der sham- und BDL-Tiere hat niedrige Widerstände und hohe Durchlässigkeit im FITC-Dextran Assay. Das Jejunum dieser Gruppen zeigt höhere mittlere Widerstände und niedrigere parazelluläre Durchlässigkeit (Abbildung 3-7). Eine lineare Korrelation zwischen Widerstand und Durchlässigkeit darf allerdings nicht angenommen werden. Die TEER ist von zu vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig (*pore pathway*, *leak pathway*, transzellulärer *pathway*, Zellaktivität, Zellschäden (Monaco et al. 2021)). Daher sollte man sich bei der Bestimmung der Durchlässigkeit nicht allein auf den TEER verlassen. Die Messwerte zu den Jejuna der Therapiegruppen wurden verworfen. Es werden mehrere Störfaktoren auf die Ergebnisse eines Ussing-Kammer-Versuches in der Literatur diskutiert (Clarke 2009; Aguanno et al. 2021). Alle bekannten Faktoren wurden im Versuchsaufbau zuvor bedacht und in sorgfältiger Arbeit soweit wie möglich eliminiert. Dennoch traten zu viele Ausreißer auf, als dass

eine sinnvolle Auswertung möglich war. Anzunehmen sind messtechnische Fehler, die allerdings nicht ursächlich abgeklärt werden konnten.

Im Kolon der Therapiegruppen hob sich die Gruppe BDL + LM von den anderen Gruppen ab, während die Gruppe BDL + Ghr einen ähnlichen Verlauf zeigte wie die Gruppen sham + LM und sham + Ghr (Abbildung 3-10). Es bestand kein signifikanter Unterschied. Dennoch lässt sich insgesamt ein Trend erkennen, wonach Ghrelin die Durchlässigkeit des Gewebes senkt. Die fehlende Signifikanz zwischen BDL + LM und sham + LM im Vergleich zu BDL und sham im vorherigen Teil könnte durch ein unterschiedliches Ausmaß der Darmbarriereschädigung durch BDL zu erklären sein. Außerdem ist die geringere Gruppenstärke zu erwähnen. Der Versuchsaufbau erlaubt keinen Rückschluss darauf, ob Ghrelin mehr Wirkung auf den *leak pathway* oder den *unrestricted pathway* ausübt.

4.6 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse sollte einen möglichen Zusammenhang zwischen der Durchlässigkeit des Darms und einer vermehrten bzw. verminderten TJ-Protein-Expression aufzeigen. Als obligater Bestandteil der TJs haben die Claudine erheblichen Einfluss auf die parazelluläre Stabilität der Darmbarriere (Alexandre et al. 2005; van Itallie et al. 2003; van Itallie et al. 2001). Zusätzlich sollte hier eine darmbarrierestärkende Wirkung von Ghrelin ergründet werden.

4.6.1 Genexpressionsanalyse im Jejunum

Für die Gene *Occludin*, *ZO-1*, *Claudin 2* und *Claudin 7* ließen sich im Jejunum keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den vier Versuchs-Gruppen feststellen (Abbildung 3-13). Eine Beeinflussung durch Ghrelin oder BDL war nicht nachweisbar.

Die Untersuchungen zu *Claudin 4* und *15* erbrachten jeweils genau einen signifikanten Unterschied. *Claudin 4* ist in *in-vitro*-Versuchen in *Monolayern* bei erhöhter Expression mit einer höheren Dichtigkeit assoziiert (van Itallie et al. 2001). *Claudin 15* steigert parazellulär in *Monolayern* die Durchlässigkeit für Cl⁻-Ionen und senkt sie für Na⁺-Ionen. Insgesamt führt eine höhere Expression dieses Claudins zu höherer Dichtigkeit des Epithels (van Itallie et al. 2003). Eine Steigerung der Expression von *Claudin 4* und *15* im Jejunum könnte in einer höheren parazellulären Dichtigkeit resultieren. Da wie in Kapitel 4.5 bereits erwähnt keine verlässlichen Daten für das Jejunum von Gruppen mit Therapie im FITC-Dextran-Assay erhoben werden konnten, war kein Zusammenhang darstellbar. Zudem lag der signifikante Unterschied in der Genexpression zwischen Gruppen, die sich in mehr als einem Parameter voneinander unterschieden und somit biologisch nicht sinnvoll miteinander vergleichbar sind (*Claudin 4*: BDL + LM << sham + Ghr; *Claudin 15*:

BDL + Ghr << sham + LM). Insgesamt erbrachten die Genexpressionsanalysen am Jejunum somit weder einen klaren Beleg für Effekte der BDL, noch für einen Einfluss des Ghrelins. Generell kann von einer möglichen Beeinflussung der TJ-Proteinexpression durch äußere Einflüsse ausgegangen werden, wie sie unter anderem von Reiner et al. für den Einsatz von Teduglutid beschrieben wurde (Reiner et al. 2020).

4.6.2 Genexpressionsanalyse im Kolon

Für *Claudin 2*, *7* und *15* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Kolon beobachtet. Für die Gene *Occludin*, *ZO-1* und *Claudin 4* zeigte sich eine signifikante Expressionssteigerungen in der Gruppe BDL + Ghr im Vergleich zur Gruppe BDL + LM (Abbildung 3-14). In der Gruppe sham + Ghr wurden ähnliche Tendenzen, aber keine statistisch signifikanten Effekte des Ghrelins gegenüber der Gruppe sham + LM beobachtet.

Ghrelin hat somit im Kolon nach einer BDL eine expressionssteigernde Wirkung auf die Gene *Occludin*, *ZO-1* und *Claudin 4*, während der Effekt bei sham operierten Mäusen unsicher bleibt. Dies könnte an einer gleichzeitigen expressionsmindernden Wirkung der BDL liegen, die allerdings nur tendenziell und nur für *Occludin*, *ZO-1* und *Claudin 4* nachweisbar war. Die geringere Expression in der Gruppe BDL + LM dieser TJ-Proteine könnte einen Einfluss auf die geringere Dichtigkeit der Kolon Darmwand im FITC-Dextran-Assay haben. Für *Claudin 4* und für *Occludin* wurde *in-vitro* bei gesteigerter Expression eine erhöhte Dichtigkeit in *Monolayer* Epithelien nachgewiesen (van Itallie et al. 2003; Krause et al. 2008). *ZO-1* hat in TJs eine Gerüstfunktion (Umeda et al. 2006). Ein Zusammenhang zwischen Dichtigkeit bzw. Stabilität der TJs und Expression dieser drei TJ-Proteine *in-vivo* ist möglich. Ein sicherer Nachweis bietet in dieser Arbeit nicht, da im FITC-Dextran-Assay keine signifikanten Unterschiede in der Durchlässigkeit zwischen den Gruppen BDL + LM und BDL + Ghr vorliegen.

Eine Wirkung von Ghrelin auf die Genexpression von *Occludin*, *ZO-1* und *Claudin 4* kann angenommen werden, aber nicht sicher bestätigt werden, da keine Signifikanz zwischen den Kontrollgruppen sham + LM und sham + Ghr besteht.

4.7 Blutanalyse

4.7.1 Elektrolyte

Bei der BDL-Gruppe wurde signifikant höhere Konzentrationen gegenüber der sham-Gruppe von fast allen untersuchten Elektrolyten gemessen (Kalium, Kalzium, Magnesium, Phosphat; $p < 0,05$; t-Test) (Tabelle 3-1). Die Konzentration von Natrium unterschied sich zwischen den Gruppen nicht.

Kalium und Kalzium lagen bei den BDL Tieren über den Werten üblicher Plasmakonzentrationen für C57BL/6-Mäuse (Zur 2005). Kalium ist ein Marker für Zelluntergang (Arastéh et al. 2018). Am ehesten ist das Kalium mit den extensiven Lebernekrosen in Verbindung zu bringen, die auch in der Histologie nachgewiesen wurden (Kapitel 4.2). Andere Quellen für erhöhtes Kalium, wie zum Beispiel eine verminderte Elimination durch geschädigte Nieren, sind nicht auszuschließen.

Der hohe Kalziumwert könnte durch eine vermehrte Aufnahme bei einer geschädigten Darmbarriere zustande kommen. Auch möglich ist eine erhöhte Osteoklastenaktivität bei Immobilisation (Klinke und Silbernagl 2003). Die BDL-Mäuse waren meist eher träge und weniger aktiv. Es gibt keine genauen Messwerte zu der Aktivität der Tiere. Daher bleibt diese Erklärung spekulativ.

Eine Ghrelin-Therapie hatte nahezu keinen Einfluss auf die Elektrolytkonzentrationen (Tabelle 3-2). In der BDL-Gruppe ohne Ghrelingabe war das Kalzium geringfügig, aber signifikant höher als in der sham-Gruppe mit Ghrelintherapie ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis-Test). Da es sich um zwei Gruppen handelt, die sich sowohl durch Therapie als auch Operation unterscheiden, ist dieser Vergleich jedoch biologisch irrelevant.

Kalium lag für alle Gruppen der Therapieserie im Bereich üblicher Konzentrationen für C57BL/6J Mäuse (Tabelle 3-2) (Otto et al. 2016). Das galt auch für die Mäuse, die eine BDL und ansonsten nur Lösungsmittel erhalten hatten und somit den Mäusen am nächsten kamen, die nach BDL ohne Therapie erhöhte Kaliumwerte aufgewiesen hatten. Die Hintergründe dieser Diskrepanz sind unklar. Eine Rolle könnte jedoch die geringere Tierzahl in der Therapieserie spielen (BDL $n=15$; BDL + LM $n=8$).

4.7.2 Enzyme und Proteine

Die BDL-Gruppe zeigt bei den Enzymen ASAT, ALAT, AP, Pseudo-Cholinesterase, α -Amylase und Lipase am Entnahmetag signifikant erhöhte Werte gegenüber der sham-Gruppe (Tabelle 3-3).

Die hohen Leberwerte (ASAT, ALAT, AP, Pseudo-Cholinesterase) sind auf die Leberzellschäden zurückzuführen. Die erhöhten Werte von α -Amylase und Lipase können als Hinweise auf eine mögliche Schädigung des Pankreas interpretiert werden. Weiterführende Untersuchungen hierzu lagen außerhalb der Zielstellung dieser Promotionsarbeit, werden aber innerhalb der Arbeitsgruppe fortgeführt.

