

# **Mechanismen der Sarkopenie in der experimentellen chronischen Pankreatitis in der Maus**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Greifswald

vorgelegt von

Julia Doller

Greifswald, Juni 2022

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. G. Kerth

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. M. Delcea

2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. M. Lerch

3. Gutachter: Prof. Dr. med. J Rosendahl

Tag der Promotion: 01.12.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Inhaltsverzeichnis</i></b> .....	<b>1</b>
<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>5</b>
<b><i>Maße und Einheiten</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Summary</b> .....	<b>10</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Pankreas</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Entzündliche Erkrankungen des Pankreas</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Akute Pankreatitis.....	13
2.2.2 Chronische Pankreatitis.....	13
<b>2.3 Experimentelle Modelle der chronischen Pankreatitis</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4 Anatomischer Aufbau und Physiologie der Skelettmuskulatur</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5 Sarkopenie und Malnutrition</b> .....	<b>17</b>
<b>2.6 Molekulare Mechanismen bei Sarkopenie</b> .....	<b>19</b>
<b>2.7 Interpretation molekularer Veränderungen durch „Omics“-Analysen</b> .....	<b>21</b>
2.7.1 Metabolom .....	21
2.7.2 Mikrobiom .....	23
<b>3. Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 Material</b> .....	<b>26</b>
4.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel .....	26
4.1.2 Reagenzien und Kits .....	28
4.1.3 Puffer und Lösungen .....	31
4.1.4 Oligonukleotide.....	33
4.1.5 Primäre Antikörper .....	34
4.1.6 Sekundäre Antikörper .....	34
4.1.7 Software .....	34
<b>4.2 Methoden</b> .....	<b>35</b>

4.2.1 Tierhaltung .....	35
4.2.2 Diäten .....	35
4.2.3 Experimentelle Modelle der Chronischen Pankreatitis .....	35
4.2.3.1 Ligatur-Modell.....	35
4.2.3.2 Repetitives Caeruleinjektions-Modell.....	36
4.2.4 Messung der skelettalen Muskelkraft.....	37
4.2.5 Asservation von Blut und Organen .....	37
4.2.6 Einbettung der Muskulatur .....	37
4.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
4.2.7.2 TUNEL Färbung.....	38
<b>4.3 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
4.3.1 RNA Isolation.....	39
4.3.2 cDNA-Synthese.....	39
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	40
4.3.4 Quantitative Real-time (Echtzeit) PCR .....	41
4.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	41
4.3.6 Bestimmung des Gelegenheitsblutzuckers .....	41
<b>4.4 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>42</b>
4.4.1 Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung.....	42
4.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	42
4.4.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western-Blot“)......	42
<b>4.5 Enzymatische Methoden.....</b>	<b>43</b>
4.5.1 Myeloperoxidase-Bestimmung in der Lunge .....	43
4.5.2 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum .....	44
4.5.3 Enzymmessungen im Stuhl .....	44
<b>4.6 Morphometrische Methoden.....</b>	<b>45</b>
4.6.1 Magnetresonanztomographische Messungen .....	45
<b>4.7 Analysen des fäkalen Mikrobioms.....</b>	<b>46</b>
4.7.1 Analysen des Serummetaboloms.....	47
<b>4.8 Statistische Auswertung.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Histologische Beurteilung des Pankreas .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Beurteilung der endo- und exokrinen Pankreasfunktion in beiden Modellen .....</b>	<b>51</b>
<b>5.3 Verlust von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis .....</b>	<b>52</b>
<b>5.4 Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis in der Hämatoxylin Eosin Färbung.....</b>	<b>54</b>

5.5 Messung des Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis durch Magnetresonanztomographie .....	55
5.6 Verlauf pro- und antiinflammatorischer Serum-Zytokinspiegel in der chronischen Pankreatitis .....	56
5.7 Untersuchung von Proteinabbauwegen im Skelettmuskel .....	58
5.8 Apoptose im Quadrizeps-Muskel .....	62
5.9 Bestimmung des Serummetaboloms in der chronischen Pankreatitis.....	63
5.9.1 Caeruleinmodell .....	63
5.9.2 Ligaturmodell .....	65
5.10 Stuhlmikrobiom .....	67
5.10.1 Caeruleinmodell .....	67
5.10.2 Ligaturmodell .....	70
5.11 Untersuchung der Sarkopenie in der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät .....	74
5.11.1 Verlust von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis .....	74
5.11.2 Beurteilung der endo- und exokrinen Funktion in beiden Modellen .....	76
5.11.3 Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis unter fettreicher Diät .....	77
5.11.4 Untersuchung von Proteinabbauwegen im Skelettmuskel .....	79
5.11.5 Apoptose im Quadrizeps-Muskel unter fettreicher Diät .....	82
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
6.1 Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis.....	83
6.2 Charakterisierung der am Muskelabbaubeteiligten Mechanismen.....	83
6.3 Bedeutung der Apoptose für die Sarkopenie .....	86
6.4 Bedeutung des Serum-Metaboloms und des fäkalen Mikrobioms in der experimentellen chronischen Pankreatitis.....	87
<b>7. Ausblick/Limitation .....</b>	<b>91</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>Eigenständigkeitserklärung.....</b>	<b>I</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>II</b>

<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>III</b>
<b>Kongressbeiträge und Poster .....</b>	<b>IV</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>V</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	<i>aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
ACh	Acetylcholin
ActRIIB	Activin-Typ-2-Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphat
CCK	Cholecystokinin
CTRC	Chymotrypsin C
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> , Zyklus Schwelle
Dapi	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBTC	Dibutylzinndichlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FOXO	Forkhead-Box-protein O3
GDF8	<i>growth differentiatin factor 8</i> , Wachstums/Differentierungsfaktor8
HBA1c	Hämoglobin A1c
HMP	humanes Mikrobiom Projekt
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
LPC	Lysophosphatidylcholin
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i> , chemoattraktives Monozytenprotein
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i> , mechanistisches Target für Rapamycin
MURF	<i>muscle RING-finger protein</i> , Muskel RING-Finger Protein
PC	Phosphatidylcholin
PCoA	<i>principal component analysis</i> , Hauptkoordinatenanalyse

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Pankreasinsuffizienz
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SPF	spezifiziert Pathogenfrei
SPINK1	Serin Protease Inhibitor Kazal-Type 1
Syn.	Synonym
TAG	Triacylglycerid
TNF	Tumornekrosefaktor

### **Maße und Einheiten**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ-	Mikro- (Einheit) (Millionstel; $10^{-6}$ )
bp	Basenpaar
d	Tag
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
m	Meter
m-	Milli- (Einheit) (Tausendstel; $10^{-3}$ )
M	Molar
MHz	Megahertz
Min	Minute

mT/m	Millitesla pro Meter
n-	Nano- (Einheit) (Milliardstel; $10^{-9}$ )
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ( $-\log_{10}$ der Wasserstoffionenaktivität)
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
U	<i>Units</i> ; Enzymeinheit
V	Volt
Da	Dalton

## 1. Zusammenfassung

Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich um eine häufige gastrointestinale Erkrankung, die zum Verlust von Muskelmasse und –kraft führt und in einer Sarkopenie resultieren kann. Welche molekularen Mechanismen in der chronischen Pankreatitis die Sarkopenie auslösen bzw. beeinflussen, ist allerdings nicht bekannt.

In dieser Doktorarbeit konnte in zwei verschiedenen experimentellen Modellen der chronischen Pankreatitis in C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, dass die chronische Pankreatitis mit einem Gewichtsverlust und einer Verminderung der muskuloskelettalen Kraft assoziiert sind. Diese Modelle beruhen einerseits auf repetitiven akuten Pankreatitiden, induziert durch das Cholezystokinin-Analogon Caerulein, andererseits auf einer Ligatur des Pankreasganges, die Teile von funktionell aktivem Bauchspeicheldrüsengewebe abhängt. Beide Modelle münden in eine chronische Pankreatitis. Eine Verminderung der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion war jedoch nur im Modell der Caerulein-induzierten Pankreatitis nachweisbar. Wir konnten ferner zeigen, dass sich in der chronischen Pankreatitis die Serumspiegel von pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen verändern, die sich jedoch modellabhängig unterschieden. Untersuchungen im Kleintier-MRT belegten eine signifikante Verminderung des Durchmessers des Quadrizepsmuskels in beiden Modellen. Auf Proteinebene fanden sich im Skelettmuskel von Mäusen mit chronischer Pankreatitis Expressionssteigerungen von *growth differentiation factor 8* (GDF8) und *Muscle RING-finger protein-1* (MuRF1). Auf mRNA Ebene konnten wir zeigen, dass Activin A und das *transforming growth factor β* (TGFβ) in beiden Modellen erhöht waren, wohingegen Follistatin und teilweise auch Inhibin A vermindert waren. Die Anzahl apoptotischer Zellen stieg im Quadrizepsmuskel in beiden Modellen signifikant an, was darauf schließen lässt, dass die Apoptose beim Muskelabbau eine Rolle spielt. Des Weiteren fanden sich in Mäusen mit chronischer Pankreatitis und Sarkopenie Veränderungen des Serummetaboloms und des Stuhlmikrobioms, die jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Modells stark variierten. Modellübergreifend war eine Vermehrung von *Akkermansia* spp. in der chronischen Pankreatitis nachweisbar. Zur weiteren Klärung der Bedeutung der exokrinen Insuffizienz für die Sarkopenie wurden die Experimente unter einer Hochfettdiät, welche die Mäuse vor Induktion der chronischen Pankreatitis erhielten, wiederholt. Es konnte gezeigt werden, dass sich ebenfalls Körpergewicht und Muskelkraft reduzierten, wobei der Gewichtsverlust unter fettangereicherter Diät weniger stark ausgeprägt war, jedoch der Verlust von Muskelkraft im Wesentlichen unverändert war. Analog zu den Versuchen mit normalem Futter kam es auch unter einer fettangereicherten Diät in einem ähnlichen Ausmaß zu einer Reduktion des Quadrizepsdurchmessers sowie Zunahme apoptotischer Zellen im Skelettmuskel. Weiter konnten wir eine Zunahme der GDF8 und MuRF1 Proteinexpression sowie Änderungen von Activin A, Inhibin A, TGFβ und Follistatin nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in beiden Modellen der chronischen Pankreatitis unabhängig von der exokrinen Pankreasfunktion Zeichen einer Sarkopenie entwickeln und diese offenbar über Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie, GDF8 und MuRF1 vermittelt werden.

## 1.1 Summary

Chronic pancreatitis is a common gastrointestinal disease that leads to loss of muscle mass and strength and can result in sarcopenia. It is currently not known which molecular mechanisms trigger or influence sarcopenia in chronic pancreatitis.

In this PhD thesis, it could be shown by two different experimental models of chronic pancreatitis in C57BL/6 mice that chronic pancreatitis is associated with weight loss and a reduction in skeletal muscle strength. These models are based on the one hand on repetitive bouts of acute pancreatitis induced by the cholecystokinin analogue caerulein and on the other hand on a ligation of the pancreatic duct, which detaches parts of the pancreas. Both models lead to morphological signs of chronic pancreatitis, but a reduction in exocrine and endocrine pancreatic function was only detectable in the caerulein-induced pancreatitis model. We were also able to demonstrate changes in both pro- and anti-inflammatory cytokines in serum, which differed depending on the model. MRI studies showed a significant reduction in the diameter of the quadriceps muscle in both models. At the protein level, an increased expression of growth differentiation factor 8 (GDF8) and muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) was found in the skeletal muscle of mice with chronic pancreatitis. We further showed that mRNA expression of activin A and the cytokine transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) were increased in both models, whereas follistatin and inhibin A were decreased. The number of apoptotic cells increased significantly in the quadriceps muscle of mice with chronic pancreatitis, suggesting that apoptosis plays a significant role in muscle breakdown. Furthermore, changes in the serum metabolome and the stool microbiome were found in mice with chronic pancreatitis and sarcopenia, which varied greatly depending on the model used. Multiplication of *Akkermansia* spp. was detectable in chronic pancreatitis. To further clarify whether the exocrine insufficiency is decisively involved in the development of sarcopenia, the experiments were repeated under a high-fat diet, which the mice received before the induction of chronic pancreatitis. It could be shown that there was also a reduction of body weight and muscle strength over the time course: while the weight loss was less pronounced, the loss of muscle strength remained essentially unchanged. By analogy to the experiments with normal food, there was also a significant reduction in quadriceps diameter and an increase in apoptotic cells in the quadriceps under a fat-enriched diet. We were also able to demonstrate an increase of GDF8 and MuRF1 protein expression as well as changes in activin A, inhibin A, TGF $\beta$ , and follistatin mRNA expression. Overall, the results are comparable to those of the standard diet, suggesting that the decrease of muscle size and function on a high-energy diet seem to be independent of exocrine pancreatic function.

In summary, it can be concluded that the muscle breakdown in chronic pancreatitis occurs independently of the exocrine pancreatic function and is apparently mediated by members of the TGF- $\beta$  family, GDF8, and MuRF1.

## 2. Einleitung

### 2.1 Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse, auch als Pankreas bezeichnet (von griechisch pan = „alles“; kreas = „Fleisch“), ist eine länglich konfigurierte und querverlaufende Drüse, welche im oberen Bauchraum lokalisiert ist. Sie wird in drei Segmente unterteilt, den Pankreaskopf (Caput), den Pankreaskörper (Corpus) und den Pankreasschwanz (Cauda). Das Pankreas hat sowohl eine exokrine als auch endokrine Funktion, wobei das exokrine Gewebe etwa 84% des Organgewebes einnimmt [1]. Es produziert Verdauungsenzyme, zu denen kohlenhydrat-, fett- und eiweißspaltende Enzyme wie die Amylase, Lipase, und zahlreiche Proteasen gehören. Funktionell besteht das exokrine Pankreasgewebe aus Drüsenzellen, die auch als Azinuszellen bezeichnet werden [2]. In den Azinuszellen werden die Verdauungsenzyme als inaktive Vorstufe (Zymogene) synthetisiert. Sie werden in sekretorischen Vesikeln, den sogenannten Zymogengranula gespeichert und als Reaktion auf einen hormonellen Stimulus über den Pankreasgang an das Duodenum abgegeben. Dieser Stimulus kann über CCK (Cholecystokinin) oder ACh (Acetylcholin) induziert werden und bewirkt ein oszillierendes intrazelluläres  $Ca^{2+}$  Signal [3]. Die Verdauungsenzyme werden als inaktive Vorstufe synthetisiert und sekretiert, um das Organ vor dem Selbstverdau zu schützen [4]. Eine Ausnahme stellen die  $\alpha$  Amylase und die Pankreaslipase dar, diese beiden Enzyme werden bereits als aktive Form sekretiert [5]. Im Duodenum wird das inaktive Trypsinogen durch die Enterokinase, einer membrangebundenen Enteropeptidase, in aktives Trypsin umgewandelt. Trypsin aktiviert kaskadenartig weitere inaktive Verdauungsenzyme, zu denen Chymotrypsinogen und die Pro-Elastase gehören.

Zur endokrinen Funktion gehören die Synthese und Sekretion von Hormonen, die den Glukosestoffwechsel regulieren und in den Langerhans-Inseln stattfindet. Diese Zellen liegen inselförmig zwischen dem exokrinen Drüsenzellen vor. Funktionell können sie in vier Zelltypen unterteilt werden, und zwar in A-, B-, D- und in PP-Zellen [6]. Zwischen den Zelltypen finden Wechselwirkungen über Rezeptoren statt. Die A-Zellen machen etwa 15 Prozent des endokrinen Anteils aus und bilden das Hormon Glukagon, sobald es zu einer Absenkung des Blutzuckers kommt [7] [8]. Glukagon regt die Bildung von Glukose in Zellen sowie die Freisetzung der Glukose in den Blutkreislauf an, was in einem Anstieg des Blutzuckerspiegels resultiert. Ein erhöhter Blutzuckerwert hingegen hemmt die A-Zellen. Die B-Zellen, auch Betazellen genannt, synthetisieren Insulin [9] [10] [11]. Insulin erhöht die Glukoseaufnahme in die Zellen und senkt dadurch den Blutzucker. Die Betazellen machen etwa 80 Prozent der Langerhans-Inseln aus. Die D-Zellen, welche etwa 5 Prozent ausmachen, bilden das Hormon Somatostatin [12]. Es wird während der Verdauung ausgeschüttet und hemmt die Sekretion exokriner Pankreasenzyme. Die PP-Zellen synthetisieren das pankreatische Polypeptid (PP)

[13]. Dieses hemmt die Ausschüttung von Verdauungssekreten aus dem Pankreas und sorgt für ein Sättigungsgefühl. Die PP-Zellen machen weniger als ein Prozent aus.

## **2.2 Entzündliche Erkrankungen des Pankreas**

### **2.2.1 Akute Pankreatitis**

Die akute Pankreatitis ist eine akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Dabei handelt es sich um eine der häufigsten nicht malignen gastrointestinalen entzündlichen Erkrankungen. Auslöser der akuten Pankreatitis können Gallenwegserkrankungen, wie z.B. eine Obstruktion des Gallengangs durch Gallensteine oder Alkohol sein. In den meisten Fällen verläuft die akute Pankreatitis selbstlimitierend und ohne schwerwiegende Komplikationen. In 10-15 % der Fälle ist die Erkrankung mit lokalen und systemischen Komplikationen und einer erhöhten Mortalität verbunden [14]. Vor mehr als 100 Jahren beschrieb der österreichisch-deutsche Pathologe Hans Chiari, dass die Erkrankung einem proteolytischen Selbstverdau entspricht [15], der durch eine frühzeitige Aktivierung der Verdauungsenzyme und einem daraus resultierenden nekrotischen Zelltod des pankreatischen Gewebes charakterisiert ist. Eine primäre Rolle spielt die Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin, welches weitere Enzyme aktiviert [2]. Ein kleinerer Teil, etwa 5-10 % der akuten Pankreatitiden, sind auf Gallensteine oder Tumoren zurückzuführen [16]. Weiter kann eine akute Pankreatitis durch Traumata, ein Pankreas divisum oder ein Hyperparathyreoidismus ausgelöst werden [17] [18] [19].

### **2.2.2 Chronische Pankreatitis**

Die chronische Pankreatitis ist eine progressiv verlaufende fibroinflammatorische Erkrankung, welche zu einer Zersetzung des endo- und exokrinen Pankreasgewebes und fibrotischer Remodellierung führt [20] [21]. Klinisch äußert sie sich durch chronische abdominelle Schmerzen, welche schubweise wiederkehren oder persistieren können. Eine chronische Schädigung der dukталen, interstitiellen und azinären Zellen resultiert in einer Fibrose bis hin zur Sklerose, welches eine irreversible morphologische Veränderung des Pankreasgewebes bedeutet [22] [23]. Neben der Destruktion des Pankreasparenchyms treten auch Veränderungen der Pankreasgänge im Sinne von Stenosen auf, ferner kann es zur Zystenbildungen (Pseudozysten) oder Vernarbungen des umliegenden Gewebes bis hin zu einer Duodenalstenose kommen. Funktionell führt der Gewebeuntergang zu einem progressiven bzw. endgültigen Verlust der exokrinen und endokrinen Funktion des Pankreas [24]. Der Verlust des endokrinen Gewebes zeichnet sich durch den Zelluntergang der Langerhanschen-Inseln aus, was zu einem pankreopriven Diabetes (Typ 3c) infolge Insulinmangels führen kann [25] [26] [27]. Häufige Ursachen einer chronischen Pankreatitis

sind in Europa ein chronischer Alkohol- und Nikotinmissbrauch. Des Weiteren sind genetische Risikofaktoren bekannt, die zu rekurrierenden akuten Schüben und einer chronischen Pankreatitis beitragen. Zu diesen zählen Gene, die für den Serinprotease Inhibitor Kazal-type 1 (SPINK1) [5], das kationische Trypsinogen (PRSS1) [28] oder das Chymotrypsin C (CTRC) [29] kodieren. Eine hereditäre Pankreatitis kann durch aktivierende Mutationen (engl. gain of function mutation) von PRSS1 ausgelöst werden [30]. Bei der *gain of function* Mutation wird die Aktivität des Gens verstärkt, man spricht dann von einem hypermorphen Allel. Bei SPINK1 sind sogenannte *loss of function* Mutationen bekannt, so dass das Protein infolge einer Fehlfunktion nicht mehr vor einer intrapankreatischen Trypsinogenaktivierung ausreichend schützen kann [31]. Die Folge ist eine Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin.

Die Prävalenz der chronischen Pankreatitis liegt weltweit bei 10/100.000 Einwohnern und die Tendenz ist steigend [32] [33]. Die Gesamtletalität liegt zwischen 28,8-35 % [20] [34] [24]. Im Initialstadium ist die Erkrankung meist asymptomatisch. Als Leitsymptome gelten Oberbauchschmerzen, Fettstühle (Steatorrhö), Gewichtsverlust sowie ein Diabetes mellitus. Ist die Sekretion der Verdauungsenzyme um mehr als 90 % vermindert, tritt eine exokrine Pankreasinsuffizienz ein. Folgen der exokrinen Insuffizienz sind eine Malnutrition, Diarrhoe, Meteorismus und Schmerzen. Die endokrine Insuffizienz beruht vor allem auf dem Mangel an Insulin und bedingt das Auftreten eines pankreopriven Diabetes. Da kausale Therapieansätze fehlen, wird die Pankreatitis lediglich symptomatisch behandelt. Die exokrine Insuffizienz wird mittels Enzymsubstitution und die pankreatischen Schmerzen analgetisch behandelt [35]. Bei der Enzymsubstitution werden als Hauptkomponenten Lipase, Amylase, Trypsin und Chymotrypsin zugeführt. Bestandteil der Therapie der endokrinen Insuffizienz sind Insulin und in einigen Fällen Metformin als orales Antidiabetikum.

Der Gewichtsverlust bei chronischer Pankreatitis ist multikausal. Neben einer Malabsorption infolge der exokrinen Insuffizienz finden sich manchmal Diätfehler bei Patienten mit einseitiger Ernährung, Alkoholismus oder eine verminderte Nahrungsaufnahme als Folge chronischer Schmerzen oder eine Magenausgangstenose [36]. Diese vielfältigen Ursachen unterstreichen, dass Gewichtsverlust und Mangelernährung in der chronischen Pankreatitis von großer Relevanz sind.

### **2.3 Experimentelle Modelle der chronischen Pankreatitis**

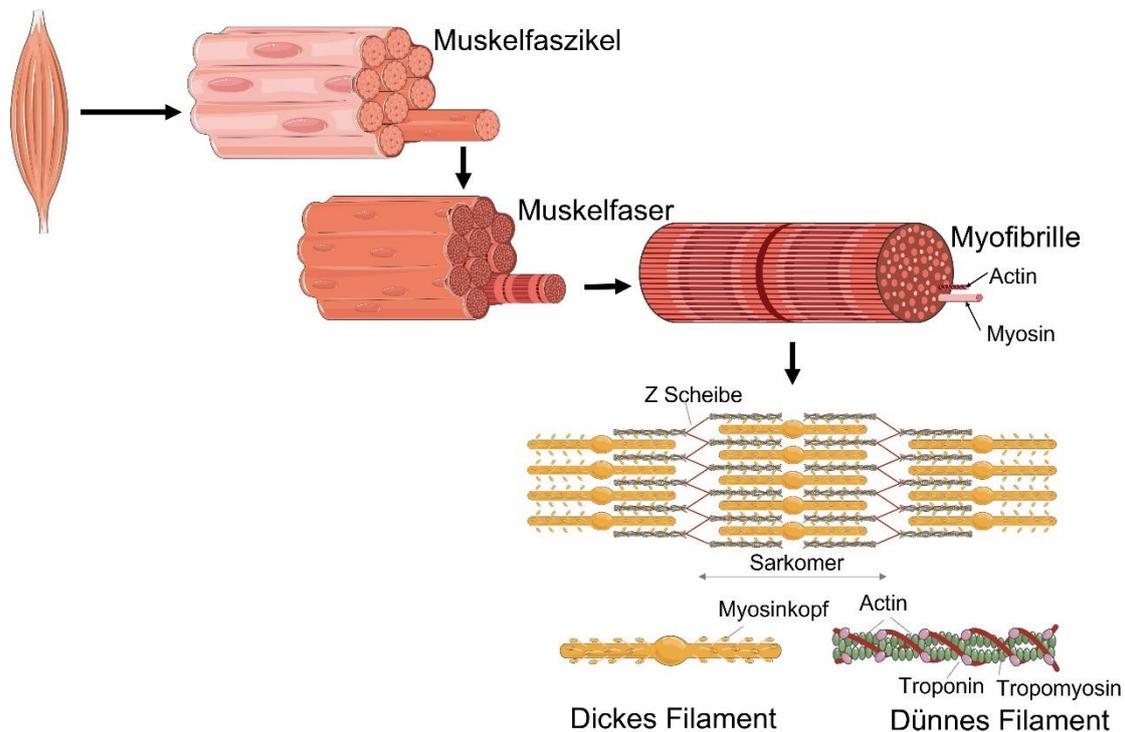
Um sowohl die Pathogenese der chronischen Pankreatitis als auch ihre klinischen Folgen systematisch untersuchen zu können, sind gut charakterisierte tierexperimentelle Modelle notwendig, welche die humane Situation möglichst gut imitieren. Mittlerweile existieren mehrere verschiedene Modelle, die auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen [37]. Die meisten Modelle wurden in männlichen Tieren im Alter von 8 bis 10 Wochen etabliert. Eine chronische Pankreatitis kann im Mausmodell entweder durch operative und pharmakologische Methoden oder als Kombinationen beider ausgelöst werden. Bei der operativen Methode wird in narkotisierten Mäusen der Pankreasgang zwischen Magen- und Zwölffingerdarmlappen ligiert. Am zweiten Tag nach der Ligatur erhalten die Tiere einmalig eine intraperitoneale (i.p.) Injektion mit Caerulein (50 µg/kg/Körpergewicht). Dieser Eingriff führt zu einer nekrotisierenden Pankreatitis in dem ligierten Abschnitt des Pankreas, der zunächst zu einer erhöhten Serumamylase als Marker des akuten Schadens, einer Degeneration von Azinuszellen und schließlich einer Fibrose des betroffenen Pankreassegments führt, [38]. Bei der pharmakologisch ausgelösten Pankreatitis wird Caerulein, ein Cholecystokinin (CCK)-Analogon eingesetzt. Die Dosis liegt dabei 10 bis 100-fach über der physiologischen Dosis und wird i.p. verabreicht [39]. Caerulein kann repetitiv über Stunden oder über Wochen injiziert werden, wobei die verwendeten Protokolle eine große Variation zeigen und sich in Dosis, Intervall und Dauer der Injektionen unterscheiden [40] [41] [42]. Dieses Modell zeichnet sich durch morphologische Veränderungen aus, die mit denen des Menschen vergleichbar sind. Dazu zählen unter anderem eine aberrante Zymogenaktivierung in den Azini, eine Organatrophie, eine Hemmung der Sekretion der Pankreasenzyme sowie eine gesteigerte Inflamationsreaktion im Organ [41] [43]. Neben Caerulein können auch andere Substanzen verwendet werden, wie etwa L-Arginin [44] oder Dibutylzinn-dichlorid (DBTC), wofür ebenfalls Protokolle existieren [45].

## 2.4 Anatomischer Aufbau und Physiologie der Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur ist ein dynamisches und plastisches Gewebe. Beim Menschen macht sie etwa 40 % der Körpergewichtes aus und enthält 50 – 75% aller Körperproteine [46]. Sie ist lebensnotwendig für die körperliche Bewegung, Körperhaltung und die Atmung [47]. Man kann sie in rote und weiße Muskulatur unterteilen. Dabei ist die rote Skelettmuskulatur durch einen erhöhten Gehalt von Muskelfasern gekennzeichnet und ist hauptsächlich für ausdauernde Bewegungen verantwortlich. Die weiße Skelettmuskulatur kontrahiert hingegen schneller und ist für plötzliche und kraftintensive Bewegung zuständig. Weiter beeinflusst sie den Energie-/Proteinstoffwechsel im Körper. Die Muskeln stellen den primären Ort für die Aufnahme und Speicherung von Glukose da [48], weiter dienen sie als Reservoir für Aminosäuren, welche in Form von Proteinen gespeichert werden [49]. Dadurch wird bei chronischen Erkrankungen, welche mit einem erhöhten Stoffwechselbedarf und verringerter Nahrungsaufnahme einhergehen, die Versorgung mit Aminosäuren sichergestellt. Der Verlust von Muskulatur geht mit dem Verlust der Verfügbarkeit von Proteinen und Energie einher und führt zu erhöhter Morbidität und Mortalität.

Ein Skelettmuskel besteht aus mehreren Muskelfaserbündeln, die wiederum aus einzelnen Muskelfasern bestehen und von Bindegewebe umschlossen sind. Umgeben ist der Muskel von Bindegewebe (Epimysium), von welchem Septen in das Innere des Muskels ziehen. Dort umhüllen sie einzelne Muskelfasern (Endomysium) aber auch Gruppen von Muskelfasern (Perimysium). Jede Muskelfaser besteht aus Muskelfibrillen (Myofibrillen), welche sich in Sarkomere unterteilen lassen. Diese bestehen aus den fibrillären Proteinen Myosin und Aktin. Ein Sarkomer wird von den sogenannten Z-Scheiben begrenzt. Aktin bildet die dünnen Filamente, welche über das Ankerprotein Aktinin an der Z-Scheibe verknüpft sind. Die dicken Filamente werden von Myosin gebildet, welche über Titin an der Z-Scheibe verankert sind. Die dicken Myosinfilamente liegen zwischen den Aktinfilamenten. Die Abb. 1 stellt den Aufbau graphisch dar (vereinfacht nach Rave et al [50], [51]). Aktin und Myosin bewirken durch Kontraktion unter Adenosintriphosphat (ATP)-verbrauch eine Bewegung [46]. Man spricht in diesem Zusammenhang von der sogenannten Gleitfilamenttheorie. Sie beschreibt, wie es unter ATP-Verbrauch zu einer Verschiebung der Aktinfilamente durch Myosin kommt, was in einer Muskelkontraktion endet [52] [53]. Die Menge der Skelettmuskulatur hängt vom Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau ab. Beide Prozesse werden vom Ernährungszustand, dem Hormonhaushalt und körperlicher Aktivität beeinflusst. Ebenso können sie sich bei Vorliegen von Krankheiten ändern. Während die Struktur der Skelettmuskulatur durch Muskelfasern und dem assoziierten Bindegewebe gekennzeichnet ist [54], wird die Größe eines Muskels primär durch die Anzahl der Muskelfasern bestimmt. Muskelfasern sind mehrkernig und postmitotisch [55]. Von der Skelettmuskulatur zu

unterscheiden ist die Herzmuskulatur sowie die glatte Muskulatur, letztere ist für Kontraktionen beispielsweise in viszeralen Organen notwendig.



**Abb. 1: Struktur der Skelettmuskulatur (vereinfacht nach Rave et al.)**

Jeder Muskel besteht aus Muskelfaszikeln. Diese können in Mikrofasern unterteilt werden, welche weiter in Myofibrillen gegliedert werden können. Die Mikrofibrillen lassen sich in Sarkomere unterteilen, dieses setzen sich zusammen aus dicken und dünnen Filamenten, welche aus Aktin und Myosin bestehen (c).

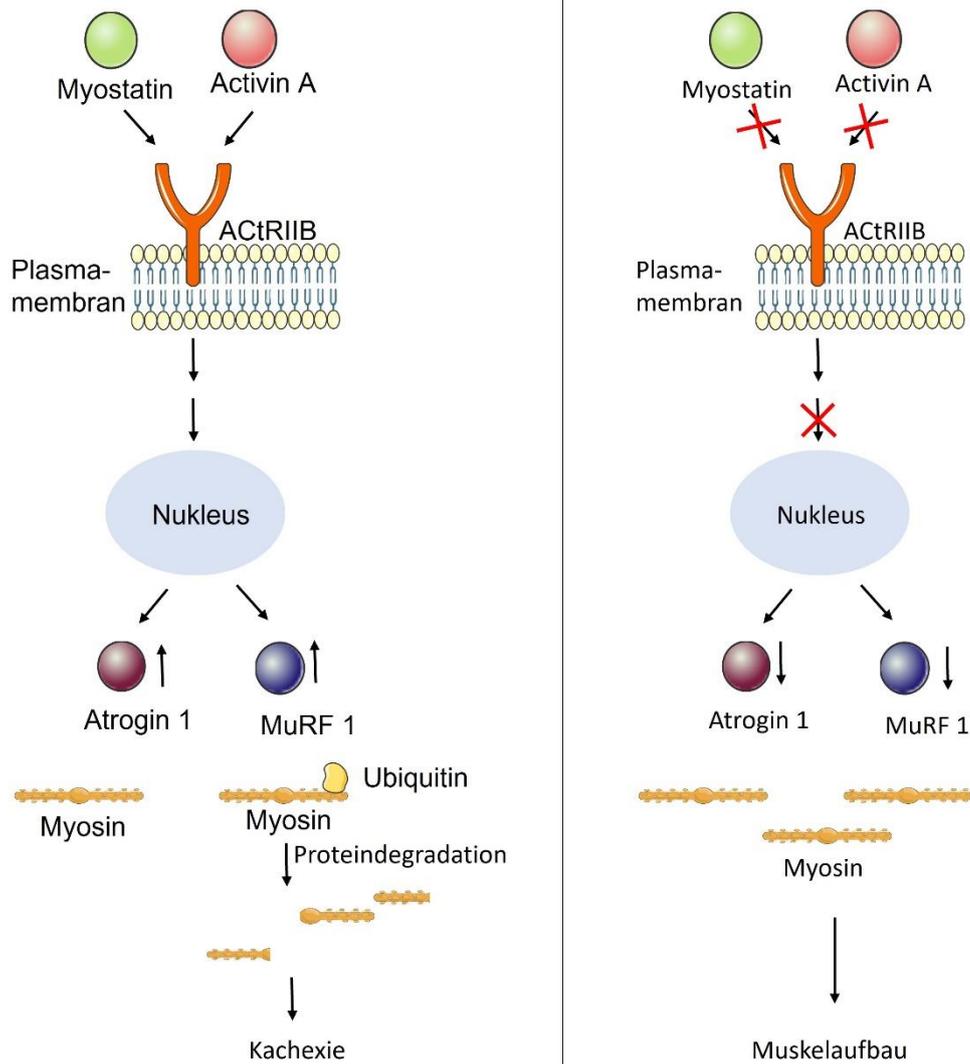
## 2.5 Sarkopenie und Malnutrition

Der Begriff Sarkopenie wurde erstmals von Irwin H. Rosenberg verwendet und entstammt aus den griechischen Wörtern *sarx* für Fleisch und *penia* für Verlust. Er bezog sich ursprünglich auf den Verlust von fettfreier Körpermasse mit zunehmendem Alter. [56] [57]. Der Begriff hat sich im Laufe der Zeit erweitert und umfasst heute das Vorhandensein von geringer Muskelmasse und Muskelschwäche und/oder eingeschränkter Leistungsfähigkeit, die durch den Verlust von Muskelmasse und Kraftstörungen gekennzeichnet ist [58] [59]. Malnutrition, auch Mangelernährung genannt, wird als Zustand definiert, wenn das Körpergewicht über oder unter dem normalen Standard liegt [60]. Somit wird ein Ungleichgewicht bei der Aufnahme von Energie oder Nährstoffen beschrieben. Eine Sarkopenie ist mit vielen chronischen Erkrankungen assoziiert. Bei Tumorerkrankungen wird ihre Prävalenz mit 26-47 % angegeben [61] [62]. Für Patienten mit einer chronischen Erkrankung beträgt die Prävalenz 10-49 % [63] [64] [65]. Zahlreiche Patienten mit chronischer Pankreatitis leiden an ungewolltem Gewichtsverlust und zeigen Anzeichen einer Mangelernährung, die in bis zu 39 % der Fälle beobachtet werden [66] [67]. Die zugrunde liegenden Ursachen sind multifaktoriell und

umfassen unter anderem eine Malabsorption infolge einer exokrinen Pankreasinsuffizienz (pancreatic exocrine insufficiency, PEI), Appetitlosigkeit aufgrund chronischer Bauchschmerzen, anatomische Veränderungen wie eine Duodenalstenose mit Nahrungsretention und ernährungsbedingtes Fehlverhalten, zu dem ein Alkohol- und Nikotinmissbrauch zählen. Ein fortgeschrittenes Alter, entweder in Kombination mit einer chronischen Pankreatitis oder auch allein, stellt einen weiteren Risikofaktor für die Mangelernährung dar [68] [69]. Schwere Formen der Unterernährung führen zur Sarkopenie. Sarkopene Patienten haben ein deutlich erhöhtes Risiko für einen komplikativen Krankheitsverlauf. So haben diese Patienten eine verzögerte Genesung, eine verlangsamte Wundheilung mit reduziertem Ruheumsatz und eine verminderte Lebensqualität. Diese Faktoren verursachen eine Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes und bedingen letztendlich erhöhte Gesundheitskosten. Die Prävalenz der Sarkopenie wird auf 17-62 % der Patienten mit chronischer Pankreatitis geschätzt [70].

## 2.6 Molekulare Mechanismen bei Sarkopenie

Die molekularen Mechanismen der Sarkopenie bei chronischen Krankheiten sind noch nicht gut verstanden. Die Erhaltung von funktionellem Muskelgewebe ist ein regulierter Prozess, welcher aus einer ausgewogenen Synthese und dem Abbau von Muskelproteinen besteht. Bei der Sarkopenie findet sich ein Ungleichgewicht zugunsten des Abbaus von Muskeleiweißen mit Folge eines Muskelschwunds [71]. Untersuchungen in Muskelgeweben bei krebsassoziiertes Sarkopenie konnten einen Zusammenhang zwischen Mitgliedern der TGF $\beta$ -Familie wie Growth Differentiation Factor 8 (GDF8, syn. Myostatin), Activin-A [72], und dem Abbau der Skelettmuskulatur aufzeigen[73]. Myostatin und Activin A binden an Activin Typ 2 Rezeptoren (ACtRIIB), welche auf der Plasmamembran lokalisiert sind. Diese Bindung löst eine Phosphorylierung von SMAD2 (engl. mothers against decapentaplegic homolog 2) und eine Dephosphorylierung von FOXO3a (engl. forkhead box protein O3) aus. FOXO3a aktiviert im Nukleus die Expression muskelspezifischer Proteine wie Atrogin 1 (engl. F-box only protein 32) und MuRF (muscle RING-finger protein). Diese beiden Ubiquitinligasen stimulieren die Degradation von Myosin, was in einen Abbau von Muskelgewebe und Kachexie resultiert (Abb. 2 links). Wenn Myostatin und Activin nicht an den Rezeptor binden, kann FOXO3 nicht die Expression der Ubiquitinligasen aktivieren und die Aktivitäten von Atrogin 1 und MuRF1 vermindern sich. Daraus resultieren eine Zunahme an Myosin und ein Muskelaufbau (Abb. 2 rechts).