Die Enzymaktivität (Tabelle 3-4) der BDL-Gruppen, die Injektionen erhielten (BDL + LM, BDL + Ghr), lag deutlich über dem Durchschnitt der gesunden Tiere ohne Manipulationen (Otto et al. 2016). Auch hier ist von einer Leber- und Pankreasschädigung auszugehen. Eine Berechnung des De-Ritis-Quotienten (ASAT/ALAT) erlaubt einen Rückschluss auf das Ausmaß der Leberschäden (Ritis et al.

1957). Werte größer 1 lassen auf erhebliche Leberzellschäden schließen, während Werte kleiner 1 für einen geringfügigen Leberschaden sprechen. Die De-Ritis-Quotienten aller BDL-Gruppen liegen deutlich über 1 (BDL: 2,06; BDL + LM: 1,53; BDL + Ghr: 1,61). Der hohe Quotient der BDL Gruppe ohne Injektionstherapie ist mit den hohen Kaliumwerten vereinbar und spricht für umfangreichen Zelluntergang in dieser Gruppe. Die sham Tiere zeigten Enzymaktivitäten die denen gesunder Tiere gleichen (Zur 2005). Ein Ghrelineffekt war nicht nachweisbar.

4.7.3 Lipide

Cholesterol war bei allen BDL-Gruppen stark erhöht (Tabelle 3-5; Tabelle 3-6) und lag weit über den üblichen Konzentrationen gesunder Tiere (Zur 2005). Die Triglyceride wiesen keine Auffälligkeiten auf und waren mit den Werten gesunder C57BL/6J-Mäuse vergleichbar (Otto et al. 2016). Cholesterol wird üblicherweise über die Galle eliminiert. Da bei den Mäusen eine Galleausfuhr nur in sehr geringem Maße über die Niere möglich war, ist ein starker Anstieg des Cholesterols nicht verwunderlich. Ein Ghrelineffekt war auch bei diesen Parametern nicht nachweisbar.

4.7.4 Metabolite

Die Plasmakonzentrationen für alle Bilirubin-Werte in den BDL-Gruppen (BDL, BDL + LM, BDL + Ghr (Tabelle 3-7; Tabelle 3-8)) waren um mehr als das Hundertfache höher als in den sham-Gruppen (sham, sham + LM, sham + Ghr). Fehlende Signifikanzen bei diesem Unterschied sind auf die kleinen Gruppengrößen der Therapiegruppen zurückzuführen sowie scharf angesetzte Mehrtestkorrekturen bei Vergleichen von vier Gruppen. Nichtsdestoweniger liegen alle Bilirubinwerte der BDL-Gruppen deutlich über den Konzentrationen gesunder Tiere aus der Literatur ohne Manipulation (Zur 2005). Ein Anstieg der Bilirubin-Werte war bei Gallengangsligatur erwartbar. Auch ist es nachvollziehbar, dass eine Ghrelintherapie diese Auswirkungen der BDL kaum beeinflussen kann. Der Abfluss des konjugierten Bilirubins ist blockiert. Ein gleichmäßig hoher Anstieg des direkten und indirekten Bilirubins sprechen für eine ausgeprägte Leberschädigung. Die Stoffwechselfunktion der Leber reicht nicht mehr aus um alles Bilirubin zu konjugieren.

Die Glucose-Spiegel waren für alle BDL-Gruppen (BDL, BDL + LM, BDL + Ghr (Tabelle 3-7; Tabelle 3-8)) in etwa halb so hoch wie für die sham-Gruppen. Die stark unterschiedlichen Werte der gesunden und kranken Tiere lassen auf unterschiedliche Stoffwechsellagen schließen. Geringere Nahrungsaufnahme bei allgemein schlechterem Zustand vor den Endpunktanalysen könnte eine Erklärung sein. Auch eine eingeschränkte Gluconeogenese bei reduzierter Leberfunktion könnte eine Ursache sein.

4.8 Integrative Betrachtungen

4.8.1 Auswirkungen der BDL

Der erste Teil der Arbeit befasste sich deskriptiv mit den Auswirkungen einer BDL auf die Leber und die Darmbarriere. Die Gallengangsligatur führte zu einem Anstieg von Gallensäuren und Cholesterol (Kapitel: 3.8.3, 3.8.4). Beide Stoffe werden im gesunden Tier über die Galle sezerniert. Ein Anstieg war bei Unterbindung des Galleabflusses zu erwarten. Die Auswirkungen der BDL waren besonders gravierend für die Lebern der Versuchstiere. Sowohl die histologischen als auch die laborchemischen Untersuchungen zeigten strukturelle und funktionelle Leberschäden. In den HE-Färbungen konnten Lebernekrosen nachgewiesen werden (Abbildung 3-2) und in der Siriusrotfärbung ließ sich eine Fibrose diagnostizieren (Abbildung 3-6). Hohe AP-Aktivität und gesamt-Bilirubin-Werte, hundertfach über dem Durchschnitt gesunder Tiere, spiegelten den Gallestau wider (Tabelle 3-3, Tabelle 3-7).

Die ASAT- und ALAT-Aktivität aller BDL Gruppen lagen um zwei Zehnerpotenzen oberhalb üblicher Werte gesunder Tiere (Kapitel: 3.8.2) (Otto et al. 2016; Zur 2005). Ein De-Ritis-Quotient von $> 1,5$ ist ein weiterer Indikator für erheblichen Leberzelluntergang. Eine Erhöhung der Kaliumkonzentration im Blutplasma ist überwiegend mit den Leberzellnekrosen in Verbindung zu setzen (Kapitel: 3.8.1). Zusätzlicher Zelluntergang anderer Organe, der zu hohen Kaliumwerten beigesteuert hat, lässt sich nicht ausschließen. So wurden erhöhte Pankreasenzymwerte gemessen, die für eine Läsion dieses Organs sprechen (Kapitel: 3.8.2). Insgesamt führte die Belastung durch die BDL zu erheblichen Gewichtsverlusten (Kapitel: 3.1). Unter Gesamtbetrachtung der leberrelevanten Befunde lässt sich sagen: Das BDL-Modell eignet sich grundsätzlich zur Untersuchung von chronischen Leberschädigungen. Es ist allerdings ein schweres Schädigungsmodell, das in Abhängigkeit von der Fragestellung durch andere experimentelle Modelle ergänzt werden sollte.

Im Duodenum der BDL-Tiere kam es zu einem signifikanten Längenwachstum der Villi (Abbildung 3-4). Dieses Ergebnis hat Neuigkeitswert. Im Zusammenhang mit der BDL wird der Effekt als eine Adaptationsreaktion des Körpers auf den Stress der Cholestase gewertet, in Anlehnung an die Adaptationsmechanismen bei Kurzdarmsyndrom (Warner 2016; Reiner et al. 2020). Weiterführende Untersuchungen zu den zugrunde liegenden Mechanismen bieten sich an.

Mithilfe des Ussing-Kammer-Versuches wurde eine parazelluläre Permeabilitätserhöhung der Darmbarriere in Jejunum und Kolon nach Gallengangsligatur nachgewiesen (Abbildung 3-9). Die Beobachtung steht im Einklang mit der Beschreibung von Permeabilitätserhöhungen bei Patienten mit Leberzirrhose und mit der vermehrten bakteriellen Translokation in BDL-Mäusen (Abdeldayem et al. 2007; Blesl und Stadlbauer 2021; Norman et al. 2012; Fukui und Wiest 2016). Durch die Größe des verwendeten Markers ist der Rückschluss möglich, dass es sich um eine Kapazitätserhöhung des

leak pathways und/oder des *unrestricted pathways* handelt (Aguanno et al. 2021; Anderson und van Itallie 2009; Monaco et al. 2021). Die erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit könnte im Zusammenhang mit niedrigeren Widerständen in den Darmabschnitten stehen (Abbildung 3-7). Da die TEER aber von mehr als nur der parazellulären Durchlässigkeit allein abhängig ist, darf keine lineare Korrelation angenommen werden (Monaco et al. 2021).

Ein Zusammenhang zwischen erhöhter parazellulärer Durchlässigkeit und veränderter Expression der *Claudine 4* und *15* im Jejunum sowie *Claudin 4*, *Occludin* und *ZO-1* im Kolon ist möglich, wird aber durch die Ergebnisse dieser Arbeit noch nicht hinreichend belegt (Abbildung 3-13; Abbildung 3-14). Die mittlere Genexpression der LM-Gruppen lässt für keines dieser Proteine eine signifikante Differenz erkennen.

Die Auswirkungen einer BDL summieren sich in dieser Arbeit zu erheblichen Leberschäden, einer herabgesetzten TEER im Kolon und einer erhöhten parazellulären Durchlässigkeit in Jejunum und Kolon. In anderen Studien wurde dargelegt, dass die erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit erheblich zum schweren Krankheitsverlauf von Leberzirrhose und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beiträgt (Blesl und Stadlbauer 2021; Mankertz und Schulzke 2007). Eine Therapie zur Stärkung der Darmbarriere könnte die Behandlung dieser Erkrankungen möglicherweise voranbringen.

4.8.2 Wirkung von Ghrelin

In dem zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Ghrelin auf sham- und BDL-operierte Tiere untersucht. Vorausgegangene Studien suggerierten einen darmbarrierestärkenden Effekt von Ghrelin und qualifizierten den Stoff somit als möglichen Therapieansatz bei Darmbarrierestörung (Wu et al. 2009; Das 2011).

Ähnlich wie im ersten Teil der Arbeit wurden auch hier Befunde erhoben, die eine starke Leberschädigung durch die BDL aufzeigten (Kapitel: 3.8.2, 3.8.4). Ein De-Ritis-Quotient von $>1,5$ sprach für einen erheblichen Zelluntergang in der Leber. Die Gewichtsverläufe wiesen auf einen schweren Krankheitsverlauf hin, den Ghrelin nicht abmindern konnte. Ein hepatoprotektiver Effekt des Ghrelins war somit nicht nachweisbar.