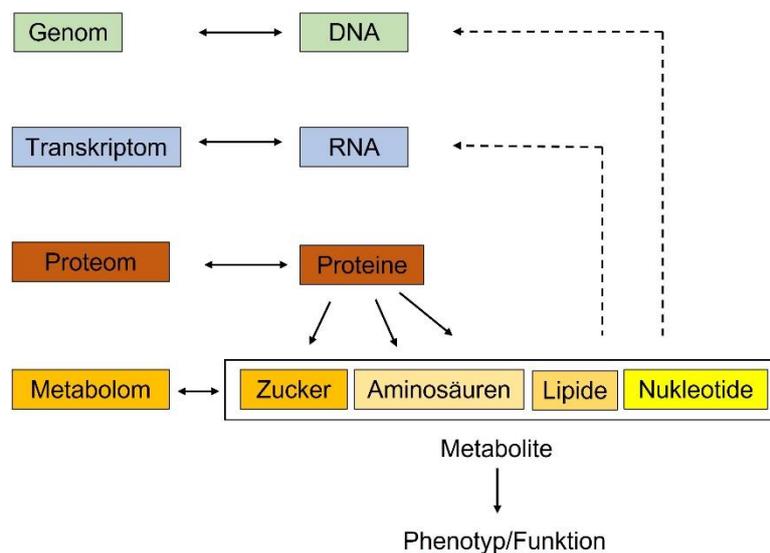


**Abb. 2: TGF- $\beta$  vermittelte Signalwege der Kachexie in Mäusen.**

Links: Myostatin und Activin A binden an den Activin Typ 2 Rezeptor (ACtRIIB), daraus resultieren Phosphorylierungsschritte (nicht dargestellt). Im Nukleus wird die Expression von Atrogin 1 und MuRF 1 induziert. Myosin wird ubiquitiniert und degradiert. Es entwickelt sich eine Kachexie im Muskel. Rechts: Bei fehlender Bindung von Myostatin und Activin A kommt es zu einer Abnahme von Atrogin 1 und MuRF 1. Dies führt zu einem Anstieg an Myosin und dadurch zum Muskelaufbau. Vereinfacht nach Tisdale et al. 2010

## 2.7 Interpretation molekularer Veränderungen durch „Omics“-Analysen

Alle lebenden Systeme haben als gemeinsames Merkmal eine sogenannte dynamische Homöostase. Dieser Begriff beschreibt den Zustand des Gleichgewichts, welcher durch interne Prozesse aufrechterhalten wird. Das bedeutet weiter, dass sich ein Organismus mit der Zeit ändert, wenn er externen Stimuli ausgesetzt ist. Um diese komplexen und dynamischen Änderungen lebender Systeme zu untersuchen bzw. zu verstehen, wird ein integraler, ganzheitlicher Ansatz genutzt, welcher als Systembiologie bezeichnet wird [74]. Dieser Ansatz umfasst verschiedene „Omic“-Bereiche wie etwa Genomik, Proteomik, Metabolomik, welche die Veränderungen im Genom, dem Proteom bzw. dem Metabolom erfassen. Die Abb. 3 gibt einen Überblick über einzelne „Omics“-Teilbereiche.



**Abb. 3: Übersicht über einzelne Bereiche von „Omics“-Analysen.**

Während die Genomik die Gesamtheit des Genoms eines Organismus untersucht, erfasst das Transkriptom die gesamten in RNA transkribierten Gene und die Proteomik die Analyse der gesamten zellulären Proteine. Das Ausgangsmaterial ist je nach Analyse verschieden und umfasst, DNA, RNA sowie Proteine einer biologischen Probe.

### 2.7.1 Metabolom

Die Metabolomik wurde erstmalig von Fiehn im Jahr 2001 [75] als „umfassende und quantitative Analyse aller Metaboliten in einem System“ beschrieben. Die moderne Metabolomik ist somit eine systematische und umfassende Identifizierung und Quantifizierung von niedermolekularen Metaboliten (<1500 Da) in einem biologischen System zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Größe und Zusammensetzung des humanen Metaboloms ist jedoch aktuell nicht vollständig definiert. Zugängliche Datenbanken, die Informationen über Metabolite liefern, werden laufend aktualisiert und erweitert. [76]. Das metabolische „Profiling“

ist ein zielgerichteter Ansatz, welcher sich auf die Identifizierung und Quantifizierung von bestimmten Gruppen von Metaboliten (z.B. Aminosäuren, organische Säuren und Teile von Stoffwechselwegen) konzentriert [77]. Dieser Ansatz geht davon aus, dass es zu Änderungen des Metabolomprofils als Reaktion auf exogene Veränderungen bzw. Eingriffe kommt. Da die Metabolite verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen, werden zahlreiche Analyseverfahren wie etwa die Massenspektrometrie mit unterschiedlichen Trennverfahren und die Kernspinresonanz zur Messung genutzt [78] [79]. Blutplasma kann viele Informationen über physiologische und pathophysiologische Bedingungen eines Systems liefern. Es ist eine relativ leicht zugängliche Bioprobe, so dass sie zur Früherkennung von Krankheiten bzw. deren Verlauf genutzt werden kann [80]. Somit können neue Marker verschiedener Erkrankungen bzw. Zustände des jeweiligen biologischen Systems identifiziert werden. Sowohl humane als auch tierexperimentelle Studien konnten Zusammenhänge zwischen Sarkopenie und Veränderungen des Metaboloms nachweisen. Eine Studie bei Kindern mit Typ 1 Diabetes zeigte unter anderem Veränderungen für Glukose, Mannose, Serin, Succinylcarnitin, Prolin, Glutamin und Isoleucin [81]. Eine weitere Studie zeigte bei weiblichen Probandinnen aus Großbritannien mit geringer Körpermasse unter anderem Unterschiede für Glutamate, Mannose, Valin, Isoleucin und Leucin [82]. Für Patienten mit Pankreas- und periampullärem Adenokarzinom wurden Unterschiede für Diacylglycerine, Alanine, Histidin, und Asparaginsäure nachgewiesen [83]. In tumortragenden Ratten mit und ohne Sarkopenie wurde gezeigt, dass die sarkopenen Tiere erhöhte Serumwerte für einige Aminosäuren, Citrat, Dimethylamin und Pyruvat aufwiesen, welches auf eine katabole Stoffwechselsituation mit erhöhter Muskelproteindegradation hindeutet [84]. Bei der Untersuchung von Probanden über einen Zeitraum von 5 bis 10 Jahren konnte gezeigt werden, dass das Altern Einfluss auf das Plasmametabolom hat [85]. Es zeigten sich unter anderem Änderungen für Oxalacetat, Ascorbat, Selenohomocystein, Pantothersäure und Phosphat. In Mausmodellen mit einem Kolontumor fanden sich erhöhte Spiegel von Carnitin, Oxalsäure und Lysin, wohingegen Serin, Pyroglutaminsäure, Glycin und Asparaginsäure reduziert waren [86]. Eine Studie bei Patienten mit Stadium 1 oder 2 einer chronischen Nierenerkrankung konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg von lysoPC (16:0), Kreatinin und Phenylalanin kommt [87]. Bei der Untersuchung von Patienten mit Morbus Parkinson zeigten sich unter anderem Änderungen für Lysin, Pipecolinsäure, Histamin, asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) sowie Phenylalanin [88]. Alle genannten Studien zeigen, dass es abhängig von der chronischen Erkrankung zu Veränderungen im Metabolom kommt.

## 2.7.2 Mikrobiom

Unter dem Begriff Mikrobiom versteht man die Gesamtheit aller mikrobieller Organismen sowie ihrer Gene. Als Mikrobiota wird dagegen primär die Gesamtheit aller Mikroorganismen in einem System bezeichnet. Die Zusammensetzung der Mikrobiota hängt unter anderem vom Organismus selbst, der Ernährung, dem allgemeinen Lebensstil, der Geographie, einer bestehenden Medikation oder einer bestehenden Krankheit ab [89] [90]. Das Humane Mikrobiom Projekt (HMP), welches 2007 initiiert wurde, zielt auf die Bestimmung der Zusammensetzung des Mikrobioms in bestimmten Körperregionen wie z.B. dem Mund, dem Rachen, dem Magen und Darm ab [91] [92]. Die mikrobielle Besiedlung des Darms beginnt unmittelbar nach der Geburt, wobei die Zusammensetzung sich anfangs mehrfach verändert und im jugendlichen und Erwachsenenalter relativ stabil wird [93]. Im höheren Alter können wieder Veränderungen des Mikrobioms eintreten [94]. Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms hängt sowohl von endogenen als auch exogenen Einflüssen ab [95]. Für die Untersuchung des Mikrobioms stehen mehrere Sequenzierungsmethoden zur Verfügung. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden zählen die Pyrosequenzierung, die Ion-Torrent Sequenzierung und die Illumina Sequenzierung. Die 16s RNA Sequenzierung dient der Identifizierung von Bakterienisolaten durch Amplifikation speziesspezifischer Regionen der 16S ribosomalen RNA [96]. Die 16s-rRNA ist eine Komponente der 30s Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms. Sie enthält neun hochvariable Regionen, welche als V1-V9 bezeichnet werden und die sich zwischen einzelnen Bakterienstämmen deutlich unterscheiden [97]. Anhand von Korrelationen können dadurch Rückschlüsse auf Taxonomie, Gattung und Art gezogen werden [98]. Die Hypothese der Darm-Muskel-Achse (engl. gut muscle axis) postuliert, dass ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota und der Funktion bzw. Pathophysiologie von Organen, im Besonderen der Muskulatur existiert [99]. Die Hypothese beruht darauf, dass in Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass bei Sarkopenie die Biodiversität des Mikrobioms vermindert ist und vermehrt pro-inflammatorische Bakterien im Darm nachweisbar sind [100] [101] [102]. In Humanstudien bei Patienten mit verschiedenen chronischen Erkrankungen fanden sich Veränderungen in der Komposition des Darmmikrobioms [103] [104], so dass vermutet wird, dass die intestinale Dysbiose sich auf die Pathophysiologie der Organe auswirkt. Bei Patienten mit Leberzirrhose waren im Stuhl Proteobakterien, Klebsiella und Streptococcus gegenüber Gesunden erhöht [105]. Weiter wird beschrieben, dass die Diversität an Bakterien sich bei Zirrhosepatienten mit Sarkopenie gegenüber Zirrhosepatienten ohne Sarkopenie relativ verringert ist. Patienten mit Sarkopenie zeigten eine verringerte Häufigkeit von Prevotella, Methanobrevibacter und Akkermansia Spezies. Patienten mit chronischer Pankreatitis weisen eine reduzierte mikrobielle Diversität und eine Vermehrung pathogener Bakterien wie etwa Enterococcus, Escherichia und Shigella auf [106]. In gesunden Probanden mit verminderter Stuhlelastase

finden sich ebenfalls Veränderungen im Darmmikrobiom. So wurden vermehrt Bacteroides, Flavonifractor und Barnesiella nachgewiesen, dagegen waren Prevotella und Collinsella vermindert [90]. Es wird vermutet, dass dieses Ungleichgewicht der Darmflora zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Darmwand führt. Daraus resultiert, dass Bakterien oder bakterielle Stoffwechselprodukte in den Kreislauf gelangen und Entzündungsreaktionen fördern [107].

### **3. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung von Muskelverlust und Sarkopenie in der chronischen Pankreatitis zu charakterisieren und die zugrunde liegenden zellulären und biochemischen Veränderungen zu identifizieren. Zur Beantwortung dieser Fragen sollen zwei experimentelle Mausmodelle für die chronische Pankreatitis verwendet werden, die auf verschiedenen pathogenetischen Stimuli beruhen. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Modelle soll zudem klären, ob die Mechanismen der Sarkopenie-Entstehung modellunabhängig sind und übergreifende pathophysiologische Wege erkennbar sind. Ferner soll untersucht werden, inwieweit im experimentellen Modell der chronischen Pankreatitis Zusammenhänge zwischen der Sarkopenie und Veränderungen des Stuhl-Mikrobioms und des Serum-Metaboloms erkennbar sind und sich möglicherweise gemeinsame Signaturen bei sarkopenen Mäusen ableiten lassen. Diese Arbeiten sollen ein tieferes Verständnis für die Pathogenese der Sarkopenie bei der chronischen Pankreatitis liefern, die Ausgangspunkt für mögliche zukünftige therapeutische Ansätze sein können.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmittel

<b>Laborgeräte und Verbrauchsmittel (in alphabetischer Ordnung)</b>	<b>Hersteller</b>
384 Well Mikrotiterplatte	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, Deutschland)
96 Well Rundbodenplatte	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Blutzuckermessgerät OneTouch Select Plus	OneTouch (High Wycombe, Großbritannien)
Cryo-Mikrotom	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Deckgläser	R. Langerbrink (Emmendingen, Deutschland)
Drucksensor Atemfrequenz	Bruker (Massachusetts, USA)
Eismaschine	Manitowoc Company Inc. (Manitowoc, USA)
Elektrophorese	PeqLab (Erlangen, Deutschland)
Entwicklungsgerät	Alpha Innotech (Californien, USA)
Gelkammer Agarosegel	Bio-Rad Laboratories, Inc. (California, USA)
Heizblock	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Heraeus Pico 21	Thermo Fisher Scientific INC. (Waltham, USA)
Hochfettfutter	ssniff (Soest, Deutschland) NPoJ5-040
Käfigwaschmaschine	HOBART (Offenburg, Deutschland)
Kanülen	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Kryoröhrchen	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Kryoröhrchen 4ml	Carl ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Magnetrührgerät RFT	IKA (Staufen, Deutschland)
Mastercycler EP S Thermal Cycler	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Membran	Amersham (Freiburg, Deutschland)
Micro-Hämatokrit-Kapillaren	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Microvette Li-Heparin	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroplattenlesegerät SpectraMax 190	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Mikroskop Olympus FLUOVIEW FV1000	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Mikrotom	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Mikrowelle	Candy (Brugherio, Italien)
Millipore Wasser Aufbereitung	Merck (Darmstadt, Deutschland)

MRT	Bruker (Massachusetts, USA)
Nahtmaterial, Mariderm blau	Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)
Nahtmaterial, Polyester, weiß, unbeschichtet	Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)
Objektträger	R. Langerbrink (Emmendingen, Deutschland)
OP-Besteck	Carl ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Pertischalen	Merck (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter HI2211 Basic	Hanna Instruments (Woonsocket, USA)
Photoimager	Alpha Innotech Cell Biosciences (San Leandro, Ca, USA)
Photometer, SPECTRAMax Plus384	Moleculas Devices
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µl	Carl ROTH (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen 1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 200 µl	Grainer bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettierhilfe accu-jet®	BRAND (Wertheim, Deutschland)
Qiagen Tissue lyser	Qiahen (Hilden, Deutschland)
QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR Instrument	Thermo Fisher Scientific INC. (Waltham, USA)
QuantStudio™ 7 Flex system	Thermo Fisher Scientific INC. (Waltham, USA)
Reaktionsgefäß (15 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäß (50 ml)	Flacon (Amsterdam, Niederlande)
Reaktionsgefäße (0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Schüttelwasserbad SW22	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Schüttler	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Schüttler, UniTwist	UniEquip (Planegg, Deutschland)
Serologische Pipetten (5 ml/10 ml/25 ml)	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Slide Scanner	Systemex Corporation (Köbe, Präfektur Hyogo, Japan)
Sprout, Microcentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, USA)
Standardfutter	ssniff (Soest, Deutschland) V1126-000
Stoffwechselkäfige	Techniplast (Buguggiate VA, Italien)
Teststreifen OneTouch Select Plus	OneTouch (High Wycombe, Großbritannien)
Tissue.Tec	Sakura (Staufen, Deutschland)
Transfergerät	Bio-Rad Laboratories, Inc. (California, USA)
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin (Berlin, Deutschland)

Vortexer MS2 Minishaker	IKA (Staufen, Deutschland)
Waage: Adventurer® balance Ohaus® ARA520	OHAUS (Greifensee, Schweiz)
Waage: Sartorius mc1 AC120S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Wägegäler mit NS-Deckelstopfen	Lenz-Laborinstrumente (Wertheim, Deutschland)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

#### 4.1.2 Reagenzien und Kits

Reagenzien und Kits	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Amyl-Kit	Roch (Basel, Schweiz)
ApopTag® Red (Apoptosis Detection Kit)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
CaCl <sub>2</sub>	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Caerulein	Bachem Holding AG (Budendorf, Schweiz)
CBA Mouse Inflammation Kit	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Chloroform	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
DNA Miniprep	ZymoBIOMICS (Californien, USA)
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Einbettmedium	Sakura Tissue Tek® (Staufen, Deutschland)
Eosin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethanol absolut	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Fast digest green buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
First-Strand Puffer (5x)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

Fluorescence mounting medium	Agilent Dako (Santa Clara, USA)
Formaldehyd 4,5%; pH7	UniApotheke (Greifswald, Deutschland)
Fötales Kälberserum	GIBCO®, Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerol	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Gumtragacanth	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Hba1C ELISA Kit	BioVision (Ilmenau, Deutschland)
Hexacetyltrimethylammoniumbromid	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
HPLC Wasser	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Isofluran	CP-Pharma (Burgdorf, Deutschland)
Isopropanol	CHEMSOLUTE®, Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland)
Ketamin	Selectavet r. Otto Fischer GmbH (Weyarn, Deutschland)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
KOH	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Lip-Kit	Roch (Basel, Schweiz)
Metamizol	MSD Animal Health, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Methylbutan	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
MxP® Quant 500 Kit	Biocrates life sciences AG (Innsbruck, Österreich)
NaCl	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl 0,9%	Braun (Melsungen, Deutschland)
O-dianisidine	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Oligo dT	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PageRuler prestained	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
PCR Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
peqGold 1 100 bp DNA-ladder	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Ponceau S	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Random Primer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RNase OUT™ Recombinant	Progema (Madison, USA)
Ribonuclease Inhibitor (40 U/μl)	
Roti Block	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)
SuperSignal Detection Kit	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
SYBR™ green PCR master mix	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
TEMED	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Thymol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Tissue Freezing Medium	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100	Ferak Berlin GmbH (Berlin, Deutschland)
Tween® -20	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Xylase	Selectavet r. Otto Fischer GmbH (Weyarn, Deutschland)
XyloI	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit	Zymo Research (Irvine, USA)
β-mercaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

### 4.1.3 Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
Agarose Gel	Agarose	1; 1,5; 2%
	Ethidiumbromid	1,78 µM
	1x TAE Buffer	
Anti-Digoxigenin Konjugat Lösung	Blockierlösung	68 µl
	Anti-Digoxigenin Konjugat	62 µl
Blockierlösung SDS Page	NET	1x
	Gelatine	0,2%
Blockierlösung SDS Page	RotiBlock	1:10
Laemmli Puffer 2x	Tris-HCl (1M, pH 6,8)	125mM
	SDS	4 %
	Glycerol (50%)	30 %
	Bromphenolblau	0,01 %
Lysis Puffer 1x	2x Lysispuffer	5 ml
	NaF	10 mM
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	5 mM
	PMSF	1 mM
	Aprotinin	1 µg/ml
	ddH <sub>2</sub> O	ad 10 ml
Lysis Puffer 2x	HEPES (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	1 %
	EDTA (pH 8)	2 mM
	ddH <sub>2</sub> O	ad 10 ml
MPO Extraktionspuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	Hexadecyltrimethylammoniumbromid	0,5 %
	pH 6,0 (einstellen mit KOH)	
	H <sub>2</sub> O	
MPO-Homogenisierungspuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
	H <sub>2</sub> O	
	pH 7,4 (einstellen mit KOH)	

MPO-Messpuffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
	O-dianisidine	0,53 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,21 %
	H <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH 6,0 (einstellen mit KOH)	
NET 10x	NaCl	1,5 M
	EDTA (pH 8)	50 mM
	Tris.HCl (pH 7,5)	0,5 M
	Titon X-100	0,5%
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
PBS 10x	NaCl	1,4 M
	KCl	27 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O frei)	1,5 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	71 mM
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH 7,4	
Ponceau S	Ponceau S	3 mM
	TCA (50 %)	40 ml
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
Sammelgel	Acrylamid (30%)	3 %
	Tris (1,5 M, pH 6,8)	125 mM
	SDS (10%)	0,5 %
	Ammoniumpersulfat (10%)	0,5 %
	TEMED	0,05 %
	H <sub>2</sub> O	
Stopp/Wasch-Lösung	Stopp/Wasch Puffer	1 ml
	H <sub>2</sub> O	34 ml
TAE (10X)	Tris	0,4 M
	EDTA (pH 8,0)	10 mM
	Essigsäure	0,2 M
	H <sub>2</sub> O	ad 1 L
TBST (10x)	Tris	200 mM
	NaCl	1500 mM
	Tween 20	0,1 %
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L
	pH 7,6	

TCA	Trichloressigsäure ddH <sub>2</sub> O	50 % ad 500 ml
TdT Enzym-Lösung	Reaktionspuffer TdT Enzym	77 µl 33 µl
Towbin Puffer 10x	TRIS Glycin Methanol pH 8,6	0,25 M 1,92 M 20%
Trenngel	Acrylamid (30%) Tris (1,5 M, pH 8,8) SDS (10%) Ammoniumpersulfaft (10%) TEMED H <sub>2</sub> O	10, 15 % 370 mM 0,1% 0,1 % 0,05 %
Tris-Glycin-SDS 10x	Tris Base Glycin SDS ddH <sub>2</sub> O	250 mM 1,92 M 1% ad 1 L

#### 4.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

Primer	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'
5s	GCCCGATCTCGTCTGATCTC	GCCTACAGCACCCGGTAT TC
Follistatin (Fst)	AAAACCTACCGCAACGAATG	TTCAGAAGAGGAGGGCTCTG
Inhibin α	CTCCCAGGCTATCCTTTTCC	TGGCCGGAATACATAAGTGA
Inhibin βA	GATCATCACCTTTGCCGAGT	TGGTCCTGGTTCTGTTAGCC
MuRF1	GCCAATTTGGTGCTTTTTGT	AAATTCAGT CCTCTCCCCGT
TGFβ	CGAAGCGGACTACTATGCTAAA	TCCCGAATGTCTGACGTATTG

#### 4.1.5 Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
$\alpha/\beta$ Tubulin	Kaninchen	CellSignalling (Danvers, USA)
GDF8	Kaninchen	Biorbyt (Cambridge, England)
MuRF1	Maus	Santa Cruz (Dallas, TX, USA)
Activin A	Kaninchen	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
sc71	Maus	DSHB (Iowa, USA)
BFF3	Maus	DSHB (Iowa, USA)
BAD5	Maus	DSHB (Iowa, USA)
4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	-	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)

#### 4.1.6 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Mouse HRP-Conjugated	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
Anti-Rabbit HRP-Conjugated	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)

#### 4.1.7 Software

Software	Hersteller
Alpha Innotech	Alpha Innotech Cell Biosciences (San Leandro, CA, USA)
CaseViewer 2.4	Sysmex GmbH (Norderstedt, Deutschland)
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
HOROS™	Horos Project
Inkscape	Inkscape Community
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft PowerPoint 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Zotero	Roy Rosenzweig Centers (Virginia, USA)

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Tierhaltung**

Für die tierexperimentellen Versuche wurden männliche C57BL/6 Mäuse im Alter von 8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden von Charles River bezogen, bei Lieferung sind die Tiere spezifiziert pathogenfrei (SPF). Die Haltung und Durchführung der Experimente erfolgten in der Zentralen Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere (ZSFV) sowie im Forschungscluster III der Universitätsmedizin Greifswald. Die Gruppengröße betrug maximal 5 Tiere. Die Mäuse wurden in klimatisierten Räumen und in ventilierten Käfigschränken mit Makrolonkäfigen (Typ III) mit einem 12 Stunden hell-dunkel Rhythmus gehalten. Allen Tieren stand Futter (Firma Ssniff) und angesäuertes Tränkwasser ad libitum zur Verfügung. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF 7221.3-1-070/18) genehmigt und entsprechend den Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

### **4.2.2 Diäten**

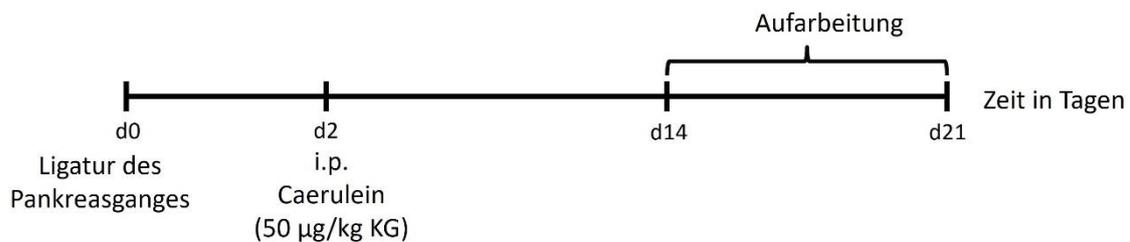
Tiere, die eine „Normaldiät“ erhielten, wurden mit dem Maus-Zucht Extrudat Alleinfuttermittel für Mäuse (& Ratten) – „fortified“ (V1126-000) gefüttert. Die Gruppe, welche die Hochfett diät erhielt, wurden mit dem Hochenergie Maus Alleinfutter (NPoJ5-040) für Mäuse gefüttert, welches mit 11 % Fett doppelt so viel Fett gegenüber dem Standardfutter enthält. Beide Futtermittel wurden von der Firma Ssniff bezogen.

### **4.2.3 Experimentelle Modelle der Chronischen Pankreatitis**

#### **4.2.3.1 Ligatur-Modell**

Eine chronische Pankreatitis wurde durch Ligatur des Pankreasganges oberhalb der Mündung des Gallenganges in den Pankreasgang, sowie einmaliger intraperitonealer Injektion von Caerulein (50 µg /kg Körpergewicht) induziert [38]. Die Ligatur erfolgte unter Vollnarkose, die durch Ketamin Hydrochlorid (100 mg/kg i.p.) und Xylazin Hydrochlorid (5-10 mg/kg i.p.) induziert wurde. Das Abdomen wurde mit einer 1 cm breiten, queren Laparotomie geöffnet. Das Pankreas wurde freigelegt und der Gang mit einem Faden (4/0 DS19, nicht resorbierbarer PVDF Faden) ligiert. Anschließend wurde das Abdomen mit einer zweischichtigen Naht (Polyester) verschlossen. Schmerzmittel wurden über das Tränkwasser verabreicht (Metamizol 2 mg/ml Tränkwasser). Für die Sham operierten Tiere wurde wie beschrieben verfahren, jedoch wurde das Pankreas nicht abgebunden. Die Tiere wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich ihres Verhaltens (Körperhaltung, Bewegung und Nahrungsaufnahme) beobachtet. Zwei Tage nach der Operation erfolgte eine einmalige intraperitoneale Gabe von

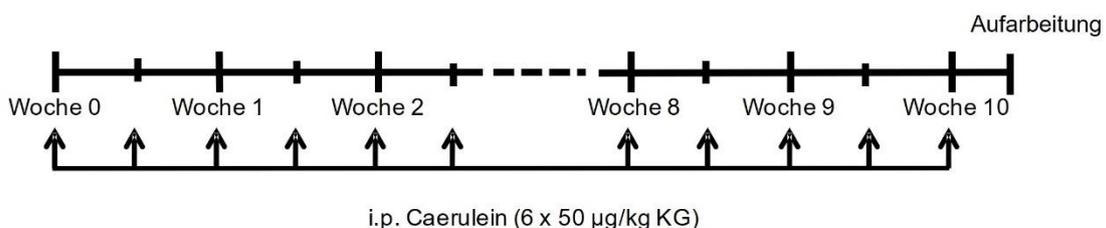
Caerulein (50 µg/kg Körpergewicht). Tiere, deren Verhalten auf starke Schmerzen hindeutete, wurden gemäß den Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Die Aufarbeitung fand 14 bzw. 21 Tage nach der Operation statt. Die folgende Abbildung illustriert den Versuchsablauf.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes des Ligatur-Modells.**

#### 4.2.3.2 Repetitives Caeruleininjektions-Modell

Die chronische Pankreatitis wurde durch 6 intraperitoneale Injektionen von 50 µg Caerulein pro kg Körpergewicht in stündlichen Intervallen induziert. Die Injektionen erfolgten zweimal wöchentlich in gleichen Abständen über insgesamt 10 Wochen [41]. Schmerzmittel wurden über das Tränkwasser verabreicht (Metamizol 2 mg/ml Tränkwasser). Caerulein ist ein CCK Analogon und führt bei wiederholter Gabe zu einer Sekretionsblockade mit intrazellulärer Aktivierung von Proteasen. Dadurch wird eine akute Pankreatitis ausgelöst, die über den Zeitraum von 10 Wochen in eine chronische Pankreatitis mündet. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend i.p. Injektionen mit PBS. Die Tiere wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich ihres Verhaltens (Körperhaltung, Bewegung und Nahrungsaufnahme) beobachtet. Tiere, deren Verhalten auf starke Schmerzen hindeutete, wurden gemäß den Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Die Aufarbeitung der Tiere erfolgte zwei Tage nach der letzten Caerulein-Injektion an Tag 72.



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes des repetitiven Caeruleininjektions-Modells.**

#### 4.2.4 Messung der skelettalen Muskelkraft

Um die Kraft der Tiere zu ermitteln, wurde das Bioseb Grip test Version 3 (BIO-GS3) verwendet. Die maximale Greifkraft der Tiere wurden zweimal pro Woche ermittelt. Das Gerät wurde horizontal positioniert, die Tiere am Schwanz gehalten und in Richtung des Gerätes abgesenkt. Die Tiere griffen mit den vorderen Extremitäten ein Metallgitter und wurden dann in einer horizontalen Ebene von Gerät weggezogen. Die Kraft, welche auf das Gitter ausgeübt wurde, bevor die Tiere die Haftung verloren, wurde als maximale Greifkraft aufgezeichnet. Jedes Tier wurde pro Zeitpunkt dreimal vermessen.

#### 4.2.5 Asservation von Blut und Organen

Entsprechend der jeweiligen Zeitpunkte wurden die Tiere mit einer Sevofluran Inhalationsnarkose narkotisiert und das Blut entnommen. Das Blut wurde in einem Serum- bzw. EDTA-Röhrchen nach Herstellerangaben abzentrifugiert. Die Proben wurden abgenommen und für weitere Untersuchungen bei -80 °C gelagert. Nach der Blutentnahme wurden die Tiere mittels zervikale Dislokation getötet. Es wurden Pankreas, Lunge, Musculus quadrizeps femoris, Musculus gastrocnemius und Musculus tibialis anterior entnommen und entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder für histologische Analysen in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet bzw. mittels Tissue-Tec cryo eingebettet. Die Muskeln wurden für die histologischen Untersuchungen in Gumtragacanth-Masse eingebettet, in Methylbutan gegeben und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und schließlich bei -80°C gelagert.

#### 4.2.6 Einbettung der Muskulatur

Für die Einbettung der Muskulatur wurde ein Tag vor der Aufarbeitung das Einbettmedium hergestellt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Einbettmediums für die Muskulatur.**

	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
Einbettmedium	dH <sub>2</sub> O	105 ml
	Gumtragacanth	10,5 g
	Glycerol	4,2 ml
	Thymol	Messerspitze

Das Medium wurde kegelförmig auf Pappplättchen (1,5 x 1,5 cm) gegeben. Es wurde eine Öffnung geformt und der Muskel eingesetzt. Das Medium wurde so an den Muskel gestrichen, dass dieser bis maximal zur Hälfte im Medium luftblasenfrei eingebettet war. Das Plättchen

mit dem Gewebe wurde etwa 30 Sekunden in stickstoffgekühltes Methylbutan und schließlich in flüssigen Stickstoff gegeben. Bis zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

#### **4.2.7 Histologische Färbungen**

Von den entnommenen Organen wurden 1-2 µm dicke Paraffin- und Kryoschnitte angefertigt. Für die Muskulatur wurden 7 µm dicke Kryoschnitte angefertigt.

##### **4.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die *Hämatoxylin*-Eosin-Färbung wird genutzt, um Strukturen im Gewebe anzufärben. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie z.B. Zellkerne blau. Der synthetische saure Farbstoff Eosin färbt acidophile beziehungsweise eosinophile Strukturen rot (z.B. Zellplasmaproteine). Für die Entparaffinisierung wurden die Schnitte 15 Minuten in Xylol und anschließend 10 Minuten in Methanol inkubiert. Diese Schritte wurden ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurden die Schnitte je für 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 70% Ethanol) inkubiert und für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Paraffinschnitte wurden zunächst mit Xylol und Methanol entparaffinisiert. Die Schnitte wurden 5 Minuten in unverdünntem Hämatoxylin gefärbt anschließend für 2 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und für 1 Minute in Eosin (1:10) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 95%, 100% Ethanol) je 30 Sekunden gespült, für 5 Minuten mit Xylol behandelt und mit VectaMount eingedeckelt.

##### **4.2.7.2 TUNEL Färbung**

Die TUNEL Färbung mit ApopTag® wird genutzt, um DNA-Doppelstrangbrüche durch Markierung der freien 3'-OH Termini nachzuweisen. Diese Termini entstehen bei der Fragmentierung der DNA, welche typischerweise im Zellkern lokalisiert ist. Das Gewebe der Kryoschnitte wurde mit einem Fettstift umrandet und mit Proteinase K (20 µg/ml) für 15 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde über die Seite abgeschlagen und die Schnitte zweimal für jeweils 2 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 10 Sekunden mit dem Equilibrierungspuffer inkubiert und anschließend für 1 Stunde mit TdT Enzym-Puffer in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Danach wurde für 10 Minuten der Stopp/Wasch-Puffer auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden dreimal für jeweils 1 Minute mit PBS gewaschen und mit Anti-Digoxigenin Konjugat Lösung für 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Es wurde viermal für je 2 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde DAPI (1:50 in

PBS) für etwa 15 Sekunden auf die Schnitte geben, dreimal für jeweils 1 Minute mit PBS gewaschen und mit DAKO Fluoreszenzmedium eingebettet.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 RNA Isolation

Für die Isolation der RNA wurde das entsprechende Organ in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol™ und einer Edelstahlkugel gegeben und mit Hilfe des *TissueLyser II* homogenisiert. Die Kugel wurde entfernt, die Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Eis aufgetaut. Zu der Zellsuspension wurde 200 µl Chloroform gegeben und bei Raumtemperatur (RT) 2 Minuten inkubiert. Die Probe wurde für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Probe separierte sich in drei Phasen. Die obere farblose Phase enthält die RNA, die mittlere Phase oder Interphase enthält die DNA und die untere rote Phase ist die Phenol-Chloroform Phase. Die obere Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, wobei nach 10-minütiger Inkubation bei RT die RNA ausfällt. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde die Probe für 5 Minuten bei 7500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und je nach Größe in 30-100 µl RNase-freiem Wasser gelöst, für 10 Minuten bei 55 °C im Heizblock inkubiert und danach über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des *Eppendorf BioPhotometers 6131*® gemessen.

#### 4.3.2 cDNA-Synthese

Zur Ermittlung der Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Realtime-PCR muss die RNA in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA – *complementary DNA*) umgeschrieben werden. Die reverse Transkription erfolgte über eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, Random Hexamere und Oligo-dT-Primer. Die Reaktion wurde mit Hilfe des *Eppendorf Mastercycler ep Gradient 5341* durchgeführt. Die genutzten Substanzen und Temperaturen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 2: Reagenzien und Temperaturprofil der cDNA Synthese.**

Substanz	Volumen je Ansatz	Menge
RNA	max. 9,5 µl	2 µg
Aqua Dest.	9,5 µl – x µl RNA	
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	0,5 mM
Oligo dT (100 µM)	1 µl	5 µM
Random Primer (3 µg/µl)	0,5 µl	75 ng

Schritt	Temperatur	Zeit
Primer Anlagerung	65 °C	5 min
	4 °C	1 min

Substanz	Volumen je Ansatz	Menge
First-Strand Puffer (5 x)	4 µl	1 x
DTT (0,1 M)	2 µl	0,01 M
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	1 µl	40 U
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)	1 µl	200 U

Schritt	Temperatur	Zeit
Primer Anlagerung	25 °C	10 min
Reverse Transkription	37 °C	90 min
Inaktivierung	95 °C	5 min

#### 4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten spezifischer DNA-Sequenzen. Mittels sich wiederholender Temperaturgradienten denaturiert die DNA, die Primer binden an den entstandenen Einzelstrang und es folgt die enzymatische Replikation der spezifischen DNA-Sequenz durch die thermostabile DNA-Polymerase. Die verwendeten Substanzen und Temperaturen sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

**Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches.**

Substanz	Volumen je Ansatz	Menge
10 x CoralLoad PCR Buffer	1 µl	1 x
Template	1 µl	1:10
Primer Forward (10 µM)	0,2 µl	200 nM
Primer Reverse (10 µM)	0,2 µl	200 nM
dNTP (2,5 mM)	0,5 µl	125 nM
5 x Q Solution	1 µl	2 x
taq-DNA-Polymerase	0,125 µl	1 U
A. dest	ad 10 µl	-

**Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm des Thermalcyclers.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 35 x
Annealing	Variable	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Final Elongation	72 °C	10 min	1 x

#### 4.3.4 Quantitative Real-time (Echtzeit) PCR

Für die Quantifizierung der Genexpression bestimmter Gene wird eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Die Methode basiert auf sequenzspezifischer Amplifikation der cDNA in Echtzeit unter Verwendung des Farbstoffs SYBR® Green, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Die Intensität des Farbstoffes steigt mit jedem PCR Zyklus und wird im Amplifikationsblot detektiert. Es werden spezifische Primerpaare verwendet, um DNA-Fragmente von Interesse zu detektieren. Der  $C_T$ -Wert beschreibt den Reaktionszyklus, ab welchem sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt. Für die q-RT wurden ein SYBR® Green PCR Mastermix (2x), 100 nM der jeweiligen Primer (reverse und forward) und 1 µl cDNA (1 µl = 50 ng cDNA) in einer Zweifachbestimmung (5 µl je Well) verwendet. Als Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA Wasser dazugegeben, um Kontaminationen des Puffergemisches auszuschließen. Das *Fast Real-Time PCR System 7900HT* (Applied Biosystems) wurde mit dem Standardtemperaturprofil verwendet, die Annealing-Temperatur wurde ggf. angepasst. Die Daten wurden mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Die mittleren  $C_T$ -Werte aus der Zweifachbestimmung wurden von den mittleren  $C_T$ -Werten eines Housekeeping Gens ( $\beta$  Aktin) subtrahiert, somit entsteht der  $\Delta C_T$ -Wert. Abschließend wurde durch die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Berechnung die relative Genexpression ermittelt.

#### 4.3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Plasmakonzentration von Hämoglobin A1c (HbA1c) wurde über einen ELISA (Hemoglobin A1c (HbA1c) (Mouse) ELISA Kit [E4657-100] BioVision) nach Herstellerangaben bestimmt. Das Plasma wurde bis zur Messung bei -80 °C gelagert und schonend auf Eis aufgetaut. Die Absorption wurde spektrometrisch bei 450 nm als Doppelbestimmung gemessen. Für die Auswertung wurde der Verlauf der Standardkurve genutzt.

#### 4.3.6 Bestimmung des Gelegenheitsblutzuckers

Für die Bestimmung des Gelegenheitsblutzuckers im Plasma wurde das bei -80 °C gelagerte Plasma auf Eis aufgetaut. Für jede Messung wurde ein Teststreifen in das aktivierte

Messsystem eingeführt. Es wurden 5 µl Plasma auf den Teststreifen des Blutzuckermessgerätes (OneTouch Select Plus Messsystem) gegeben. Pro Probe wurde eine Messung durchgeführt.