Entgegen der beschriebenen orexigenen Wirkung von Ghrelin in der Literatur konnte keine Gewichtszunahme der Tiere unter Ghrelintherapie vermerkt werden (Tschöp et al. 2000; Asakawa et al. 2001). Diese Wirkung ging entweder verloren oder reichte nicht aus, um den Gewichtsverlust bei Mäusen mit schwerer Leberschädigung abzuschwächen. Eine Quantifizierung der

Nahrungsaufnahme war nicht möglich, weshalb dazu keine näheren Aussagen getroffen werden können.

Als Wirkung von Ghrelin wurde in allen Darmabschnitten ein vermehrtes Auftreten von CD3e-positiven Zellen festgestellt. Eine mögliche Erklärung dafür findet sich in der Literatur (Dixit et al. 2007; Souza-Moreira et al. 2013). Dixit stellte unter Ghrelintherapie ein stärkeres Wachstum des Thymus von Mäusen fest und die Vermehrung von T-Zellen im Körper von Mäusen. Souza-Moreira und Kollegen konnten feststellen, dass es sich bei diesen Zellen um regulatorische T-Zellen (Treg) handelt. Diese exprimieren CD3e an der Oberfläche. Treg-Zellen hemmen die Aktivierung des Immunsystems. Die Vermehrung von Treg-Zellen ist vermutlich Teil der entzündungshemmenden Wirkung von Ghrelin, wie sie in anderen Studien beschrieben wurde (Baatar et al. 2011; Da Pereira et al. 2017; Gonzalez-Rey et al. 2006). Die Expression Treg-typischer Marker wie FoxP3 und CD25 wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht und sollte im Rahmen von Folgestudien erfolgen. Ghrelin scheint einen Einfluss auf die Permeabilität im Kolon zu haben (Abbildung 3-10). Der Effekt war nicht signifikant, da sich die Kontroll-Gruppe BDL + LM nicht stark genug von den übrigen Gruppen abhob. Dennoch glichen die Werte der Gruppe sham + LM und BDL + Ghr einander innerhalb des SEM. Dies suggeriert, dass sich die Permeabilität des Kolons von BDL-Mäusen unter Ghrelintherapie ähnlich verhält wie die von gesunden sham-Mäusen.

Eine Steigerung der Expression von *Claudin 4* und eine Verminderung der Expression von *Claudin 15* durch Ghrelin im Jejunum scheint wahrscheinlich. Allerdings lässt sich dies nicht sicher belegen, da die Signifikanzen zwischen Gruppen auftraten, die sich auch durch ihr Operationsverfahren unterschieden (Abbildung 3-13). Eine Beeinflussung der Expression durch die Operation könnte somit ebenfalls möglich sein.

Im Kolon erhöhte sich unter Ghrelintherapie die Expression von *Claudin 4*, *Occludin* und *ZO-1* in Tieren mit BDL signifikant gegenüber der Gruppe BDL + LM (Abbildung 3-14). In der Gruppe sham + Ghr stieg die Expression dieser TJ-Proteine ebenfalls, aber nicht signifikant gegenüber der Gruppe sham + LM. Der Effekt des Ghrelins war somit vom zeitgleichen Vorliegen einer Läsion der Darmbarriere (hier konkret durch BDL) abhängig. TJ-Proteine sind die Bausteine der parazellulären Verbindungen in Epithelien und bestimmen deren Dichtigkeit (González-Mariscal et al. 2003; Schneeberger und Lynch 2004). Es liegt nahe, dass eine geänderte Expression der TJ-Proteine mit der Dichtigkeit der Darmbarriere zusammenhängen könnte. Zu ähnlichen Schlüssen sind Cheng et al. auch gekommen: Sie stellten bei C57BL/6J-Mäusen mit experimentell induzierter Colitis unter Ghrelintherapie eine erhöhte Expression von Occludin und ZO-1 fest (Cheng et al. 2015). In denselben Tieren fanden sie eine höhere TEER. Dies erklärten sie mit einer dichteren Darmbarriere.

Die vermehrte Expression der TJ-Proteine *Claudin 4*, *Occludin* und *ZO-1* könnte für die gemessene höhere Dichtigkeit im Kolon im FITC-Dex-Assay verantwortlich sein (Abbildung 3-10, Abbildung 3-14). Die dokumentierten Wirkungen von Ghrelin in dieser Arbeit sind eine Vermehrung von CD3e-positiven Zellen im Darmgewebe, eine Tendenz zur Erhöhung der Dichtigkeit im Kolon und eine Beeinflussung der Expression von *Claudin 4*, *Claudin 15*, *Occludin* und *ZO-1* im Darmgewebe. Weitere Arbeiten sind nötig, um die Wirkung von Ghrelin auf TJ-Proteine und Darmbarriere zu verifizieren. Motiviert wird die weitere Erforschung des Hormons Ghrelin durch den potenziellen klinischen Nutzen eines effektiven Therapeutikums zur Stärkung der Darmbarriere.

5 Zusammenfassung

Die Integrität der Darmbarriere ist essenziell für den Schutz vor Pathogenen und wichtig für die effektive Resorption von Nährstoffen. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass eine Leberzirrhose eine Schädigung der Darmbarriere nach sich zieht. Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Schädigung der Darmbarriere unter Einfluss einer chronischen Leberschädigung zu quantifizieren und auf molekularer Ebene zu analysieren.

Hierzu wurden zunächst die Auswirkungen einer Gallengangsligatur (BDL) auf die Darmbarriere von C57BL/6J-Mäusen untersucht. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde Ghrelin als mögliche Therapie evaluiert. Dazu wurden der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) und die parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon der Mäuse mittels FITC-Dextran-Assay in der Ussing-Kammer bestimmt. Weitere Veränderungen von Darm- und Lebergewebe wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht. Genexpressionsanalysen gaben Aufschluss über die veränderte Expression von TJ-Proteinen. Klinisch-chemische Untersuchungen an Blutplasma vervollständigten das Untersuchungsprogramm.

Die BDL-Mäuse erlitten einen Gewichtsverlust von 20 % gegenüber ihrem Startgewicht.

In den mikroskopischen Untersuchungen der Lebern von BDL-Tieren fanden sich großflächige Zellnekrosen und Fibrosierungen. Die Laborwerte bestätigten mit hundertfach höherer ASAT und ALAT sowie einem De-Ritis-Quotienten von >1,5 einen Leberzelluntergang. Zusammen mit erhöhten Gallestauparametern (Bilirubin, Alkalische Phosphatase) fanden sich diese Werte in allen Mäusen mit BDL. Die Validität des BDL-Modells für die Untersuchung einer chronischen Leberschädigung wurde bestätigt.

Die Ergebnisse des FITC-Dextran-Assays zeigten eine signifikant gesteigerte parazelluläre Durchlässigkeit bei BDL-Mäusen in Kolon und Jejunum. Ghrelin verminderte in der Tendenz die

Durchlässigkeit für das Kolon. Der TEER war bei BDL-Mäusen im Kolon signifikant geringer, was mit der erhöhten Durchlässigkeit zusammenhängen könnte.

Immunhistochemische Färbungen Ghrelin-therapierter Mäuse zeigten vermehrt CD3e-positive Zellen im Darmgewebe. Laut Literatur handelt es sich dabei wahrscheinlich überwiegend um regulatorische T-Zellen.

Bei BDL-Mäusen wurden signifikant längere Villi im Duodenum gemessen. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine ähnliche Anpassungsreaktion wie beim Kurzdarmsyndrom. Es bedarf jedoch näherer Untersuchungen zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen (Abbildung 5-1 A).

Ghrelin hatte keinen Einfluss auf die starke Gewichtsreduzierung der Mäuse mit BDL.

In der Genexpressionsanalyse fand sich unter Ghrelintherapie eine Tendenz zur verminderten Expression von *Claudin 15* und vermehrten Expression von *Claudin 4* im Jejunum. Die Signifikanzen lagen allerdings zwischen Gruppen, die sich auch durch das Operationsverfahren unterschieden, dadurch war dieser Effekt Ghrelin allein nicht zuschreibbar.

Im Kolon von BDL-Mäusen führte eine Ghrelintherapie zu signifikant höherer Expression von *Claudin 4*, *Occludin* und *ZO-1* (Abbildung 5-1 B).

Abschließend lässt sich vermerken, dass schwere Lebererkrankungen die Integrität der Darmbarriere erheblich reduzieren. Die Effekte des Ghrelins beschränkten sich auf Einzelparameter der Darmbarrierefunktion und waren insgesamt zu schwach ausgeprägt, als dass sich daraus bereits ein therapeutischer Nutzen ableiten ließe. Überprüft werden sollte, ob die protektiven Effekte des Ghrelins bei einem weniger schweren Schädigungsmodell vielleicht deutlicher ausfallen.