#### **4.4 Proteinchemische Methoden**

##### **4.4.1 Probenaufarbeitung und Proteinbestimmung**

Das bei -80 °C gelagerte Gewebe wurde mit 650 µl Lysepuffer und einer Metallkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Die Probe wurde in der Kugelmühle für eine Minute homogenisiert. Die Metallkugel wurde entnommen und die Proben zweimal für je 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Probe für 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand wurde die Probe 1:100 verdünnt und mit dem BCA Protein-Assay (Pierce Biotechnology) nach den Herstellerangaben gemessen.

##### **4.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung der Proteine entsprechend des Molekulargewichtes wurde das Prinzip der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Durch die Inkubation mit SDS werden die Proteine denaturiert und es bildet sich ein negativ geladener SDS-Protein-Komplex. Die negative Ladung ist direkt proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Der Probenüberstand wurde 1:1 mit Laemmli Puffer (inkl. 20% Mecoethanol) versetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Es wurden ein Trenn- und Sammelgel gegossen. In Abhängigkeit des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine wurde die Acrylamidkonzentration des Trenngels variiert. Die Gelbildung beruht auf einer durch Radikale ausgelösten Polymerisation von monomerem Acrylamid mit dem quervernetzten Bisacrylamid. Für den Start der Reaktion werden Radikale benötigt, welche durch das N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestellt werden. Das Gel wurde mit einem Protein-Marker und den Proben beladen. Die Trennung erfolgte in Tris-SDS-Glycin-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA im Sammelgel und 40 mA im Trenngel.

##### **4.4.3 Immunoblot-Analyse von Proteinen („Western-Blot“)**

Die Methode des Western Blots beruht auf der Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (SDS-PAGE) aus einem Gel auf eine Trägermembran. Die lokale Auflösung der Proteine bleibt bei dem Transfer dabei erhalten. Die daraus folgende Renaturierung ermöglicht die nachfolgende Immundetektion der Proteine über spezifische Antikörper. Die Bindung der Proteine an die Membran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoff-

Brücken. Zur Übertragung der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde das „Semi-Dry-Blot System“ verwendet. Dabei wird eine Blotkammer im Sandwich-Verfahren genutzt. Diese besteht aus vier Lagen von in Transferpuffer (Towbinpuffer) getränktem Whatman Filterpapier, der befeuchteten Membran, dem Gel und weiteren vier Lagen von getränktem Whatman Papier. Auf eine Gelfläche von 1 cm<sup>2</sup> wirkte eine Stromstärke von 1 mA, der Transfer dauerte 30 min. Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers erfolgte eine reversible Färbung mit Ponceau S Lösung. Der Bisazofarbstoff Ponceau S bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Zum Entfärben wurde die Membran mit Wasser gewaschen, bis das Wasser klar blieb. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurde die Membran für 60 min unter Schütteln in Blockierungslösung inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 bzw. 1:500 in der Blockierungslösung unter Schütteln bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit dem entsprechenden Puffer für je 10 min gewaschen. Schließlich folgte die Inkubation des spezifischen sekundären Antikörpers (Peroxidase gekoppelt) mit einer Verdünnung von 1:16.000 in der Blockierungslösung für 1 Stunde unter Schütteln. Ungebundene Antikörper wurden durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem ECL-Kit (Thermo Fischer) nach Angaben des Herstellers. Dabei spaltet die Peroxidase, welche an dem sekundären Antikörper gebunden ist, das Wasserstoffperoxid in der Entwicklerlösung. Der dabei freiwerdende Sauerstoff katalysiert die Oxidation von Luminol unter Chemilumineszenz. Diese wurde durch ein Geldokumentationssystem aufgenommen und mit Hilfe der Software von Alpha Innotech ausgewertet. Dadurch war eine densitometrische Auswertung der einzelnen Proteinbanden möglich.

## **4.5 Enzymatische Methoden**

### **4.5.1 Myeloperoxidase-Bestimmung in der Lunge**

Bei der Myeloperoxidase handelt es sich um ein Enzym, welches in Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Das Enzym spielt eine Rolle beim Nachweis von Entzündungsprozessen und seine Aktivität wird als Indikator für den Organschaden verwendet.

Die bei -80 °C gelagerten Lungenproben werden mit 500 µl Homogenisierungspuffer versetzt und mit Hilfe eines Douncers zerkleinert. Anschließend wurden 100 µl der Gewebesuspension für die Proteinbestimmung abgenommen, zweimal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Rest des Homogenats (400 µl) wurde bei 10.000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Proben wurden viermal in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Schließlich wurden die Proben zweimal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und 10 Minuten bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden 10 µl des Überstandes mit 90 µl Substratlösung (0,167 mg/ml o-Dianisidin, 0,21% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) versetzt. Direkt im Anschluss wurde eine 10-minütige Enzymkinetik bei einer Wellenlänge von 460 nm und 30 °C gegen einen Standard (aufgereinigte Myeloperoxidase) gemessen. Für die Aufwertung wurde der lineare Bereich der Kinetik gewählt und mit dem entsprechendem Proteingehalt verrechnet.

#### 4.5.2 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum

Die Konzentrationsmessung der Zytokine IL12, IL6, IL10, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  und MCP-1 im Serum wurde mittels FACS Analyse über fluoreszierender antikörpergekoppelter Beads durchgeführt. Es wurde das *CBA mouse inflammation Kit* der Firma BD Biosciences verwendet. Die Aufarbeitung und Durchführung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.5.3 Enzymmessungen im Stuhl

Für die Messung der Elastase und Chymotrypsin im Stuhl wurde 15 – 30 mg Stuhl eingewogen und in 800 µl Probenpuffer gegeben. Die Proben wurden mit Ultraschall behandelt (2 x 10 sec., 100% der Stärke) und für 10 Minuten bei 0 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Messung auf Eis gelagert, um die vorzeitige Aktivierung sowie die Degradation der Enzyme zu verhindern. Für die Messungen wurde für jede Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte als Kinetik über eine Stunde. Für die Messung wurde je 10 µl Probe und 140 µl Substrat in eine 96-Well Mikrotiterplatte mit U-Boden pipettiert. Die Aktivitätsmessungen erfolgten bei 37 °C und den substratspezifischen Wellenlängen.

**Tabelle 5: Übersicht der Messbedingungen der Enzyme im Stuhl.**

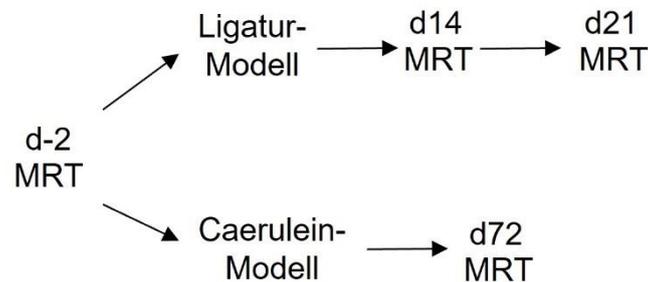
Substrat	Enzym	Konzentration im Messpuffer	Wellenlänge
AMC(Suc-Ala <sub>3</sub> )	Elastase	10 µM	Extinktion 340 nm Emission 460 nm
AMC(Suc-Ala <sub>2</sub> -Pro-Phe)	Chymotrypsin	5 µM	Extinktion 340 nm Emission 460 nm

Die Auswertung erfolgte im Bereich des linearen Anstiegs des Substratumsatzes. Hintergrundfluoreszenzen wurden von den entsprechenden Messwerten abgezogen. Die Messwerte wurden mit dem Ausgangsgewicht der Probe normiert.

## 4.6 Morphometrische Methoden

### 4.6.1 Magnetresonanztomographische Messungen

Bei der Magnetresonanztomographie (MRT) handelt es sich um ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren, welches unter anderem zur Beurteilung der Muskelgröße eingesetzt werden kann. Dabei kann ein Tier mehrfach an verschiedenen Zeitpunkten vermessen werden (Abb. 6). Die MRT-Messungen fanden beim Ligaturmodell zwei Tage präoperativ, d.h. an Tag -2, sowie an den Tagen 14 und 21 postoperativ statt. Im Caeruleinmodell wurde eine Messung an Tag -2 und eine weitere an Tag 72 durchgeführt. Durchgeführt wurden die Untersuchungen an einem Hochfeld-Magnetresonanztomographen 7.1 Tesla Bruker-System (ClinScan 70/30; Bruker, Ettlingen, Deutschland). Das Gerät nutzt eine Protonenresonanzfrequenz von 300,4 Megahertz (MHz) und eine Gradientenfeldstärke von 290 mT/m. Das Gradientenechoverfahren nutzt die Umkehr der Ausrichtung des Auslese- / Meßgradienten zur Erzeugung eines Echos. Die Spins werden dabei durch kurze Schaltung des Gradienten mit negativem Vorzeichen dephasiert, danach erfolgt die Umkehrung des Gradienten und er wird jetzt mit positivem Vorzeichen geschaltet. Dies führt zu einer Rephasierung und somit zu einem Echo. Für die Messungen wurde eine phasengesteuerte Spule von Bruker verwendet.



**Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der MRT Messungen.**

*In beiden Modellen der chronischen Pankreatitis wurden die Tiere 2 Tage vor Beginn der Behandlung im MRT vermessen. Im Ligaturmodell wurden die Gruppen nach 14 und 21 Tagen erneut vermessen. Im Caeruleinmodell wurden die Tiere an Tag 72 erneut in das MRT eingebracht.*

Die Gesamtdauer der MRT-Messung (T2 gewichtet und diffusionsgewichtet) pro Tier betrug maximal eine Stunde. Die Tiere wurden mit einem Isofluran (1214, CP Pharma) -Sauerstoff-Gemisch durch einen Isofluranverdampfer (Dräger Vapor® 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) in einer Plexiglastiste mittels Isofluran (initial 3%, im Verlauf der Bildgebung 1,5 – 2,5 %) und Sauerstoff (initial 4 l/min, im Verlauf der Bildgebung 1 l/min) in Narkose gelegt. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde während der Narkose eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe) appliziert. Die Tiere wurden in Bauchlage auf den

Schlitten gelegt und ausgerichtet und in das Gerät geschoben. Dabei wurde die Nase des Tieres in einem Trichter ausgerichtet, um die Inhalationsnarkose aufrecht zu erhalten und wenn nötig zu steuern. Die Atemfrequenz (30 – 40 Atemzüge pro Minute) der Tiere wurde während der Dauer der Messung über einen Drucksensor (Control/Gating Module, MR-compatible Small Animal Monitoring & Gating System, SA Instruments, Inc.) kontrolliert und die Inhalationsnarkose, wenn nötig angepasst. Es wurde zügig gearbeitet, um die narkosebedingten Komplikationen so gering wie möglich zu halten. Wenn die Messung beendet war, wurde das Tier wieder in den Käfig gebracht, unter eine Rotlichtlampe gelegt, gegebenenfalls wurde Sauerstoff zugeführt und engmaschig überwacht. Die MRT Bilder wurde mittels HOROS ausgewertet. Dabei wurde von Quadrizeps Muskel der linken und rechten Seite jeweils die breiteste Stelle vermessen.

#### **4.6.2 Bestimmung des maximalen Muskeldurchmessers mittels Hämatoxylin Eosin Färbung**

Zur Erfassung der Durchmesser der einzelnen Muskeln wurden Cryoschnitte des M. quadrizeps anfertigt und mit *Hämatoxylin*-Eosin-Färbung gefärbt. Die Schnitte wurden mit Hilfe der Slide Scanners digitalisiert. Die Scans wurden mit der CaseViewer Software hinsichtlich des horizontalen und des vertikalen Feret-Durchmessers an der breitesten Stelle des Muskels vermessen. Dabei wird die Größe eines Objektes anhand des Abstands zwischen zweimal zwei Tangenten beschrieben. Pro Muskel wurden zwei Schnitte ausgewertet.

#### **4.7 Analysen des fäkalen Mikrobioms**

Der Stuhl der Tiere wurde über den Versuchszeitraum gesammelt und bei -80 °C gelagert. Die Proben wurden mithilfe des ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kits aufgearbeitet. Die Probe wurde in ein Lyse-Tube mit 750 µl Lysepuffer und einer Metallkugel überführt. In der Kugelmühle wurde die Probe für 5 Minuten bei einer Frequenz von 30/s homogenisiert und anschließend bei 10.000 g für 1 Minute abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 400 µl in einen Zymo-Spin™ III-F Filter transferiert und für 1 Minute bei 8.000 g zentrifugiert. Zu dem Filtrat wurden 1,2 ml ZymoBIOMICS™ DNA-Bindpuffer gegeben. Das Gemisch wurde in zwei Schritten auf eine Zymo-Spin IICR Säule gegeben und jeweils für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert, das Filtrat wurde verworfen. Auf die Säule wurden 400 µl vom ZymoBIOMICS™ DNA Waschpuffer 1 gegeben, für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert und das Filtrat wieder verworfen. Anschließend wurden auf die Säule erst 700 µl und dann 200 µl ZymoBIOMICS™ DNA Waschpuffer 2 gegeben und jeweils für 1 Minute bei 10.000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Auf die Säule wurden 50 µl ZymoBIOMICS™ DNase/RNase freies Wasser

gegeben, für eine Minute inkubiert und für 1 Minute bei 10.000 g abzentrifugiert. Ein ZymoBIOMICS™ III-HRC Filter wurde mit 600 µl ZymoBIOMICS™ Aktivierungslösung befeuchtet und für 3 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Das DNA-Eluat wurde auf den aktivierten Filter gegeben und für 6 Minuten bei 8.000 g zentrifugiert. Das gewonnene DNA-Eluat wurde auf Reinheit und DNA-Konzentration vermessen.

Für die Messung der 16S-rRNA wurden je 25 µl Probe in ein Well einer 96-Well Platte gegeben und vermessen. Die 16S-rRNA hat neun hypervariable Regionen (V1-V9), welche eine hohe Sequenzdiversität zwischen den verschiedenen Bakterien aufweisen. Durch artenspezifische Sequenzen innerhalb dieser Bereiche können sie zur Identifikation genutzt werden. Die Messung der V1-V2 Region der 16S-rRNA fand in Kooperation mit dem Institut für klinische Molekularbiologie der Universität Kiel statt. Ebenfalls in Kiel wurde die Lesekorrektur sowie die Ableitung von Amplikon-Sequenzvarianten (ASV) durchgeführt. Taxonomische Annotationen der ASV-Sequenzen wurden unter Verwendung des Bayes'schen Klassifikators des DADA2-Pakets und der Ribosomal Database Project (RDP) Release 16-Datenbank abgeleitet. Dadurch erhält man die taxonomischen Annotationen, aus welcher man die relative Verteilung der Art und Gattung von Bakterien in der Probe identifizieren kann. Die statistische Auswertung der Daten fand in Kooperation mit Herrn PD Dr. Fabian Frost aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A der Universitätsmedizin und Herrn Dr. Stefan Weiß vom Zentrum für Innovationskompetenz Funktionelle Genomforschung (ZIK-FunGene) der Universität Greifswald statt. Um die biologische Vielfalt zu beschreiben, werden die Begriffe Artenreichtum und Diversität genutzt. Artenreichtum (*engl. richness*) ist die Anzahl der verschiedenen Arten. Die Diversität oder Vielfalt (*engl. diversity*) beschreibt die Anzahl der Arten (Artenreichtum) und die relative Häufigkeit jeder Art (Artengleichmäßigkeit) in einem System. Zur Beschreibung der Diversität werden die Simpson Diversität und der Shannon Index genutzt. Die Hauptkomponentenanalyse (PCoA, *engl. principal component analysis*) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik. Dabei werden abhängige Variablen zu wenigen Hauptkomponenten zusammengefasst. Die einzelnen Variablen werden entsprechend ihrer Gewichtung zugeordnet. Die Hauptkomponenten spiegeln somit die größtmögliche Information der Ausgangsvariablen wider. Dadurch können große Datensätze vereinfacht und übersichtlich dargestellt werden, ohne dass die Modellgüte sinkt.

#### **4.7.1 Analysen des Serummetaboloms**

Das Serum wurde bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Für die Messung wurde das MxP® Quant 500 Kit der Firma Biocrates genutzt. Das Kit erlaubt die quantitative Analyse von bis zu 630 Metaboliten aus 26 Analytklassen. Zu den Analytklassen gehören unter anderem Aminosäuren, Gallensäuren, Fettsäuren, Ceramide sowie Di- und Triglyceride. Zur

Untersuchung des Metabolitenprofils während der chronischen Pankreatitis wurden Serumproben mit Hilfe von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) gemessen. Die Daten wurden als Vulkandiagramm dargestellt. Die Messung und Auswertung wurde in Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald mit Unterstützung von Frau Dr. Kathrin Budde und Frau Dr. Friederike Gauß durchgeführt.

#### **4.8 Statistische Auswertung**

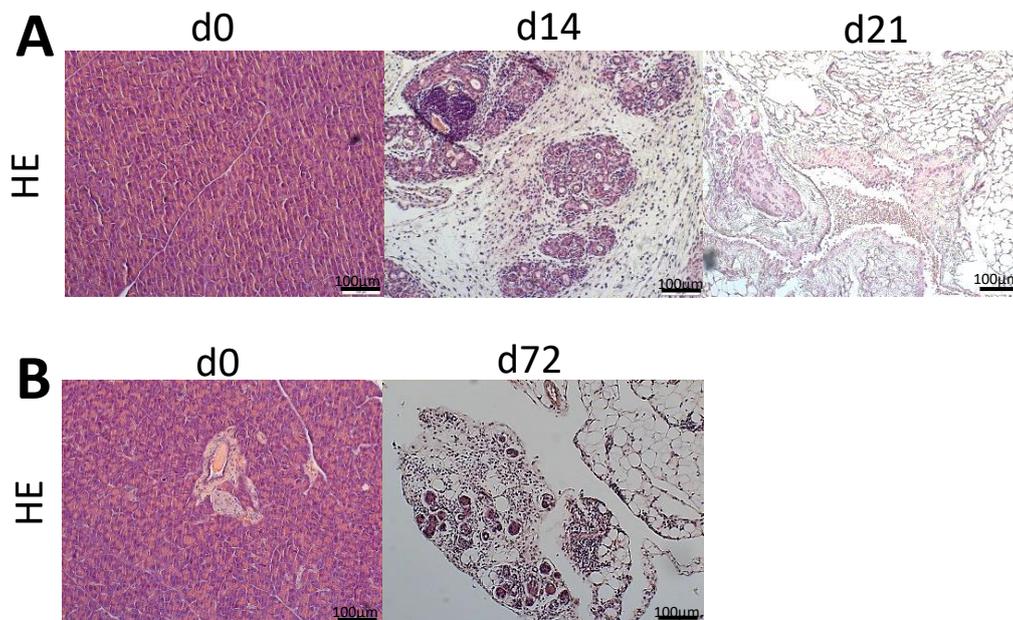
Die Daten zeigen Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM). Die Gruppengröße der verwendeten Mäuse in den einzelnen Experimenten betrug mindestens 7 Tiere. Zur Erstellung von Diagrammen und für die statistische Auswertung wurden *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und *GraphPad Prism 5.01* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) genutzt. Zur Evaluation der statistischen Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test verwendet. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet und mit einem Asterisk (\*) gekennzeichnet.

## 5. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Pathomechanismen der Sarkopenie in der chronischen Pankreatitis. Hierfür wurden zwei verschiedene experimentelle Modelle der chronischen Pankreatitis in Wildtyp (C57BL/6J) Mäusen verwendet. Beide Modelle weisen morphologische Merkmale einer chronischen Pankreatitis auf, sind aber in ihrem Entstehungsmechanismus unterschiedlich, da ein Modell auf repetitive akute Entzündungen des Pankreas und das andere auf eine schwere nekrotisierende akute Pankreatitis beruht. Mit Hilfe dieser Modelle wurde die Entwicklung der Sarkopenie sowie deren zugrundeliegenden Mechanismen untersucht.