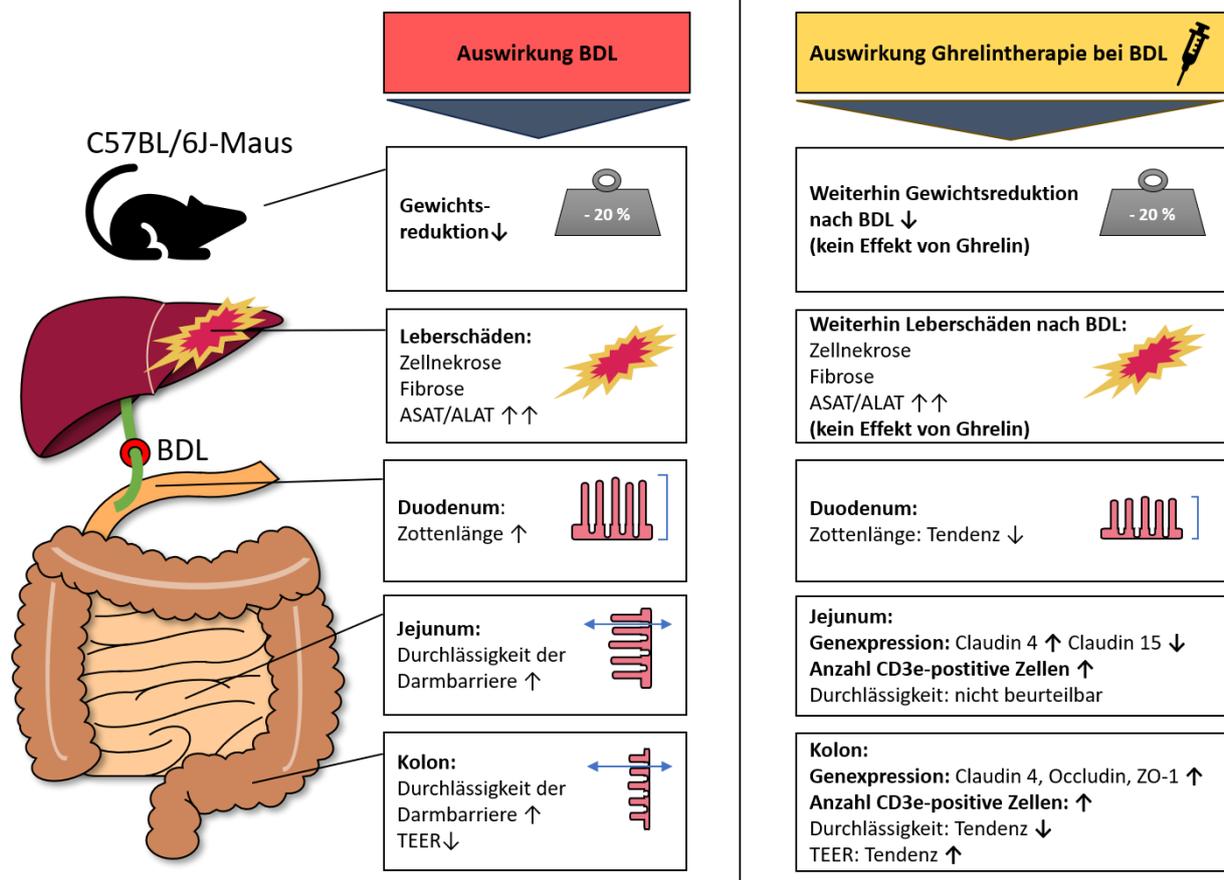


Abbildung 5-1 – Auswirkungen von BDL und Ghrelintherapie: C57BL/6J-Tiere erhielten entweder eine Gallengangligatur (BDL) oder eine sham-Operation (sham). Danach wurden sie entweder mit 0,1 µg/µl Ghrelin (Ghr) in 0,9 % NaCl-Lösung, oder reiner 0,9 % NaCl-Lösung (LM) für die Dauer des Versuches täglich mit einem Volumen von 0,2 µl/g KG injiziert. Jeweils eine BDL und eine sham Gruppe erhielten keine Injektionen, resultierend in sechs verschiedene Gruppen. Nach maximal 14 Tagen (siehe Kapitel 2.1.5) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Organe entnommen. (A) Tiere mit BDL erfuhren eine Gewichtsreduktion von 20 % gegenüber ihrem Startgewicht. In der Leber konnte anhand einer hundertfachen Erhöhung von ASAT und ALAT ein Leberzellschaden diagnostiziert werden. In stichprobenartigen HE-Färbungen von Leberpräparaten zeigten sich Leberzellnekrosen. Durch eine Siriusrotfärbung konnte eine Leberfibrose bei BDL-Tieren nachgewiesen werden. Messungen an Darmpräparaten nach HE-Färbungen zeigten signifikant längere Zotten im Duodenum der Gruppe BDL gegenüber der Gruppe sham ($p=0,001$; t-Test). Im Ussing-Kammer-Versuch wurde mittels des FITC-Dextran-Assays eine signifikant erhöhte Durchlässigkeit der Darmwand von Jejunum ($p<0,05$; t-Test) und Kolon ($p<0,05$; Mann-Whitney-U-Test) der BDL-Tiere festgestellt. Das Kolon der BDL-Tiere wies einen niedrigeren transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER) gegenüber den Proben der sham-Tiere auf ($p<0,05$; t-Test). (B) Eine Ghrelintherapie bei BDL-Tieren hatte keinen Effekt auf die Gewichtsreduktion und die Leberschäden. Die Zotten im Duodenum der Gruppe BDL + Ghr waren kürzer als die der Gruppe BDL + LM (nicht signifikant). Ghrelin führte im Jejunum zu einer signifikant höheren Expression von Claudin 4 ($p<0,05$; ANOVA) und einer geringen Expression von Claudin 15 ($p<0,05$; ANOVA). Im Kolon führte die Ghrelintherapie zu einer signifikant höheren Expression von Claudin 4 ($p<0,01$; Kruskal-Wallis-Test), Occludin und ZO-1 ($p<0,01$; ANOVA). Im FITC-Dextran-Assay zeichnete sich für das Kolon der BDL-Tiere unter Ghrelintherapie die Tendenz einer geringeren Durchlässigkeit ab (nicht signifikant). In allen Darmabschnitten konnte stichprobenartig nach Ghrelintherapie eine Vermehrung von CD3e-positiven Zellen nachgewiesen werden.

6 Thesen

1. Das BDL-Mausmodell (*bile duct ligation*) ist ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Auswirkungen einer schweren chronischen Leberschädigung, zum Studium pathophysiologischer Hintergründe und zur Erforschung möglicher therapeutischer Ansätze.
2. Die BDL führt bei C57BL/6J-Mäusen zu histologisch nachweisbarer Fibrosierung und Leberzellnekrosen. Laborchemisch ließ sich die Schwere der Leberzellschäden durch einen De-Ritis-Quotienten >1 nachweisen.
3. Ghrelin hat im Modell der C57BL/6J-Maus nach einer BDL keine hepatoprotektive Wirkung.
4. Die BDL erhöht die parazelluläre Durchlässigkeit der Darmbarriere durch Steigerung der Kapazität des *leak pathways* und/oder des *unrestricted pathways* in Jejunum und Kolon von C57BL/6J-Mäusen, resultierend in signifikant höheren Fluoreszenzwerten im FITC-Dextran-Assay.
5. Die Kapazität des *leak pathways* und/oder des *unrestricted pathways* von gesunden C57BL/6J-Mäusen ist im Kolon tendenziell höher als im Jejunum.
6. Die BDL führt im Duodenum von C57BL/6J-Mäusen zu Hypertrophie und/oder Hyperplasie, resultierend in einer histologisch nachweisbaren signifikanten Verlängerung der Villi.
7. Kolon und Jejunum zeigen in C57BL/6J-Mäusen unterschiedliche Expressionsmuster von *Claudin 4, 15, Occludin* und *ZO-1*.
8. Ghrelin steigert nach einer BDL die Genexpression von *Claudin 4, Occludin* und *ZO-1* im Kolon von C57BL/6J-Mäusen.
9. Eine Ghrelintherapie führt zu einer Zunahme von CD3e-positiven Zellen entlang des gesamten Darmtraktes in der Mukosa von gesunden C57BL/6J-Mäusen.
10. Eine Ghrelin-Therapie verbessert bei C57BL/6J-Mäusen nach einer BDL die parazelluläre Dichtigkeit der Darmbarriere im Kolon.
11. Insgesamt sind die Effekte des Ghrelins zu schwach ausgeprägt, als dass daraus zum jetzigen Zeitpunkt bereits ein klarer Nutzen bezüglich der Darmbarrierefunktion bei schwerer Leberschädigung hergeleitet werden könnte. Es sollten Untersuchungen an weniger schweren Schädigungsmodellen folgen.

7 Literaturverzeichnis

- Abdeldayem, Hesham; Ghoneim, Enas; Refaei, Ahmad Ahmad-El; Abou-Gabal, Ashraf (2007): Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. In: *Hepatology international* 1 (4), S. 444–448. DOI: 10.1007/s12072-007-9018-1.
- Aguanno, Doriane; Postal, Bárbara Graziela; Carrière, Véronique; Thenet, Sophie (2021): Use of Ussing Chambers to Measure Paracellular Permeability to Macromolecules in Mouse Intestine. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2367, S. 1–11. DOI: 10.1007/978-1-092-00367-7_367.
- Alexandre, Michele D.; Lu, Qun; Chen, Yan-Hua (2005): Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Cl⁻ conductance and increases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 12), S. 2683–2693. DOI: 10.1242/jcs.02406.
- Anderson, James M.; van Itallie, Christina M. (2009): Physiology and function of the tight junction. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (2), a002584. DOI: 10.1101/cshperspect.a002584.
- Appanna, Gautham; Kallis, Yiannis (2020): An update on the management of cholestatic liver diseases. In: *Clinical Medicine* 20 (5), S. 513–516. DOI: 10.7861/clinmed.2020-0697.
- Arastéh, Keikawus; Baenkler, Hanns-Wolf; Bieber, Christiane; Brandt, Roland; Chatterjee, Tushar Thomas (2018): *Duale Reihe Innere Medizin*. 4. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1918395>.
- Asakawa, A.; Inui, A.; Kaga, T.; Yuzuriha, H.; Nagata, T.; Ueno, N. et al. (2001): Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. In: *Gastroenterology* 120 (2), S. 337–345. DOI: 10.1053/gast.2001.22158.
- Assimakopoulos, Stelios F.; Tsamandas, Athanassios C.; Louvros, Emanuel; Vagianos, Constantine E.; Nikolopoulou, Vassiliki N.; Thomopoulos, Konstantinos C. et al. (2011): Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients with obstructive jaundice. In: *European journal of clinical investigation* 41 (2), S. 117–125. DOI: 10.1111/j.1365-2362.2010.02379.x.
- Baatar, Dolgor; Patel, Kalpesh; Taub, Dennis D. (2011): The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. In: *Molecular and cellular endocrinology* 340 (1), S. 44–58. DOI: 10.1016/j.mce.2011.04.019.

- Bastmeyer, Daniel Martin (2019): Expressionsstudie von Transport- und Adapterproteinen sowie hormonellen Rezeptoren in der Darmwand von Wildtyp- und NOD2-knockout-Mäusen.
- Bataller, Ramón; Brenner, David A. (2005): Liver fibrosis. In: *J Clin Invest* 115 (2), S. 209–218. DOI: 10.1172/JCI24282.
- Berlin, Peggy; Reiner, Johannes; Witte, Maria; Wobar, Jakob; Lindemann, Sabeth; Barrantes, Israel et al. (2019): Nod2 deficiency functionally impairs adaptation to short bowel syndrome via alterations of the epithelial barrier function. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 317 (5), G727-G738. DOI: 10.1152/ajpgi.00117.2019.
- Blesl, Andreas; Stadlbauer, Vanessa (2021): The Gut-Liver Axis in Cholestatic Liver Diseases. In: *Nutrients* 13 (3). DOI: 10.3390/nu13031018.
- Cameron, G. R.; Oakley, C. L. (1932): Ligation of the common bile duct. In: *J. Pathol.* 35 (5), S. 769–798. DOI: 10.1002/path.1700350512.
- Camilleri, Michael (2019): Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. In: *Gut* 68 (8), S. 1516–1526. DOI: 10.1136/gutjnl-2019-318427.
- Cesta, Mark F. (2006): Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. In: *Toxicologic pathology* 34 (5), S. 599–608. DOI: 10.1080/01926230600865531.
- Chen, Jun; Dong, Jia-Tian; Li, Xiao-Jing; Gu, Ye; Cheng, Zhi-Jian; Cai, Yuan-Kun (2015): Glucagon-like peptide-2 protects impaired intestinal mucosal barriers in obstructive jaundice rats. In: *World journal of gastroenterology* 21 (2), S. 484–490. DOI: 10.3748/wjg.v21.i2.484.
- Cheng, Jian; Zhang, Lin; Dai, Weiqi; Mao, Yuqing; Li, Sainan; Wang, Jingjie et al. (2015): Ghrelin ameliorates intestinal barrier dysfunction in experimental colitis by inhibiting the activation of nuclear factor-kappa B. In: *Biochemical and biophysical research communications* 458 (1), S. 140–147. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.01.083.
- Cichon, Christoph; Sabharwal, Harshana; Rüter, Christian; Schmidt, M. Alexander (2014): MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. In: *Tissue barriers* 2 (4), e944446. DOI: 10.4161/21688362.2014.944446.
- Clarke, Lane L. (2009): A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 296 (6), G1151-66. DOI: 10.1152/ajpgi.90649.2008.

- Da Pereira, Jéssica Aparecida Silva; da Silva, Felipe Corrêa; Moraes-Vieira, Pedro Manoel Mendes de (2017): The Impact of Ghrelin in Metabolic Diseases: An Immune Perspective. In: *Journal of diabetes research* 2017, S. 4527980. DOI: 10.1155/2017/4527980.
- Das, Undurti N. (2011): Relationship between gut and sepsis: Role of ghrelin. In: *World Journal of Diabetes* 2 (1), S. 1–7. DOI: 10.4239/wjd.v2.i1.1.
- Denning, Timothy L.; Norris, Brian A.; Medina-Contreras, Oscar; Manicassamy, Santhakumar; Geem, Duke; Madan, Rajat et al. (2011): Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (2), S. 733–747. DOI: 10.4049/jimmunol.1002701.
- Dixit, Vishwa Deep; Yang, Hyunwon; Sun, Yuxiang; Weeraratna, Ashani T.; Youm, Yun-Hee; Smith, Roy G.; Taub, Dennis D. (2007): Ghrelin promotes thymopoiesis during aging. In: *J Clin Invest* 117 (10), S. 2778–2790. DOI: 10.1172/JCI30248.
- Du, Yehui; Chen, Hao; Xuan, Zefeng; Song, Wenfeng; Hong, Liangjie; Guo, Danjing et al. (2016): Bile deficiency induces changes in intestinal glucose absorption in mice. In: *Surgery* 160 (6), S. 1496–1507. DOI: 10.1016/j.surg.2016.05.040.
- Ehlers, Luise; Netz, Leonard Andreas Wolfgang; Reiner, Johannes; Berlin, Peggy; Bannert, Karen; Bastian, Manuela et al. (2022): Effects of Bile Duct Ligation and Ghrelin Treatment on the Colonic Barrier and Microbiome of Mice. In: *Pharmacology* 107 (11-12), S. 564–573. DOI: 10.1159/000527142.
- Farah, Myriam; McLoughlin, Mark; Byrne, Michael F. (2008): Endoscopic retrograde cholangiopancreatography in the management of benign biliary strictures. In: *Current gastroenterology reports* 10 (2), S. 150–156. DOI: 10.1007/s11894-008-0036-5.
- Fargo, Matthew V.; Grogan, Scott P.; Saguil, Aaron (2017): Evaluation of Jaundice in Adults. In: *American family physician* 95 (3), S. 164–168.
- Flint, N.; Pemberton, P. W.; Lobley, R. W.; Evans, G. S. (1994): Cytokeratin expression in epithelial cells isolated from the crypt and villus regions of the rodent small intestine. In: *Epithelial cell biology* 3 (1), S. 16–23.
- France, Marion M.; Turner, Jerrold R. (2017): The mucosal barrier at a glance. In: *Journal of cell science* 130 (2), S. 307–314. DOI: 10.1242/jcs.193482.

- Frizzell, R. A.; Schultz, S. G. (1972): Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influence of shunt on transmural sodium transport and electrical potential differences. In: *The Journal of general physiology* 59 (3), S. 318–346. DOI: 10.1085/jgp.59.3.318.
- Fujita, Hiroki; Chiba, Hideki; Yokozaki, Hiroshi; Sakai, Naoyuki; Sugimoto, Kotaro; Wada, Takuro et al. (2006): Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 54 (8), S. 933–944. DOI: 10.1369/jhc.6A6944.2006.
- Fukui, Hiroshi; Wiest, Reiner (2016): Changes of Intestinal Functions in Liver Cirrhosis. In: *Inflammatory intestinal diseases* 1 (1), S. 24–40. DOI: 10.1159/000444436.
- Fukushima, Nobuhiro; Hanada, Reiko; Teranishi, Hitoshi; Fukue, Yoshihiko; Tachibana, Toshiaki; Ishikawa, Hiroshi et al. (2005): Ghrelin directly regulates bone formation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20 (5), S. 790–798. DOI: 10.1359/JBMR.041237.
- Garcia-Hernandez, Vicky; Quiros, Miguel; Nusrat, Asma (2017): Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1397 (1), S. 66–79. DOI: 10.1111/nyas.13360.
- Georgiev, P.; Jochum, W.; Heinrich, S.; Jang, J. H.; Nocito, A.; Dahm, F.; Clavien, P-A (2008): Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. In: *The British journal of surgery* 95 (5), S. 646–656. DOI: 10.1002/bjs.6050.
- González-Mariscal, L.; Betanzos, A.; Nava, P.; Jaramillo, B.E (2003): Tight junction proteins. In: *Progress in biophysics and molecular biology* 81 (1), S. 1–44. DOI: 10.1016/s0079-6107(02)00037-8.
- Gonzalez-Rey, Elena; Chorny, Alejo; Delgado, Mario (2006): Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. In: *Gastroenterology* 130 (6), S. 1707–1720. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.01.041.
- Hasegawa, Sho; Yoneda, Masato; Kurita, Yusuke; Nogami, Asako; Honda, Yasushi; Hosono, Kunihiro; Nakajima, Atsushi (2021): Cholestatic Liver Disease: Current Treatment Strategies and New Therapeutic Agents. In: *Drugs* 81 (10), S. 1181–1192. DOI: 10.1007/s40265-021-01545-7.
- Imazu, Yoshifumi; Yanagi, Shigehisa; Miyoshi, Kahori; Tsubouchi, Hironobu; Yamashita, Shu-Ichi; Matsumoto, Nobuhiro et al. (2011): Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by

- protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation. In: *European journal of pharmacology* 672 (1-3), S. 153–158. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.183.
- Klinke, Rainer; Silbernagl, Stefan (Hg.) (2003): Lehrbuch der Physiologie. Unter Mitarbeit von Christian Bauer, Rüdiger Gay und Astried Rothenburger. 4., korrigierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Knipp, G. T.; Ho, N. F.; Barsuhn, C. L.; Borchardt, R. T. (1997): Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 86 (10), S. 1105–1110. DOI: 10.1021/js9700309.
- Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. In: *Nature* 402 (6762), S. 656–660. DOI: 10.1038/45230.
- Kountouras, J.; Billing, B. H.; Scheuer, P. J. (1984): Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. In: *British journal of experimental pathology* 65 (3), S. 305–311.
- Krause, Gerd; Winkler, Lars; Mueller, Sebastian L.; Haseloff, Reiner F.; Piontek, Jörg; Blasig, Ingolf E. (2008): Structure and function of claudins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 631–645. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Krebs, Hans Adolf; Henseleit, Kurt (1932): Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
- Kurmis, Timothy P. (2009): Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: an analysis of outcomes. In: *ANZ journal of surgery* 79 (10), S. 745–749. DOI: 10.1111/j.1445-2197.2009.05093.x.
- Lameris, Anke L.; Huybers, Sylvie; Kaukinen, Katri; Mäkelä, Tuula H.; Bindels, René J.; Hoenderop, Joost G.; Nevalainen, Pasi I. (2013): Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 48 (1), S. 58–69. DOI: 10.3109/00365521.2012.741616.
- Liedtke, Christian; Luedde, Tom; Sauerbruch, Tilman; Scholten, David; Streetz, Konrad; Tacke, Frank et al. (2013): Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. In: *Fibrogenesis & tissue repair* 6 (1), S. 19. DOI: 10.1186/1755-1536-6-19.
- Lin, Ligen; Saha, Pradip K.; Ma, Xiaojun; Henshaw, Iyabo O.; Shao, Longjiang; Chang, Benny H. J. et al. (2011): Ablation of ghrelin receptor reduces adiposity and improves insulin sensitivity during