### 5.1 Histologische Beurteilung des Pankreas

Das Pankreasgewebe von Mäusen mit experimentell induzierter chronischer Pankreatitis wurde nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung anhand von Hämatoxylin-Eosin Färbungen histologisch untersucht. In einem Modell wurde eine Ligatur des Pankreasganges durchgeführt, um eine chronische Pankreatitis zu induzieren und die Tiere für insgesamt 21 Tage beobachtet. In einem zweiten Modell wurde den Tieren repetitiv Caerulein i.p. injiziert, wodurch die chronische Pankreatitis induziert wurde und über insgesamt 72 Tage beobachtet. Hämatoxylin färbt Zellkerne sowie das raue endoplasmatische Retikulum blau. Eosin färbt vor allem Proteine des Zellplasmas, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum, Kollagen und Kreatin rot an. Somit können histomorphologische Veränderungen im Gewebe sichtbar gemacht werden.



**Abb. 7: Morphologische Veränderungen des Pankreas in der experimentellen chronischen Pankreatitis.**

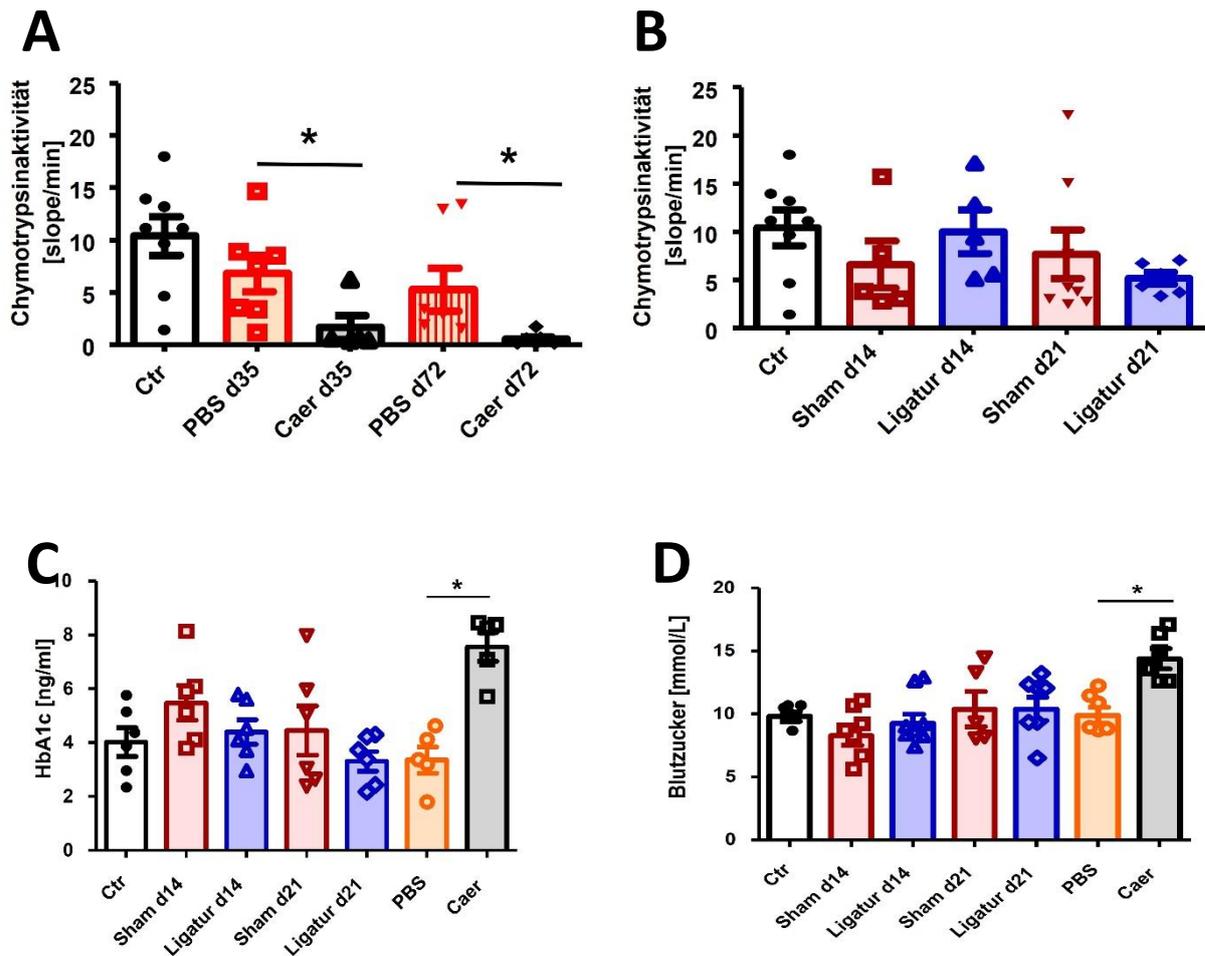
Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Erkrankung (A) nach Ligatur an den Tagen 0, 14 und 21 sowie (B) nach repetitiver Caerulein Injektion an Tag 0 und 72. In beiden Modellen ist eine deutliche Zunahme von fibrotischem Gewebe mit gleichzeitiger Einlagerung von Fettgewebe und Verlust von Azini zu erkennen.

Die histologischen Schnitte des Pankreas zeigten im Ligaturmodell 14 und 21 Tage nach Ligatur eine deutliche Verminderung von funktionellem Gewebe. Ebenso fand sich gegenüber dem Ausgangszeitpunkt (Tag 0) eine Zunahme von fibrotischem und nekrotischem Gewebe. Im Caeruleinmodell wurde an Tag 72 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine Zunahme von fibrotischem und nekrotischem Gewebe beobachtet.

## **5.2 Beurteilung der endo- und exokrinen Pankreasfunktion in beiden Modellen**

Neben charakteristischen histopathologischen Veränderungen können bei der chronischen Pankreatitis auch Einschränkungen der Pankreasfunktion auftreten. Die exokrine Insuffizienz zeichnet sich dadurch aus, dass zu wenig Verdauungsenzyme im Pankreas gebildet und sezerniert werden. Als Marker der Funktion wurde das Chymotrypsin im Stuhl herangezogen. Die endokrine Insuffizienz ist unter anderem durch eine verminderte Bildung von Hormonen, welche den Blutzucker regulieren, gekennzeichnet. Diese Hormone werden in endokrinen Zellansammlungen im Pankreas, den Langerhans-Inseln, gebildet. Die wichtigsten Hormone der Glukoseregulation sind Insulin und Glukagon. Beim Hämoglobin A1c (HbA1c) handelt es sich um das glykosylierte Hämoglobin, welches den Blutzuckerspiegel der vergangenen 4 – 6 Wochen widerspiegelt.

Die Messung der Chymotrypsinaktivität im Stuhl zeigt für das Caeruleinmodell (Abb. 8 A) bereits nach 35 Tagen eine signifikant verminderte Aktivität im Vergleich zu Kontrollen, die mit PBS behandelt wurden. Auch nach 72 Tagen bleibt die Chymotrypsinaktivität in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Im Ligaturmodell (Abb. 8 B) konnten zu den Zeitpunkten 14 und 21 Tage nach Ligatur keine signifikanten Unterschiede im Stuhl-Chymotrypsin zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die Messung von HbA1c (Abb. 8 C) zeigte für das Ligaturmodell ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die mit Caerulein behandelten Tiere wiesen dagegen einen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu den Kontrollen auf. Bei der Messung des Gelegenheitsblutzuckers (Abb. 8 D) fanden sich für das Ligaturmodell an Tag 14 und 21 auch keine Unterschiede. Im Caeruleinmodell wiesen die behandelten Tiere jedoch einen signifikant erhöhten Blutzuckerspiegel im Serum im Vergleich zu den Kontrollen auf.



**Abb. 8: Bestimmung der endo- und exokrinen Pankreasinsuffizienz.**

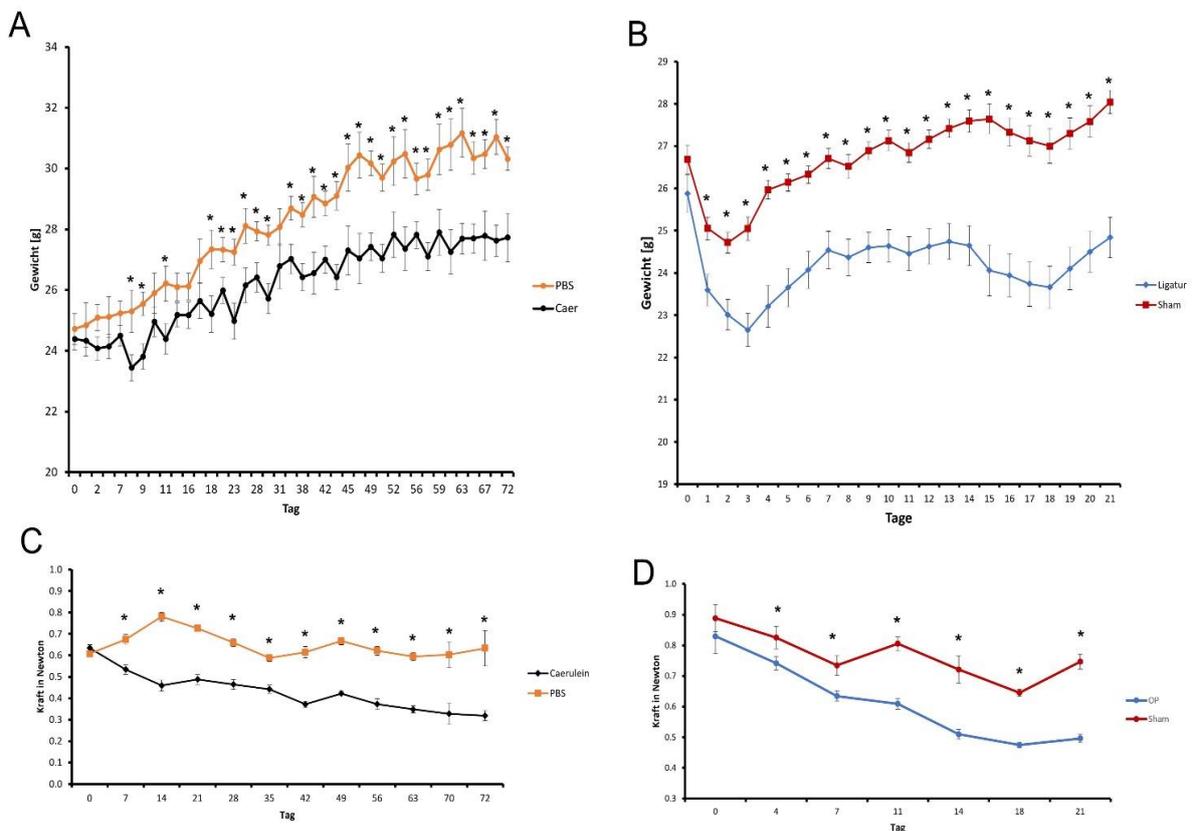
Die Aktivität von Chymotrypsin ist im Caeruleinmodell (A) bereits nach 35 Tagen im Vergleich zur PBS Gruppe signifikant reduziert und bleibt auch nach 72 Tagen bestehen. Im Ligaturmodell (B) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Für HbA1c, einem Marker für eine diabetische Stoffwechsellaage, (C) fanden sich zwischen Kontrollen, Sham-operierten und Ligaturtieren nach 14 und 21 Tagen keine Unterschiede. Die mit Caerulein behandelten Tiere wiesen im Vergleich zu den mit PBS behandelten sowie zu den unbehandelten Tieren einen erhöhten HbA1c Wert auf. Für den Gelegenheitsblutzucker (D) waren zu den Zeitpunkten 14 und 21 Tage nach Ligatur keine Unterschiede zu den Kontrollen erkennbar. Die mit Caerulein behandelten Tiere hatten nach 72 Tagen einen signifikant erhöhten Wert. Von einer diabetischen Stoffwechsellaage wurde ab einem Wert von 12,2 mmol/L ausgegangen. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM angegeben. \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

### 5.3 Verlust von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis

In beiden Modellen wurden das Körpergewicht sowie die skelettale Muskelkraft der Tiere erfasst. Sowohl Gewichtsverlauf als auch Muskelkraft wiesen Gemeinsamkeiten aber auch einige Unterschiede je nach verwendetem Modell auf: Im Caeruleinmodell konnte gezeigt werden, dass diese Tiere im Vergleich zur PBS Gruppe ab Tag 7 ein signifikant reduziertes Körpergewicht aufwiesen, welches sich über den gesamten Beobachtungszeitraum bis Versuchsende an Tag 72 fortsetzte und deren Abweisung im Verlauf zunahm (Abb. 9A).

Analog wurde die Muskelkraft der Tiere während der 72 Tage mehrfach gemessen. Dabei hatten die mit Caerulein induzierten Tiere ab Tag 7 eine signifikant reduzierte Muskelkraft im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Unterschied blieb ebenfalls über den Beobachtungszeitraum bestehen.

Auch bei Verwendung des Ligaturmodells reduzierte sich bei den Mäusen das Körpergewicht im Vergleich zu sham-operierten Tieren, wo ein signifikanter Verlust schon nach einem Tag beobachtet wurde. Diese Differenz vergrößerte sich während des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen (Abb. 9 B). Ebenso wurde die Muskelkraft der Tiere erfasst. Bereits am vierten Tag nach Ligatur wiesen die Tiere eine signifikant verminderte Muskelkraft auf, wobei sich der Unterschied zu den Kontrollen über den Beobachtungszeitraum weiter ausprägte.



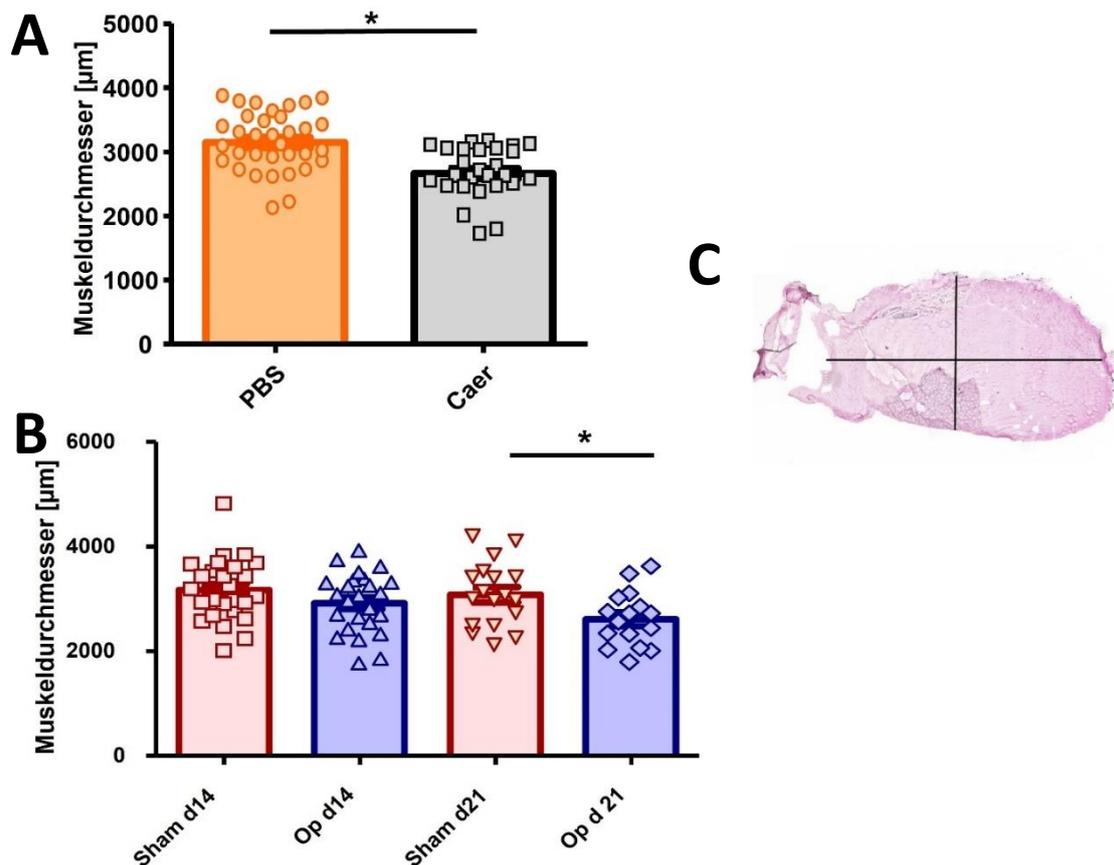
**Abb. 9: Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft während der chronischen Pankreatitis.**

Die Änderungen von Körpergewicht und Muskelkraft wurden in beiden Modellen im Verlauf der Erkrankung aufgezeichnet. Das Gewicht der mit Caerulein behandelten Tiere (A) ist verglichen mit den Kontrollen bereits ab Tag 7 signifikant vermindert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Tagen lag das Gewicht der behandelten Tiere unter dem der Kontrollen. Das Gewicht der Tiere mit Pankreasgangligatur reduzierte sich bereits nach dem ersten Tag signifikant und blieb über dem gesamten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen unter dem der Kontrollen (B). Die Änderung der Muskelkraft wurde im Verlauf des Beobachtungszeitraums ebenso vermessen (C und D). Im Caeruleinmodell (C) war die Muskelkraft der behandelten Tiere ab Tag 7 vermindert und reduzierte sich gegenüber den Kontrollen weiter. Im Ligaturmodell (D) war die Muskelkraft der operierten Tiere an Tag 4 nach der Ligatur signifikant geringer als bei den sham-operierten Tieren. Beginnend ab Tag 7 vergrößerte sich der Unterschied in der Kraft und blieb bis zum Versuchsende bestehen. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM angegeben. \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass beide Modelle der chronischen Pankreatitis durch eine Verminderung des Körpergewichts sowie der Muskelkraft gekennzeichnet sind, wobei sich einige modellspezifische Unterschiede zeigten.