- aging by regulating fat metabolism in white and brown adipose tissues. In: *Aging cell* 10 (6), S. 996–1010. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00740.x.
- Lindor, Keith D.; Poupon, Raoul; Poupon, Renee: Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis. *Ursodeoxycholic acid for primary biliary cirrhosis*. England: Elsevier Ltd.
- Liu, Yan; Meyer, Christoph; Xu, Chengfu; Weng, Honglei; Hellerbrand, Claus; Dijke, Peter ten; Dooley, Steven (2013): Animal models of chronic liver diseases. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 304 (5), G449-68. DOI: 10.1152/ajpgi.00199.2012.
- Ma, Xiaojun; Lin, Yuezhen; Lin, Ligen; Qin, Guijun; Pereira, Fred A.; Haymond, Morey W. et al. (2012): Ablation of ghrelin receptor in leptin-deficient ob/ob mice has paradoxical effects on glucose homeostasis when compared with ablation of ghrelin in ob/ob mice. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 303 (3), E422-31. DOI: 10.1152/ajpendo.00576.2011.
- Maduzia, D.; Matuszyk, A.; Ceranowicz, D.; Warzecha, Z.; Ceranowicz, P.; Fyderek, K. et al. (2015): The influence of pretreatment with ghrelin on the development of acetic-acid-induced colitis in rats. In: *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 66 (6), S. 875–885.
- Mankertz, Joachim; Schulzke, Jörg-Dieter (2007): Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. In: *Current opinion in gastroenterology* 23 (4), S. 379–383. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32816aa392.
- Mao, Yuanjie; Tokudome, Takeshi; Otani, Kentaro; Kishimoto, Ichiro; Nakanishi, Michio; Hosoda, Hiroshi et al. (2012): Ghrelin prevents incidence of malignant arrhythmia after acute myocardial infarction through vagal afferent nerves. In: *Endocrinology* 153 (7), S. 3426–3434. DOI: 10.1210/en.2012-1065.
- Mariotti, Valeria; Strazzabosco, Mario; Fabris, Luca; Calvisi, Diego F. (2018): Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1864 (4 Pt B), S. 1254–1261. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.06.027.
- Masuda, Y.; Tanaka, T.; Inomata, N.; Ohnuma, N.; Tanaka, S.; Itoh, Z. et al. (2000): Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. In: *Biochemical and biophysical research communications* 276 (3), S. 905–908. DOI: 10.1006/bbrc.2000.3568.
- Matuszyk, Aleksandra; Ceranowicz, Piotr; Warzecha, Zygmunt; Cieszkowski, Jakub; Ceranowicz, Dagmara; Gałązka, Krystyna et al. (2016): Exogenous Ghrelin Accelerates the Healing of Acetic

- Acid-Induced Colitis in Rats. In: *International journal of molecular sciences* 17 (9). DOI: 10.3390/ijms17091455.
- Meyer, Fatuma; Bannert, Karen; Wiese, Mats; Esau, Susanne; Sautter, Lea F.; Ehlers, Luise et al. (2020): Molecular Mechanism Contributing to Malnutrition and Sarcopenia in Patients with Liver Cirrhosis. In: *International journal of molecular sciences* 21 (15). DOI: 10.3390/ijms21155357.
- Monaco, Ashley; Ovrzyn, Ben; Axis, Josephine; Amsler, Kurt (2021): The Epithelial Cell Leak Pathway. In: *International journal of molecular sciences* 22 (14). DOI: 10.3390/ijms22147677.
- Moreno, Montserrat; Chaves, Javier F.; Sancho-Bru, Pau; Ramalho, Fernando; Ramalho, Leandra N.; Mansego, Maria L. et al. (2010): Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (3), S. 974–985. DOI: 10.1002/hep.23421.
- Nakanishi, Yukihiro; Saxena, Romil (2015): Pathophysiology and Diseases of the Proximal Pathways of the Biliary System. In: *Archives of pathology & laboratory medicine* 139 (7), S. 858–866. DOI: 10.5858/arpa.2014-0229-RA.
- Nguyen, Ken D.; Sundaram, Vinay; Ayoub, Walid S. (2014): Atypical causes of cholestasis. In: *World journal of gastroenterology* 20 (28), S. 9418–9426. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9418.
- Norman, K.; Pirlich, M.; Schulzke, J-D; Smoliner, C.; Lochs, H.; Valentini, L.; Bühner, S. (2012): Increased intestinal permeability in malnourished patients with liver cirrhosis. In: *European journal of clinical nutrition* 66 (10), S. 1116–1119. DOI: 10.1038/ejcn.2012.104.
- O'Brien, Alastair; China, Louise; Massey, Karen A.; Nicolaou, Anna; Winstanley, Alison; Newson, Justine et al. (2016): Bile duct-ligated mice exhibit multiple phenotypic similarities to acute decompensation patients despite histological differences. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 36 (6), S. 837–846. DOI: 10.1111/liv.12876.
- Oshima, Tadayuki; Miwa, Hiroto; Joh, Takashi (2008): Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 23 Suppl 2, S146-50. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2008.05405.x.
- Otto, Gordon P.; Rathkolb, Birgit; Oestereich, Manuela A.; Lengger, Christoph J.; Moerth, Corinna; Micklich, Kateryna et al. (2016): Clinical Chemistry Reference Intervals for C57BL/6J, C57BL/6N,

- and C3HeB/FeJ Mice (*Mus musculus*). In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 55 (4), S. 375–386.
- Pinzani, M. (1999): Liver fibrosis. In: *Springer seminars in immunopathology* 21 (4), S. 475–490. DOI: 10.1007/s002810000037.
- Pradhan, Geetali; Samson, Susan L.; Sun, Yuxiang (2013): Ghrelin: much more than a hunger hormone. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 16 (6), S. 619–624. DOI: 10.1097/MCO.0b013e328365b9be.
- Prasad, Shyam; Mingrino, Roberto; Kaukinen, Katri; Hayes, Katherine L.; Powell, Robert M.; MacDonald, Thomas T.; Collins, Jane E. (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85 (9), S. 1139–1162. DOI: 10.1038/labinvest.3700316.
- Quiñones, Mar; Fernø, Johan; Al-Massadi, Omar (2020): Ghrelin and liver disease. In: *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 21 (1), S. 45–56. DOI: 10.1007/s11154-019-09528-6.
- Reiner, Johannes; Berlin, Peggy; Wobar, Jakob; Schäffler, Holger; Bannert, Karen; Bastian, Manuela et al. (2020): Teduglutide Promotes Epithelial Tight Junction Pore Function in Murine Short Bowel Syndrome to Alleviate Intestinal Insufficiency. In: *Digestive diseases and sciences* 65 (12), S. 3521–3537. DOI: 10.1007/s10620-020-06140-6.
- Ritis, Fernando de; Coltorti, Mario; Giusti, Giuseppe (1957): An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: the transaminase serum activities. 1957. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 369 (2), S. 148–152. DOI: 10.1016/j.cca.2006.05.001.
- Schneeberger, Eveline E.; Lynch, Robert D. (2004): The tight junction: a multifunctional complex. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 286 (6), C1213-28. DOI: 10.1152/ajpcell.00558.2003.
- Sleeman, Mark W.; Spanswick, David C. (2014): Starving for ghrelin. In: *Cell metabolism* 20 (1), S. 1–2. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.06.006.
- Souza-Moreira, Luciana; Delgado-Maroto, Virginia; Morell, Maria; O'Valle, Francisco; Del Moral, Raimundo G.; Gonzalez-Rey, Elena (2013): Therapeutic effect of ghrelin in experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting antigen-specific Th1/Th17 responses and inducing regulatory T cells. In: *Brain, behavior, and immunity* 30, S. 54–60. DOI: 10.1016/j.bbi.2013.01.080.

- Sugiyama, Masako; Yamaki, Akira; Furuya, Mayumi; Inomata, Norio; Minamitake, Yoshiharu; Ohsuye, Kazuhiro; Kangawa, Kenji (2012): Ghrelin improves body weight loss and skeletal muscle catabolism associated with angiotensin II-induced cachexia in mice. In: *Regulatory Peptides* 178 (1-3), S. 21–28. DOI: 10.1016/j.regpep.2012.06.003.
- Sun, Yuxiang; Ahmed, Saira; Smith, Roy G. (2003): Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. In: *Molecular and cellular biology* 23 (22), S. 7973–7981. DOI: 10.1128/MCB.23.22.7973-7981.2003.
- Sun, Yuxiang; Asnicar, Mark; Saha, Pradip K.; Chan, Lawrence; Smith, Roy G. (2006): Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. In: *Cell metabolism* 3 (5), S. 379–386. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.04.004.
- Sun, Yuxiang; Wang, Pei; Zheng, Hui; Smith, Roy G. (2004): Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (13), S. 4679–4684. DOI: 10.1073/pnas.0305930101.
- Tschöp, M.; Smiley, D. L.; Heiman, M. L. (2000): Ghrelin induces adiposity in rodents. In: *Nature* 407 (6806), S. 908–913. DOI: 10.1038/35038090.
- Tsubouchi, Hironobu; Yanagi, Shigehisa; Miura, Ayako; Matsumoto, Nobuhiro; Kangawa, Kenji; Nakazato, Masamitsu (2014): Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice. In: *European journal of pharmacology* 743, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.09.025.
- Turner, Jerrold R. (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (11), S. 799–809. DOI: 10.1038/nri2653.
- Umeda, Kazuaki; Ikenouchi, Junichi; Katahira-Tayama, Sayaka; Furuse, Kyoko; Sasaki, Hiroyuki; Nakayama, Mayumi et al. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. In: *Cell* 126 (4), S. 741–754. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.043.
- van Itallie, C.; Rahner, C.; Anderson, J. M. (2001): Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. In: *J Clin Invest* 107 (10), S. 1319–1327. DOI: 10.1172/JCI12464.

- van Itallie, Christina M.; Fanning, Alan S.; Anderson, James M. (2003): Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 285 (6), F1078-84. DOI: 10.1152/ajprenal.00116.2003.
- Visentin, Michele; Lenggenhager, Daniela; Gai, Zhibo; Kullak-Ublick, Gerd A. (2018): Drug-induced bile duct injury. In: *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 1864 (4 Pt B), S. 1498–1506. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.08.033.
- Warner, Brad W. (2016): The Pathogenesis of Resection-Associated Intestinal Adaptation. In: *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2 (4), S. 429–438. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.05.001.
- Weber, Christopher R.; Nalle, Sam C.; Tretiakova, Maria; Rubin, David T.; Turner, Jerrold R. (2008): Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 88 (10), S. 1110–1120. DOI: 10.1038/labinvest.2008.78.
- Wells, Jerry M.; Brummer, Robert J.; Derrien, Muriel; MacDonald, Thomas T.; Troost, Freddy; Cani, Patrice D. et al. (2017): Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 312 (3), G171-G193. DOI: 10.1152/ajpgi.00048.2015.
- Williams, Diana L.; Grill, Harvey J.; Cummings, David E.; Kaplan, Joel M. (2003): Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. In: *Endocrinology* 144 (12), S. 5184–5187. DOI: 10.1210/en.2003-1059.
- Wren, A. M.; Small, C. J.; Ward, H. L.; Murphy, K. G.; Dakin, C. L.; Taheri, S. et al. (2000): The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. In: *Endocrinology* 141 (11), S. 4325–4328. DOI: 10.1210/endo.141.11.7873.
- Wu, Rongqian; Dong, Weifeng; Qiang, Xiaoling; Wang, Haichao; Blau, Steven A.; Ravikumar, Thanjavur S.; Wang, Ping (2009): Orexigenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats. In: *Critical Care Medicine* 37 (8), S. 2421–2426. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181a557a2.
- Yanagi, Shigehisa; Sato, Takahiro; Kangawa, Kenji; Nakazato, Masamitsu (2018): The Homeostatic Force of Ghrelin. In: *Cell metabolism* 27 (4), S. 786–804. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.02.008.

- Zakhari, Joseph S.; Zorrilla, Eric P.; Zhou, Bin; Mayorov, Alexander V.; Janda, Kim D. (2012): Oligoclonal antibody targeting ghrelin increases energy expenditure and reduces food intake in fasted mice. In: *Molecular pharmaceutics* 9 (2), S. 281–289. DOI: 10.1021/mp200376c.
- Zeisel, Mirjam B.; Dhawan, Punita; Baumert, Thomas F. (2019): Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease. In: *Gut* 68 (3), S. 547–561. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316906.
- Zeissig, S.; Bürgel, N.; Günzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U. et al. (2007): Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. In: *Gut* 56 (1), S. 61–72. DOI: 10.1136/gut.2006.094375.
- Zhao, Tong-Jin; Liang, Guosheng; Li, Robert Lin; Xie, Xuefen; Sleeman, Mark W.; Murphy, Andrew J. et al. (2010): Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (16), S. 7467–7472. DOI: 10.1073/pnas.1002271107.
- Zur, Berndt (2005): Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Düsseldorf, Univ., Diss., 2005.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 – Übersicht von Funktionen ausgewählter Tight-Junction-Proteine	6
Tabelle 2-1 – Wellnessscore zur Beurteilung des Wohlergehens der Tiere während des Versuches .	13
Tabelle 2-2 – Einteilung der Tiere in Therapie- und Kontrollgruppen.....	14
Tabelle 2-3 – Anzahl der Mäuse aus Gruppen ohne Therapie	15
Tabelle 2-4 – Zusammensetzung des modifizierten Krebspuffers	18
Tabelle 2-5 – Färbeablauf HE.....	20
Tabelle 2-6 – Färbeablauf Immunhistochemie.....	22
Tabelle 2-7 – Färbeablauf Siriusrot-Färbung	23
Tabelle 2-8 – Zusammensetzung des Mastermixes für die Reverse Transkriptase.....	25
Tabelle 2-9 – Inkubationszeiten für die reverse Transkription	25
Tabelle 2-10 – Inkubationszeiten Echtzeit-PCR	26
Tabelle 2-11 – Liste der verwendeten rtPCR-Sonden	27
Tabelle 2-12 – Liste der untersuchten Blutparameter	27
Tabelle 3-1 – Elektrolyte im Blutplasma der Tiere ohne Therapie.....	51
Tabelle 3-2 – Elektrolyte im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie	51
Tabelle 3-3 – Enzyme im Blutplasma der Tiere ohne Therapie.....	52
Tabelle 3-4 – Enzyme im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie	53
Tabelle 3-5 – Lipide im Blutplasma der Tiere ohne Therapie.....	54
Tabelle 3-6 –Lipide im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie	54
Tabelle 3-7 – Metabolite im Blutplasma der Tiere ohne Therapie	55
Tabelle 3-8 – Metabolite im Blutplasma der Tiere mit Ghrelintherapie	55

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 – Aufbau der Tight Junctions:.....	5
Abbildung 1-2 – Wirkschema Ghrelin:	11
Abbildung 2-1 – Ablauf der Tierversuche:	15
Abbildung 2-2 – Entnahmeschema Darm:	16
Abbildung 2-3 – Schematischer Aufbau der Ussing-Kammer:.....	18
Abbildung 2-4 – Messschema HE:.....	21
Abbildung 3-1 – Gewichtsverläufe:	29

Abbildung 3-2 – HE-Färbung der Leber:.....	30
Abbildung 3-3 – HE-Färbung von Jejunum und Kolon:	32
Abbildung 3-4 – Mukosahöhe und Zottenlänge im Duodenum von Gruppen ohne Therapie	33
Abbildung 3-5 – Mukosahöhe und Zottenlänge im Duodenum von Therapiegruppen:.....	33
Abbildung 3-6 – Siriusrot-Färbung von Lebergewebe aus den Gruppen sham und BDL:.....	34
Abbildung 3-7 – Transmuraler Widerstand in Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie:	36
Abbildung 3-8 – Transmuraler Widerstand von Jejunum und Kolon der Therapiegruppen:.....	37
Abbildung 3-9 – Parazelluläre Permeabilität von Jejunum und Kolon der Gruppen ohne Therapie:	39
Abbildung 3-10 – Parazelluläre Permeabilität vom Kolon der Therapiegruppen:	40
Abbildung 3-11 – Immunhistochemie-Färbung von CD3e in Darmabschnitten:	43
Abbildung 3-12 – Immunhistochemie-Färbung von CD11b in Darmabschnitten:.....	45
Abbildung 3-13 – Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Jejunum der Therapiegruppen:.....	47
Abbildung 3-14 – Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Kolon der Therapiegruppen:	49
Abbildung 5-1 – Auswirkungen von BDL und Ghrelintherapie:	71

8.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
ALAT	Alanin Aminotransferase
ANOVA	Analasys of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat Aminotransferase
BDL	<i>bile duct ligation</i>
BSC	Primär sklerosierende Cholangitis
ca.	circa
CCl4	Carbon Tetrachlorkohlenstoff
CD 25	<i>cluster of diferentiation 25</i>
CD 11b	<i>cluster of diferentiation 11b</i>
CD 3e	<i>cluster of diferentiation 3e</i>
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>Cycle threshold</i>
d	Tag
DEPC-Wasser	Diethyldicarbonat-Wasser

Dex	Dextran
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphaten
ERC	Endoskopische retrograde Choledochografie
et al.	und andere
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fox P3	<i>forkhead box protein 3</i>
g	Gramm
GEMM	<i>genetically engineered mouse model</i>
Ghr	Ghrelin
GHSR 1a	<i>growth hormone secretagogue receptor 1a</i>
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
I	Strom
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knock Out</i>
L	Liter
LM	Lösungsmittel
m ²	Quadratmeter
MDR2	<i>multi-drug-resistant gene 2</i>
min	Minuten
min.	mindestens
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mRNA	<i>messenger-Ribonucleic Acid</i>
nm	Nanometer
OP	Operation
PBC	Primär biliäre Cholangitis
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
R	Widerstand
RT	Reverse Transkriptase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TBS	<i>Tris-buffered-Saline</i>
TEER	<i>transepithelial epithelial resistance</i>
Th2	T-Helfer-Zelle 2
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TJ	<i>tight junction</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	Spannung
u.a.	unter anderem
UMR	Universitätsmedizin Rostock

vs.	versus
ZO-1	Zonula occludens Protein 1
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
μ A	Mikroampere
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
Ω	Ohm

8.4 Materialien

8.4.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Gerätename	Seriennummer	Hersteller
Abzug	-	-	Köttermann GmbH&Co.KG
Chemikalienschrank	-	43829_HePi_1	Düperthal Sicherheitstechnik GmbH&Co.KG
Durchlichtmikroskop	Axiophot	45 18 89	Carl Zeiss AG
Einbettautomat	HistoStarTM		MICROM International GmbH
Eisflockenmaschine	AF 103	3006 ES1L	Scotsman
Heizblock	Thermomixer comfort	5355ZK947672	Eppendorf AG
Histokinette	STP 120	58599	MICROM International GmbH
Kamera	Pentax K10D	1.051.990-LSMN	Pentax
Kryostat	Leica CM1850		Leica Biosystems Nussloch GmbH
Kühl-Gefrierkombi	LCv 4010	81.881.948.1	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -150 °C	MDF-C2156VAN	60915116	Sanyo Denki K.K.
Kühlschrank, -20 °C	GNP 2356	49.128.888.8	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	KT 1520	16.462.207.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, 4 °C	UKS 5002	78.774.603.0	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlschrank, -80 °C	HFU B Series	840367-166	Thermor Fischer Scientific Inc.
Mikroskop digital	Axio Observer	1027184678	Carl Zeiss AG
Mikroskopierkamera	AxioCamICc1	09/285847905	Carl Zeiss AG
Mikrotom	HM 340 E	58353	MICROM International GmbH
pH-Meter	PHM220	657R031N015	Radiometer Copenhagen™
Photometer	Implen NanoPhotometer	6303	Implen GmbH
Plattenluminometer	Glomax Multidetecion System	9.30E+16	Promega GmbH
Taqman	Echtzeit-PCR-Cycler (ViiA 7)	27882087	Applied Biosystems
Tissuelyzer	Tissuelyser LT	23.1001/06948	Qiagen (Hilden)
Trockenofen	Hybrid2	265	Appligene Oncor S.A.
Ussing Base System	Ussing-Set-Up Bundle 6/STD	1446	Mussler – Scientific Instruments
Ussing-Kammer (Kammer)	Ussing Diffusion-Chamber	1308	Mussler – Scientific Instruments

8 Anhang

VCC (Ussing-Kammer)	Voltage/Current Clamp VCC6	1310	Mussler – Scientific Instruments
Waage	Quintix	QUINTIX 224-1S	Sartorius Lab Instruments GmbH
Zentrifuge groß	Rotina 46R	0003058-01-00	Andraes Hettich GmbH&Co.KG
Zentrifuge klein	Mikro 200 R	0000778-02-00	Andraes Hettich GmbH&Co.KG