#### 5.4 Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis in der Hämatoxylin Eosin Färbung

Als weitere Größe wurde der Durchmesser des Quadrizepsmuskels bestimmt. Dafür wurden in Paraffin-fixierten Muskeln Querschnitte angefertigt, HE gefärbt und schließlich der Feret's



**Abb. 10: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis.**

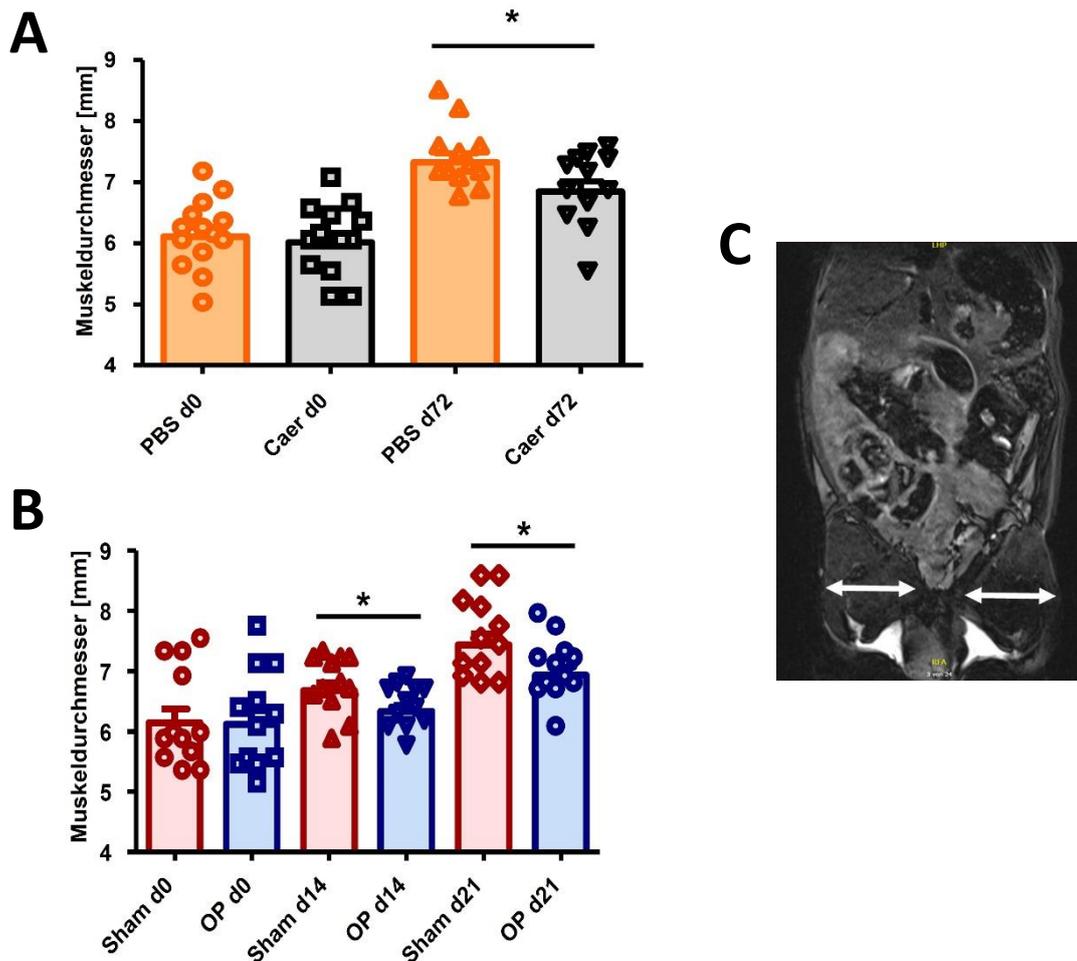
Die Messung des Quadrizepsdurchmesser erfolgte über HE gefärbte Querschnitte. (A) An Tag 72 war der Quadrizepsdurchmesser der mit Caerulein behandelten Tiere im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant vermindert. (B) Die beiden Versuchsgruppen des Ligaturmodells zeigten an Tag 14 keine Änderungen. An Tag 21 war der Durchmesser des Quadrizeps der Tiere mit Ligatur signifikant reduziert. (C) Exemplarische HE-Aufnahme, in welcher die schwarzen Linien die gemessenen Durchmesser des Quadrizepsmuskels darstellen, es wurden beide Dimensionen vermessen. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM aus \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

Durchmesser an der breitesten Stelle ausgemessen. Dabei wurden nur die Beobachtungsendpunkte an den Tagen 0, 14 und 21 sowie Tag 72 vermessen.

Mäuse, bei denen durch repetitive Caerulein-Injektionen eine chronische Pankreatitis ausgelöst wurde (Abb. 10 A), hatten nach 72 Tagen einen signifikant reduzierten Durchmesser des Quadrizeps im Vergleich zur PBS Gruppe. Im Ligaturmodell (Abb. 10 B) verringerte sich der Muskeldurchmesser an Tag 21 nach Ligatur signifikant gegenüber Sham-operierten Tieren. An Tag 14 nach Ligatur war noch kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

### **5.5 Messung des Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis durch Magnetresonanztomographie**

Neben der Bestimmung von Körpergewicht und Muskelkraft wurden in jedem Modell die Größen der Quadrizeps-Muskeln anhand von Magnetresonanztomographie (MRT)-Aufnahmen in der T2-Wichtung ermittelt. Der Muskel wurde erstmalig zwei Tage vor Induktion der chronischen Pankreatitis im MRT vermessen, um den Ausgangswert für jedes Tier bestimmen zu können. Im Ligaturmodell wurden die Tiere erneut an Tag 14 und 21 nach Pankreasgang-Ligatur, im Caeruleinmodell wiederholt an Tag 72 vermessen. In beiden Modellen fanden sich vor Induktion der chronischen Pankreatitis erwartungsgemäß keine Unterschiede im Durchmesser des Quadrizepsmuskels. Mäuse, in denen durch repetitive Caerulein-Injektionen eine chronische Pankreatitis ausgelöst wurde (Abb. 11 A), hatten nach 72 Tagen einen signifikant reduzierten Durchmesser des M. quadriceps im Vergleich zur PBS Gruppe. Im Ligaturmodell (Abb. 11 B) verringerte sich ebenso an beiden Meßzeitpunkten zu Tag 14 und 21 nach Ligatur der Muskeldurchmesser signifikant gegenüber Sham-operierten Tieren.

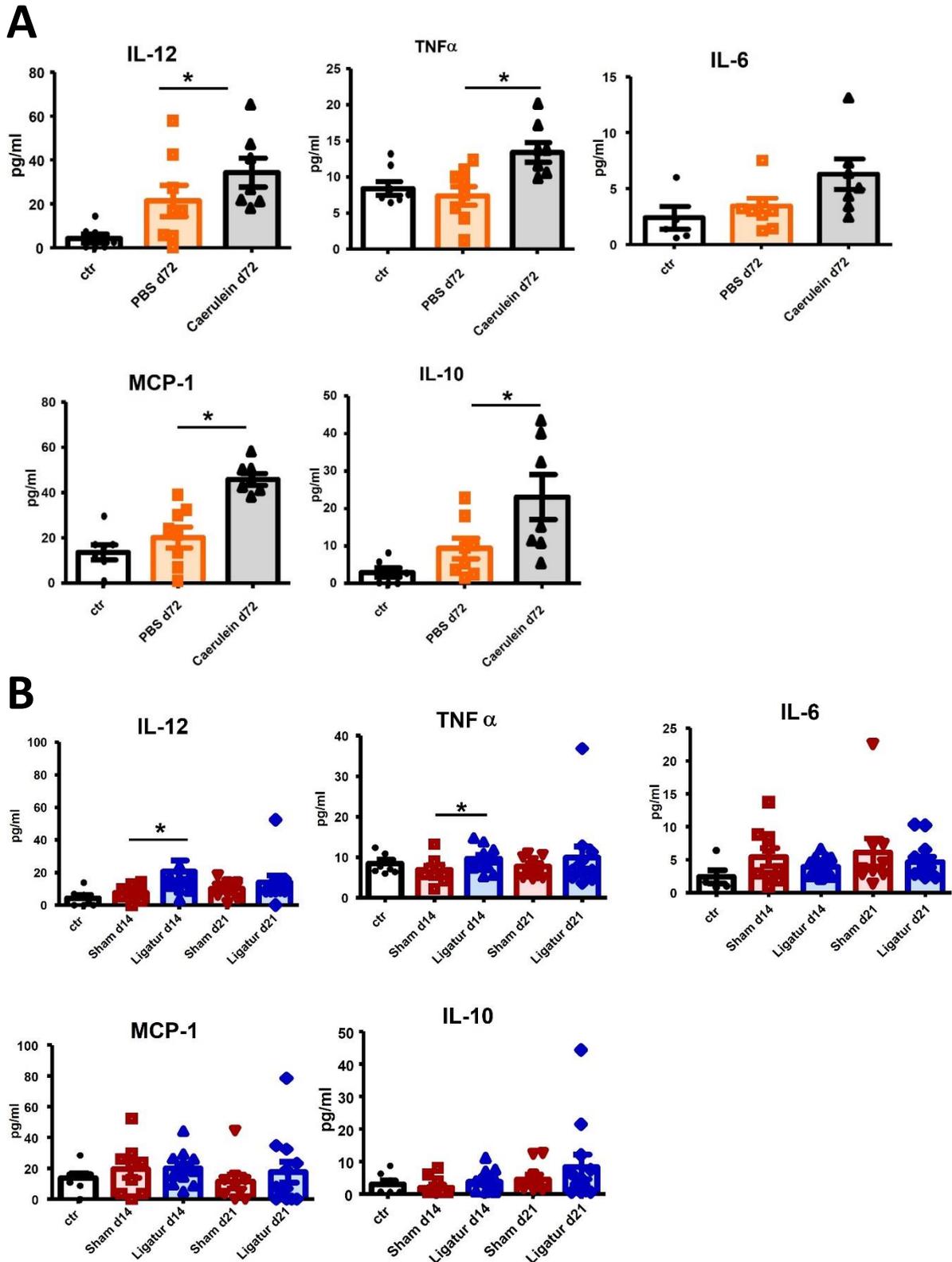


**Abb. 11: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis.**

Die Messung der Quadrizeps-Durchmesser erfolgte in T2-gewichteten, coronaren Aufnahmen transversal mittels Gradientenecho-Messung im Kleintier-MRT. (A) Im Caeruleinmodell wiesen die beiden Versuchsgruppen vor Versuchsbeginn keinen Unterschied im Quadrizepsdurchmesser auf. An Tag 72 war der Quadrizepsdurchmesser der mit Caerulein behandelten Tiere signifikant vermindert im Vergleich zur PBS-Gruppe. (B) Die beiden Versuchsgruppen des Ligaturmodells zeigten ebenfalls vor Pankreasgangligatur keinen Unterschied im Muskelradius. An Tag 14 reduzierte sich in Tieren mit Ligatur der Durchmesser des Quadrizepsmuskels signifikant. An Tag 21 blieb der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestehen. (C) Exemplarische MRT-Aufnahme mit dorsaler Ansicht einer Maus. Die weißen Doppelpfeile zeigen die gemessenen Durchmesser des Quadrizepsmuskels auf beiden Seiten. Die Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 7 Mäusen angegeben. \* $p < 0,05$ .

## 5.6 Verlauf pro- und antiinflammatorischer Serum-Zytokinspiegel in der chronischen Pankreatitis

Mit einem CBA Kit (Firma BD Biosciences) wurden die Zytokine im Serum über Fluoreszenzmarkierte Beads durchflusszytometrisch analysiert. Zu den gemessenen Zytokinen zählen der Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), die Interleukine 6, 10 und 12 (IL6, IL10, IL12) und das Chemokin Makrophagen Chemoattraktorprotein 1 (MCP1). Man unterscheidet proinflammatorische (TNF $\alpha$ , IL6, IL12) und anti-inflammatorische (IL10) Zytokine. Des Weiteren gibt es Chemokine (MCP1), welche unter anderen die Regulation von Monozyten und T-Zellen beeinflussen. Zytokine werden unter anderem von Immunzellen sezerniert.



**Abb. 12: Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Serum.**

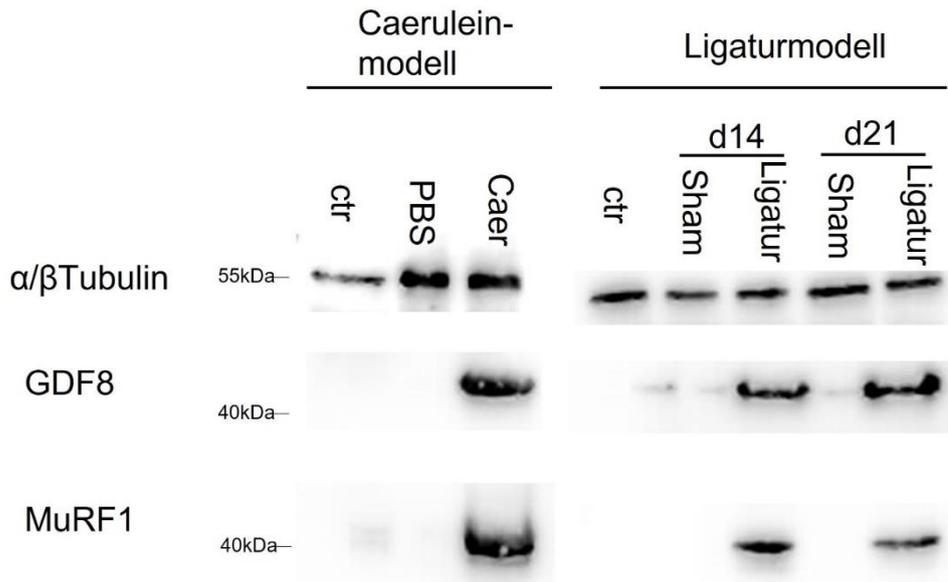
Die Serum-Zytokine wurde mittels fluoreszierender Beads durch Durchflusszytometrie gemessen. (A) Bei den mit Caerulein behandelten Tieren stiegen IL-12, TNF $\alpha$ , MCP-1 und IL-10 an Tag 72 signifikant im Vergleich zu den Kontrollen an. Für IL-6 konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. (B) Im Ligaturmodell konnte an Tag 14 nach Ligatur ein signifikanter Anstieg von IL-12 und TNF $\alpha$  beobachtet werden, wohingegen für IL-6, MCP-1 und IL-10 keine signifikanten Unterschiede bestanden. An Tag 21 konnten im Ligaturmodell für keines des gemessenen Zytokine Unterschiede beobachtet werden. Für die Messungen wurden mindestens n = 7 Mäuse verwendet. \*p < 0,05.

Die Bestimmung der Zytokinkonzentration stellt eine Momentaufnahme dar, da Zytokine eine sehr geringe Halbwertszeit haben. Die Konzentrationen der Zytokine IL-12, TNF $\alpha$ , MCP-1 und IL 10 waren nach 72 Tagen in den mit Caerulein behandelten Tieren signifikant erhöht (Abb. 12 A). Für IL-6 konnte kein Unterschied beobachtet werden. Im Ligaturmodell wiesen IL-12 und TNF $\alpha$  an Tag 14 eine signifikant erhöhte Konzentration in den ligierten Tieren auf (Abb. 12 B). Dieser Unterschied nivellierte sich an Tag 21. Die restlichen gemessenen Zytokine zeigten keine Unterschiede im Beobachtungszeitraum.

### **5.7 Untersuchung von Proteinabbauwegen im Skelettmuskel**

Die Expression des muskelspezifischen Wachstums-/Differenzierungsfaktors 8 (engl. growth differentiation factor 8, GDF8) und des Muskel RING-Finger Proteins 1 (MuRF1) wurden im Quadrizeps-Muskel auf Immunoblotebene (Western Blot) untersucht. Hiermit werden Proteine nach ihrer Größe elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Von GDF8 ist bekannt, dass es bei der Entwicklung und dem Wachstum von Säugetieren ein Negativregulator des Aufbaus von Skelettmuskelmasse ist. Weiter kontrolliert es die Proliferation von Myoblasten. Bei MuRF1 handelt es sich um eine E3 Ubiquitinligase, welche an der Expression von Herz-/Skelettmuskulaturproteinen beteiligt ist. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha/\beta$  Tubulin verwendet.

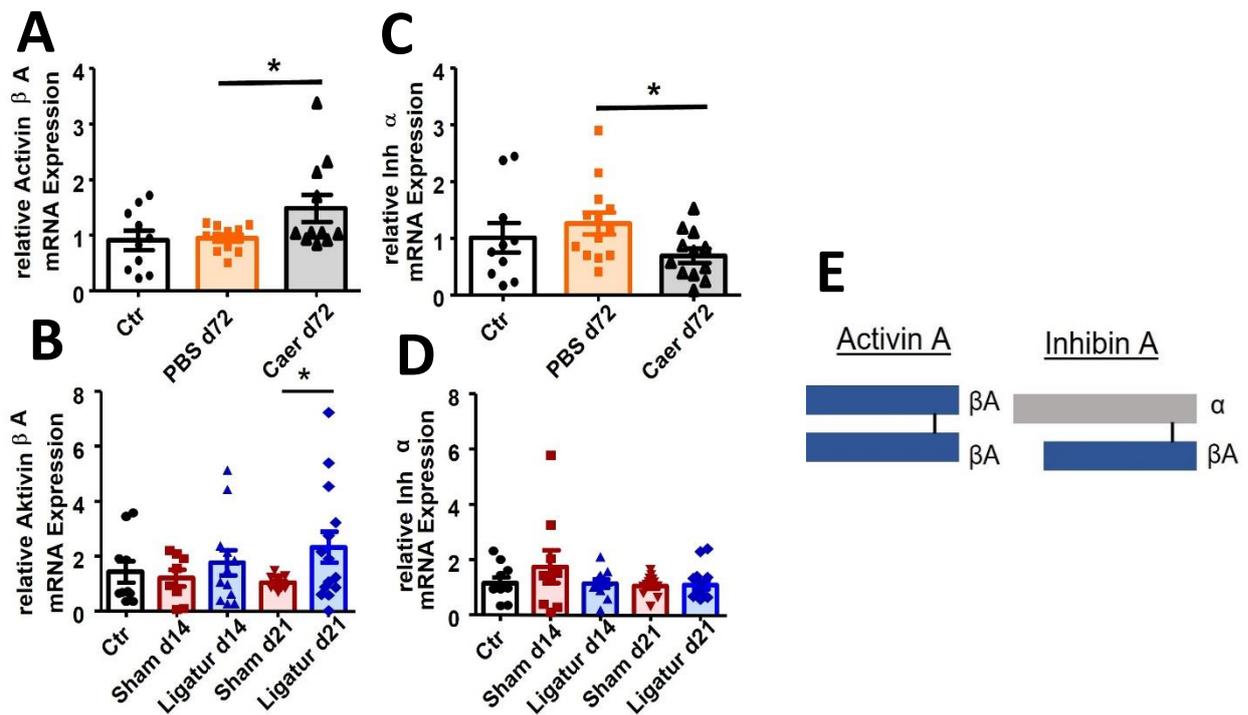
Mittels Western Blot konnte zunächst gezeigt werden, dass die Expression von  $\alpha/\beta$  Tubulin in allen Proben gleich stark war. Für GDF8 und MuRF1 fand sich im Caeruleinmodell, (Abb. 13 links) eine deutliche Expressionssteigerung gegenüber den mit PBS behandelten Kontrollen. Im Ligaturmodell (Abb. 13 rechts) erhöhte sich ebenfalls die Expression dieser beiden Proteine, was sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen zu erkennen war. Diese Ergebnisse deuten an, dass GDF8 und MuRF1 in beiden experimentellen Modellen für die chronische Pankreatitis beim Muskelabbau möglicherweise eine Rolle spielen.



**Abb. 13: GDF8 und MuRF1 Expression im Quadriceps-Muskel in der chronischen Pankreatitis.**

Sowohl im Caerulein- als auch Ligaturmodell finden sich deutliche Steigerungen der Proteinexpression von GDF8 und MuRF1 im Skelettmuskel. Die Expression der internen Ladekontrolle  $\alpha/\beta$  Tubulin bleibt hingegen unverändert.

Ferner wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren sowie deren Mediatoren im Skelettmuskel analysiert. Die Gruppe der „Activin/Inhibin Faktoren“ setzt sich aus verschiedenen Dimeren von Ketten zusammen. Die am häufigsten vorkommenden Ketten sind Inhibin  $\alpha$  und Activin  $\beta$ A. Die relative mRNA Expression wurde mittels qRT-PCR aus isolierter RNA des Quadrizeps-Muskels bestimmt. Die Expression der Activin  $\beta$ A Kette war nach 72 Tagen repetitiver Caerulein Injektionen erhöht (Abb. 14 A) was für eine Zunahme der Expression von Activin spricht, wohingegen die Expression von Inhibin  $\alpha$  an Tag 72 in den PBS-Kontrolltieren signifikant erhöht war (Abb. 14 C). Im Ligaturmodell war die Expression der Activin  $\beta$ A Kette nach 14 Tagen im Wesentlichen unverändert zu den Kontrollen, jedoch an Tag 21 in den ligierten Tieren signifikant erhöht (Abb. 14 B). Für die Expression von Inhibin  $\alpha$  konnten im Ligaturmodell hingegen keine Unterschiede gemessen werden (Abb. 14 D).