8.4.2 Software

Name	Funktion	Version	Hersteller
Quant Studio Real Time PCR	PCR-Analyse	1.2	Thermo Fisher Scientific
SPSS	Statistikanalyse	27	IBM
ZEN	Bildauswertung	3.2 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Excel	Datenverwaltung	2307 (Microsoft Office Home and Student 2019)	Microsoft Corporation

8.4.3 Verbrauchsmaterialien

Materialname	Spezifikation	Katalognummer	Hersteller
5-0 Polyester	-	1721373	Catgut
6-0 Prolene	-	17403100	Catgut
96-well-Platte	-	353075	BD
Ag-AgCl-Elektroden	-	1327	Mussler – Scientific Instruments
Anti Rabbit IgG	ImPRESS AP Reagent Kit	MP-5401	Vector Laboratories
AP-Kit	ImPACT Vector	SK-5105	Vector Laboratories
Deckgläschen	24x50 mm DIN ISO 8255	107222	Marienfeld
Dual Filter Tips	0,1-1000 µl	0030077.504	Eppendorf AG
Gewebekassetten	Histosette®	M499	Simport Scientific Inc.
Handschuhe M	puderfrei, Nitril	2705	Hygo Star
Kanülen	20G x 1/2"	301300	BD Microlance™
Mikrotomklingen	Leica 819 low profile Microtom Blades	14035838925	Leica Biosystems
Objektträger	ISO 8037	810000	Paul Marienfeld GmbH&Co.KG
Pipettenspitzen	0,1-1000 µl		Eppendorf AG
Präzisionstücher	weiß/ klein	7552	Kimtech Science
Reaktionsgefäß 15 ml	-	188271	greiner bio one (Kremsmünster, Österreich)
RNeasy® Mini Kit	-	227261	Qiagen
Safe-Lock-Tubes 5 ml	Farblos	30119.401	Eppendorf AG
Safe-Lock-Tubes 0,6 ml	Farblos	11210-E	Sorenson BioScience Inc.
Safe-Lock-Tubes 1,5 ml	Farblos	30119.401	Eppendorf AG
Spritzen 1 ml	Omnifix -F	9161406	B BRAUN (Melsungen, Deutschland)
Spritzen 5 ml	Omnifix® Solo	4617053V	B BRAUN (Melsungen, Deutschland)

8.4.4 Substanzen, Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Katalognummer	Hersteller
Aceton	-	-	Zentralapotheke UMR
AK: Anti-CD11b	-	NB110-89474	Novus Biologicals
AK: Anti-CD3e	-	MA 1-90582	Invitrogen
AP-Reagent (anti-rabbit)	Anti-rabbit Ig (horse)	-	Vector Laboratories
AP-Substrat	ImmPACT™ Vector® Red Diluent Levamisol, ImmPACT™ Vector® Red Reagent 1, ImmPACT™ Vector® Red Reagent 2	MP-5401	Vector Laboratories
B-Aktin Sonde	-	Mm02619580_g1	Thermo Fisher Scientific
BSA	0,01 in PBS	A7906-100G	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	-	1.02382	Merck KGaA Darmstadt
Carbogen	O ₂ : 95 % / CO ₂ : 5 %	P3750L50R5A001	Air Liquide
CD11b Antikörper	rabbit AK	NB110-89474	Novus Biologicals
CD3e Antikörper	rabbit AK	MA 1-90582	Invitrogen
Claudin 15 Sonde	-	Mm00517635_m1	Thermo Fisher Scientific
Claudin 2 Sonde	-	Mm00516703_s1	Thermo Fisher Scientific
Claudin 4 Sonde	-	Mm00515514_s1	Thermo Fisher Scientific
Claudin 7 Sonde	-	Mm00516817_m1	Thermo Fisher Scientific
DAPI	-	D9542	Sigma-Aldrich
DNase	-	79254	Qiagen
Eosin	0,2 % Alkohol	13017-0100	Medite
Essigsäure 0,5 %	-	6052	J.T.Baker
Ethanol 70 % vergällt	Ethanol 96 % vergällt in Aqua dest.	603-002-00-5	WALTER CMP GmbH & Co KG
Ethanol 96 % vergällt	-	603-002-00-5	WALTER CMP GmbH & Co KG
Ethanol absl.	-	603-002-00-5	WALTER CMP GmbH & Co KG
FITC-Dextran	FDG-1G	102281105	Sigma-Aldrich
Formalin "Formafix"	-	P10004G	Grimm med. Logistik GmbH
Ghrelin	-	031-31-BULK	Phoenic Europe GmbH
Glucose	-	1.08337.1000	Carl Roth GmbH und Co KG
Hämalaun	-	1092490500	Merck
Hämatoxylin nach GILL/Harris	-	41-5135-00	Medite
Histoplast Paraffin	-	12617956	Fisher Scientific
Isofluran	-	HGD9623	Baxter Deutschland GmbH
KCl	-	6781.3	Carl Roth GmbH und Co KG
Keratin 8 Sonde	-	Mm04209403_s1	Thermo Fisher Scientific
Ketamin	500 mg/10 ml	7538814	ratiopharm GmbH
Mastermix rtPCR	Low ROX Probe MMdTTP blue	UFLPMT-B0701	Takyon™

8 Anhang

Mastermix-Kit RT	High Capacity RTKit (200 R)	4368814	Thermo Fisher Scientific
Metamizol	500 mg/ml	03507952	Zentiva Pharma GmbH
MgCl ₂	-	105833.025	Carl Roth GmbH und Co KG
Mounting Medium	-	S3023	Dako (Agilent Technologies Inc.)
Na ₂ HPO ₄	-	71643	Fluka Chemie AG Steinheim
NaCl	-	3957.1	Merck KGaA Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	-	6346.05	Merck KGaA Darmstadt
NaHCO ₃	-	6885.1	Merck KGaA Darmstadt
Occludin Sonde	-	Mm00500912_m1	Thermo Fisher Scientific
PBS	-	70011-036	gibco by life technologies
Pertex	-	41-4012-00	Medite
Povidon-Iod		6108022.00.01	Mundipharma GmbH
Caprofen	50 mg/ml	400684.00.00	Zoetis Deutschland GmbH
Siriusrot	-	D-0303	Sigma-Aldrich
TBS	1 L: Trisbase: 6,05 g NaCl: 8,75 g	TRIS: 4855.2 NaCl: 3957.1	Carl Roth GmbH und Co KG
Tissue-Tek	-	4583	Sakura Finetek Europe
Villin Sonde	-	Mm00494146_m1	Thermo Fisher Scientific
Wiegerts Hämatoxylin	-	10225B-00250	Morphisto
Xylazin	2 % Bernburg	07099786	MEDISTAR Arzneimittelvertrieb GmbH
Xylol	-	8118.1	J.T.Baker
Ziegenserum	0,1 % Serum in PBS	S-1000	Vector Laboratories Inc.
ZO-1 Sonde	-	Mm00493699_m1	Thermo Fisher Scientific

8.5 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Leonard Andreas Wolfgang Netz
Geburtsdatum: 14.12.1996
Geburtsort: Düsseldorf

Schulbildung

8/2002 – 6/2007 Gemeinschaftsgrundschule Garather Straße (Düsseldorf)
8/2007 – 6/2016 Annette-von-Droste-Hülshoff Gymnasium (Düsseldorf)
8/2012 – 7/2013 Schüleraustausch in Pato Branco (Brasilien) als Rotary-Stipendiat

Studium

10/2016 – 7/2023 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
7/2023 Ärztliche Approbation Universität Rostock

Promotion

Seit 12/2019 Zentrum für Innere Medizin, Klinik II, Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten, Universitätsmedizin Rostock

Publikationen

11/2022 Ehlers, Luise; Netz, Leonard; Reiner, Johannes; Berlin, Peggy; Bannert, Karen; Bastian, Manuela; Zechner, Dietmar; Lamprecht, Georg; Jaster, Robert (2022): Effects of Bile Duct Ligation and Ghrelin Treatment on the Colonic Barrier and Microbiome of Mice. In: Pharmacology 107 (11-12), S. 564–573.

8.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Robert Jaster für die Vergabe dieser Arbeit bedanken. Er stand mir während der gesamten Arbeit richtungsweisend zur Seite und half mir, die Dissertation zu einem runden Abschluss zu bringen. Vielen Dank für die vielen Stunden der Geduld, Offenheit und Freundlichkeit. Ich schätze mich glücklich, ihn meinen Doktorvater nennen zu dürfen. Danke für die hervorragende Betreuung.

Frau Dr. rer. hum. Luise Ehlers hat mir geholfen, mich in der Forschungsarbeit zurechtzufinden und mir beigebracht, im Labor zu arbeiten. Sie hatte immer ein offenes Ohr für mich, egal wie klein die Frage war. Danke für das Verständnis und die Ermutigung entlang des Weges. Danke für die vielen Seiten Korrekturlesen und die unzähligen Ratschläge.

Ein großer Dank gilt auch dem Team des gastroenterologischen Forschungslabors für die Bereitstellung der Geräte, die Einweisung in Methoden und die Unterstützung an vielen Stellen. Mein besonderer Dank gilt Frau Katja Bergmann, die viele der histologischen Methoden erprobt und mir erklärt hat. Gleiches gilt für Herrn Dr. med. Johannes Reiner, der mir die Arbeit mit der Ussing-Kammer ermöglichte.

Danke Albert und Pauline, für die vielen gemeinsamen Abende, aufmunternde Worte und den Rückhalt den ihr mir gebt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken. Auf meine Brüder und meine Eltern kann ich mich in jeder Lebenslage verlassen. Sie haben mich zum Medizinstudium inspiriert und bis zum letzten Tag motiviert!

Meinem Vater Priv. Doz. Dr. med. Dipl.-Phys. Johannes Netz. In Gedenken an seine Zeit als Wissenschaftler und Arzt.

8.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema:

„Experimentelle Studien zur Störung der Darmbarriere bei cholestatischen Lebererkrankungen“

selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall durch Angaben der Quellen kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass ich meine wissenschaftlichen Arbeiten nach den Prinzipien der guten wissenschaftlichen Praxis gemäß der gültigen „Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zur Vermeidung Fehlverhaltens“ an der Universität Rostock angefertigt habe.

Rostock, September 2023

Leonard Netz