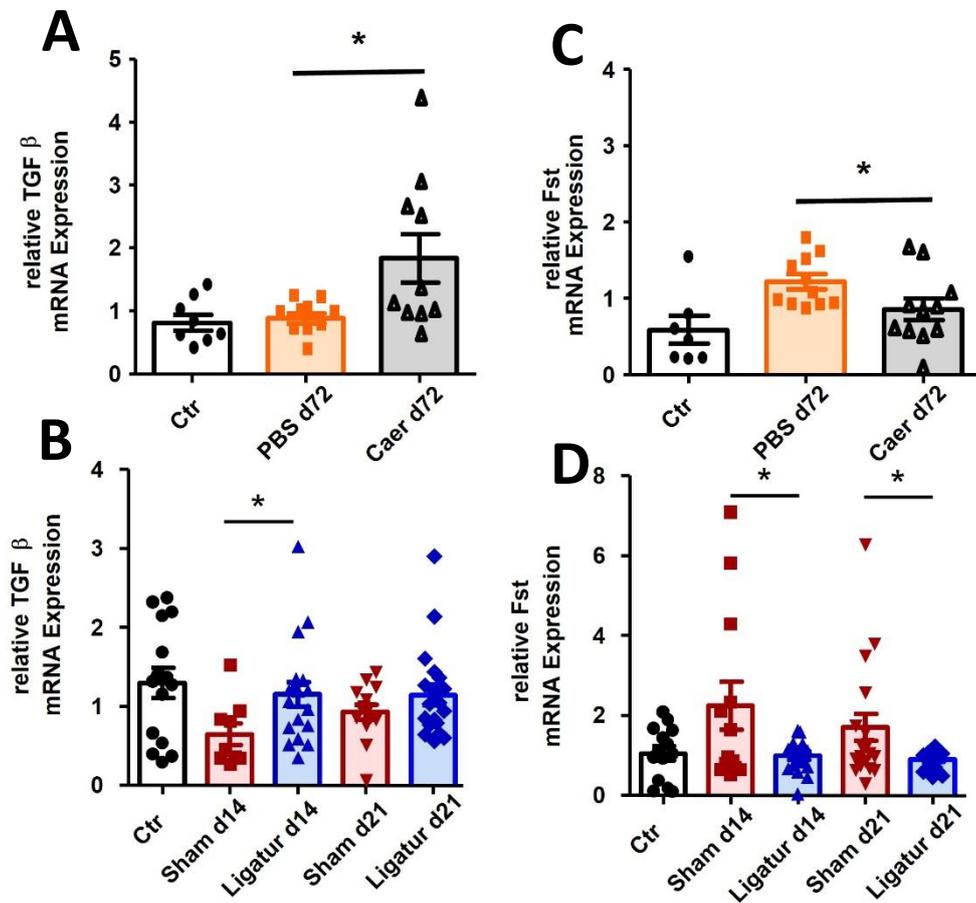


**Abb. 14: Expression von Activin und Inhibin in der chronische Pankreatitis.**

Relative mRNA Expressionen von Activin  $\beta$ A und Inhibin  $\alpha$  im Quadrizeps. Activin  $\beta$ A ist nach 72 Tagen repetitiver Caerulein Injektionen signifikant erhöht (A). Im Ligaturmodell zeigt sich nach Tag 14 kein Unterschied für Activin  $\beta$ A, nach Tag 21 ist es in den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur signifikant erhöht (B). Hingegen ist Inhibin  $\alpha$  an Tag 72 in den Kontrollen signifikant gegenüber den mit Caerulein behandelten Tieren erhöht (C). Im Ligaturmodell sind an Tag 14 und 21 keine Unterschiede messbar (D). Schematische Darstellung der einzelnen Ketten von Activin  $\beta$ A und Inhibin  $\alpha$  (E). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$  Actin verwendet.  $n \geq 7$ ,  $*p < 0,05$ .

Das Zytokin TGF $\beta$  (*transforming growth factor beta*) gehört zur Familie der TGF Wachstumsfaktoren. Es reguliert unter anderem die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen, die über Smad Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Das autokrine Glykoprotein Follistatin (FST) gehört als Gegenspieler ebenfalls zur Activin/Inhibin Familie und spielt eine wesentliche Rolle beim Aufbau und der Regeneration von Muskulatur. Die mRNA Expression von TGF $\beta$  im Quadrizeps war an Tag 72 nach repetitiver Caerulein Injektion signifikant erhöht (Abb. 15 A). Im Ligaturmodell war die Expression in den Tieren nach 14 Tagen signifikant erhöht. Dieser Unterschied glich sich an Tag 21 jedoch wieder an (Abb. 15 B). Die Expression von Follistatin reduzierte sich in beiden Modellen der chronischen Pankreatitis: Im Caeruleinmodell fand sich eine signifikante Reduktion an Tag 72 (Abb. 15 C).

Im Ligaturmodell war die Follistatin Expression sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen signifikant vermindert gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Abb. 15 D).

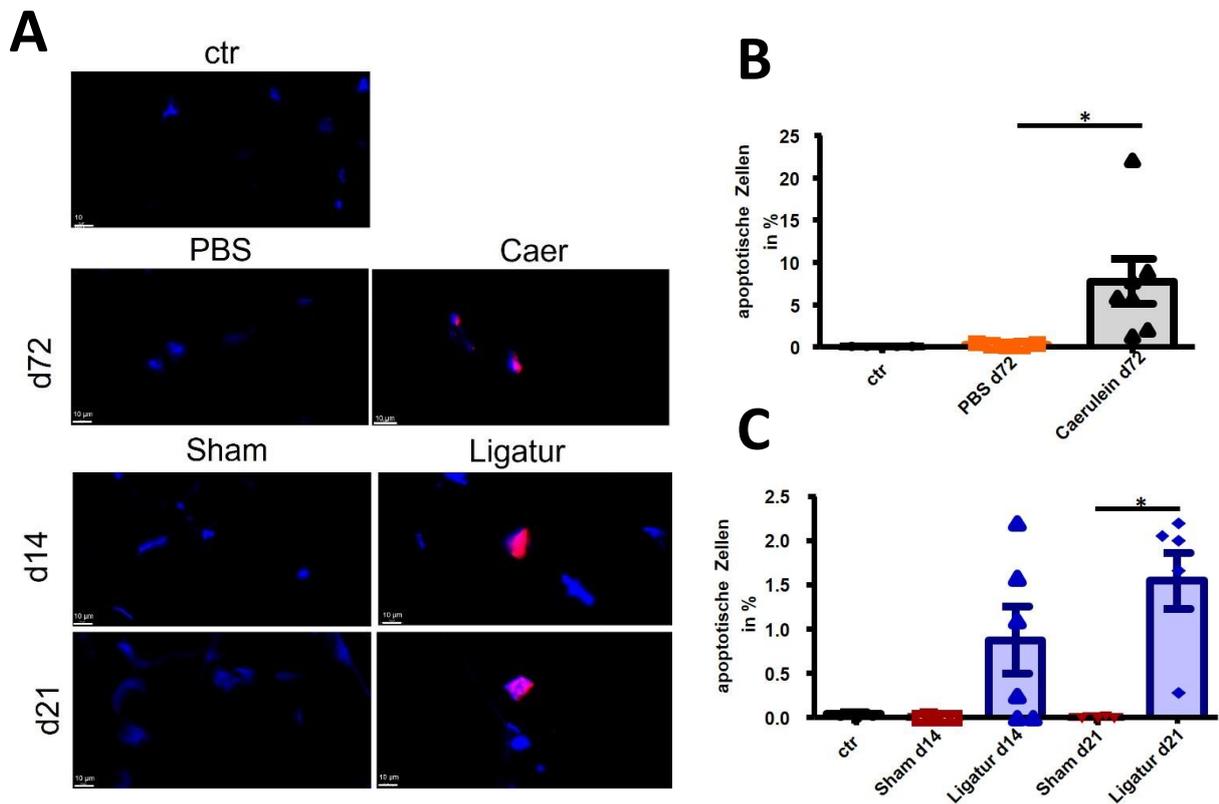


**Abb. 15: Expression von TGF $\beta$  und Follistatin.**

Die Expression von TGF $\beta$  im Skelettmuskel erhöhte sich in den mit Caerulein induzierten Tieren (A), bei den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur war die Expression an Tag 14 transient erhöht, glich sich an Tag 21 wieder an (B). Follistatin war an Tag 72 in den Caerulein-induzierten Tieren deutlich reduziert (C). Bei den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur zeigte sich sowohl an Tag 14 als auch an Tag 21 eine signifikante Reduktion der Follistatin Expression (D). Als Housekeeping Gen wurde  $\beta$  Actin verwendet.  $n \geq 7$ ,  $*p < 0,05$

## 5.8 Apoptose im Quadrizeps-Muskel

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen im Quadrizepsgewebe wurde in Kryoschnitten des Muskels eine TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Färbung angefertigt. Diese Methode dient der Anfärbung von DNA-Strangbrüchen, welche während der DNA-Fragmentierung in der letzten Phase der Apoptose auftreten.



**Abb. 16: Zunahme apoptotischer Zellen im *M. quadriceps femoris* während der chronischen Pankreatitis.**

(A) Fluoreszenz-Aufnahmen vom Quadrizepsquerschnitten nach TUNEL Färbung. Zellkerne werden blau (DAPI) und apoptotische Zellen violett (FITC) gefärbt. Es ist eine deutliche Zunahme an FITC positiven Zellen in den Muskeln nach Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis sowie nach Ligatur des Pankreasganges zu erkennen. (B) Eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen bestätigt im Caeruleinmodell eine signifikante Zunahme der Apoptose in den behandelten Tieren. (C) Nach Ligatur zeigen sich an Tag 14 vermehrt apoptotische Zellen, nach Tag 21 wurde dieser Unterschied signifikant. Es wurde je ein kompletter Quadrizepsquerschnitt in jeweils mind. 6 Tieren ausgewertet. \*  $p < 0,05$ .

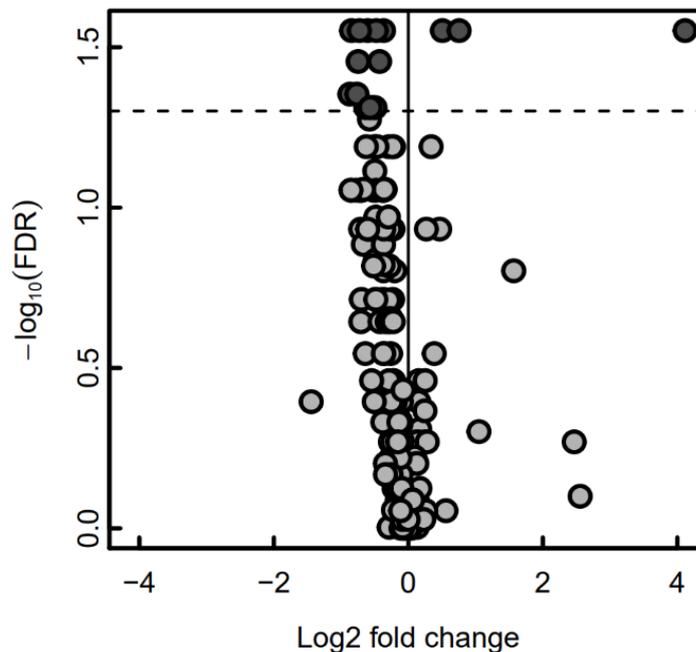
Es konnte gezeigt werden, dass es in beiden Modellen zu einer Zunahme an apoptotischen Zellen im Skelettmuskel kommt (Abb. 16 A). Diese war sowohl im Caeruleinmodell als auch im Ligaturmodell zu den jeweiligen Endzeitpunkten statistisch signifikant erhöht, wohingegen nach 14 Tagen bereits ein Trend zu einer vermehrten Apoptose beobachtet wurde (Abb. 16 B und C).

## 5.9 Bestimmung des Serummetaboloms in der chronischen Pankreatitis

Als Metabolom wird die Gesamtheit der niedermolekularen stoffwechselaktiven Bestandteile eines Systems, Organs oder biologischen Flüssigkeit bezeichnet. Das Metabolom kann unter anderem zur molekularen Phänotypisierung und damit zur Identifizierung von Biomarkern genutzt werden. Ziel der Metabolom-Analysen war die Charakterisierung von Stoffwechselformen sarkopener Mäuse mit chronischer Pankreatitis und der Vergleich mit Tieren ohne chronische Pankreatitis.

### 5.9.1 Caeruleinmodell

Zur Bestimmung der Unterschiede der Serummetabolite zwischen chronischer Pankreatitis und Kontrollen wurden Seren von Tieren mit Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis und von mit PBS behandelten Tieren gemessen und verglichen. Es fanden sich einige Metabolite über dem Signifikanzniveau im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 17). Weiter haben sie einen positiven sowie negativen *log<sub>2</sub> fold change*. Der *fold change* ist ein Maß welcher die Änderung zwischen zwei Messungen beschreibt. Der *log<sub>2</sub> fold change* beschreibt eine logarithmische Veränderung zur Basis 2. Demnach sind einige Metabolite im Serum der Caerulein Tiere erhöht und andere vermindert.



**Abb. 17: Veränderungen der Serummetabolite im Caeruleinmodell (an Tag 72).**

Vulkandiagramm der gesamten gemessenen Serummetabolite mit Vergleich zwischen Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis und Kontrollen an Tag 72. Es finden sich global signifikante Veränderungen der Metabolite mit Hoch- bzw. Herunterregulation einzelner Metabolite.

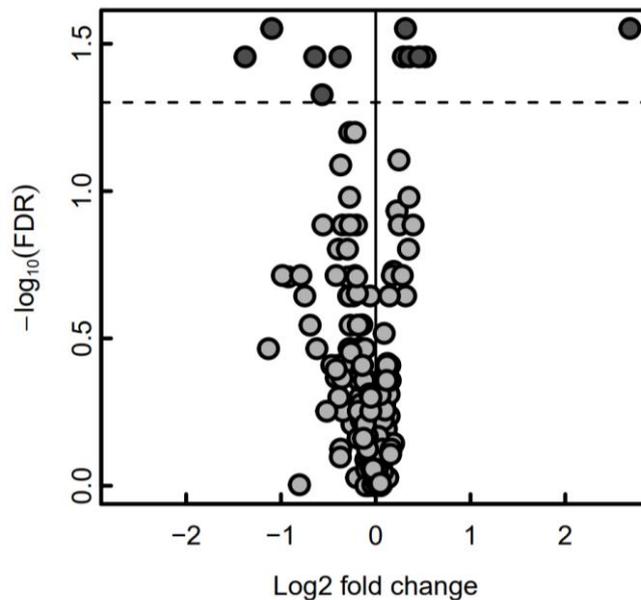
Die Metabolite, welche sich über dem Signifikanzniveau befinden, sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die größten Zunahmen in der chronischen Pankreatitis waren für Cholsäure und Phosphatidylcholin (aa.C42.4) zu beobachten. Die stärksten negativen Änderungen zeigten sich für Sphingomyelin (C24.0) und Ceramid (d18.1/24.0).

**Tabelle 6: Serummetabolite im Caeruleinmodell an Tag 72.**

Metabolite name	Fold change	p Value	FDR
Asymmetric dimethylarginine	7,74*10 <sup>-01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Homocysteine	6,57*10 <sup>-01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Cholic acid	1,73*10 <sup>+01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Ceramide (d18.1/24.0)	5,56*10 <sup>-01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Lysophosphatidylcholin (a.C16.1)	1,42	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (aa.C38.4)	7,18*10 <sup>-01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (aa.C40.6)	6,04*10 <sup>-01</sup>	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
3-Indolepropionic acid	1,69	1,17*10 <sup>-03</sup>	2,81*10 <sup>-02</sup>
Ceramide (d18.1/22.0)	5,96*10 <sup>-01</sup>	2,33*10 <sup>-03</sup>	3,50*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (aa.C38.6)	7,43*10 <sup>-01</sup>	2,33*10 <sup>-03</sup>	3,50*10 <sup>-02</sup>
Sphingomyelin (OH) (C22.1)	5,48*10 <sup>-01</sup>	3,32*10 <sup>-03</sup>	4,43*10 <sup>-02</sup>
Sphingomyelin (C24.0)	5,89*10 <sup>-01</sup>	3,36*10 <sup>-03</sup>	4,43*10 <sup>-02</sup>
Ceramide (d18.1/23.0)	6,88*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (aa.C42.4)	6,71*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (aa.C42.6)	6,45*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (ae.C40.4)	6,96*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>
Phosphatidylcholin (ae.C40.6)	7,09*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>
Sphingomyelin (C24.1)	6,75*10 <sup>-01</sup>	4,66*10 <sup>-03</sup>	4,88*10 <sup>-02</sup>

### 5.9.2 Ligaturmodell

Analog zum Caerulein-Modell wurden die Unterschiede der Serummetabolite von Tieren mit Pankreasgang-Ligatur und von Sham-operierten Tieren gemessen und verglichen. Auch in diesem Modell fanden sich die Spiegel einzelner Metabolite gegenüber den Kontrollen oberhalb des Signifikanzniveaus verändert, wobei diese Unterschiede lediglich an Tag 14 bestanden (Abb. 18). Im Vergleich der zwei Gruppen zu einem späteren Zeitpunkt, an Tag 21 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 19)



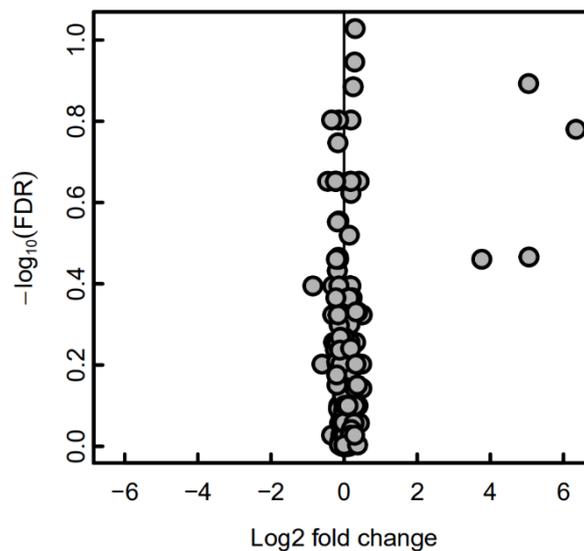
**Abb. 18: Veränderungen der Serummetabolite im Ligaturmodell (an Tag 14).**

Vulkandiagramm der gesamten gemessenen Serummetabolite mit Vergleich zwischen Pankreasgangligatur-induzierter Pankreatitis und Kontrollen an Tag 14. Es finden sich signifikante Veränderungen der Metabolite, wo sich ebenfalls Hoch- und Herunterregulationen einzelner Metabolite zeigen.

Die Metabolite, welche sich an Tag 14 nach Ligatur über dem Signifikanzniveau befinden, sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Aminosäure Cystin wies die stärkste Zunahme in der chronischen Pankreatitis auf, bei weiteren Aminosäuren (Cystein, Histidin, Valin, Leucin, Isoleucin) fanden sich ebenfalls Erhöhungen der Serumspiegel, die jedoch nicht so stark wie bei Cystin waren. Für die Triglyceride 16.1\_34.3 und 14.0\_34.3 fanden sich die stärksten Verminderungen.

**Tabelle 7: Serummetabolite im Ligaturmodell an Tag 14.**

Metabolite name	Fold change	p Value	FDR
Valine	1.24	5.83*10 <sup>-04</sup>	2.81*10 <sup>-02</sup>
Cystine	6.42	5.83*10 <sup>-04</sup>	2.81*10 <sup>-02</sup>
Triglycerides (14.0_34.3)	4.68*10 <sup>-01</sup>	1.17*10 <sup>-03</sup>	2.81*10 <sup>-02</sup>
Cysteine	1.43	2.33*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Histidine	1.22	2.33*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Isoleucine	1.28	2.14*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Leucine	1.37	2.07*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Diglycerides (16.1_18.2)	6.41*10 <sup>-01</sup>	2.33*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Lysophosphatidylcholin (a.C16.1)	7.70*10 <sup>-01</sup>	2.33*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Triglycerides (16.1_34.3)	3.85*10 <sup>-01</sup>	2.33*10 <sup>-03</sup>	3.50*10 <sup>-02</sup>
Trimethylamine N-oxide	6.75*10 <sup>-01</sup>	4.08*10 <sup>-03</sup>	4.71*10 <sup>-02</sup>



**Abb. 19: Veränderungen der Serummetabolite im Ligaturmodell (an Tag 21).**

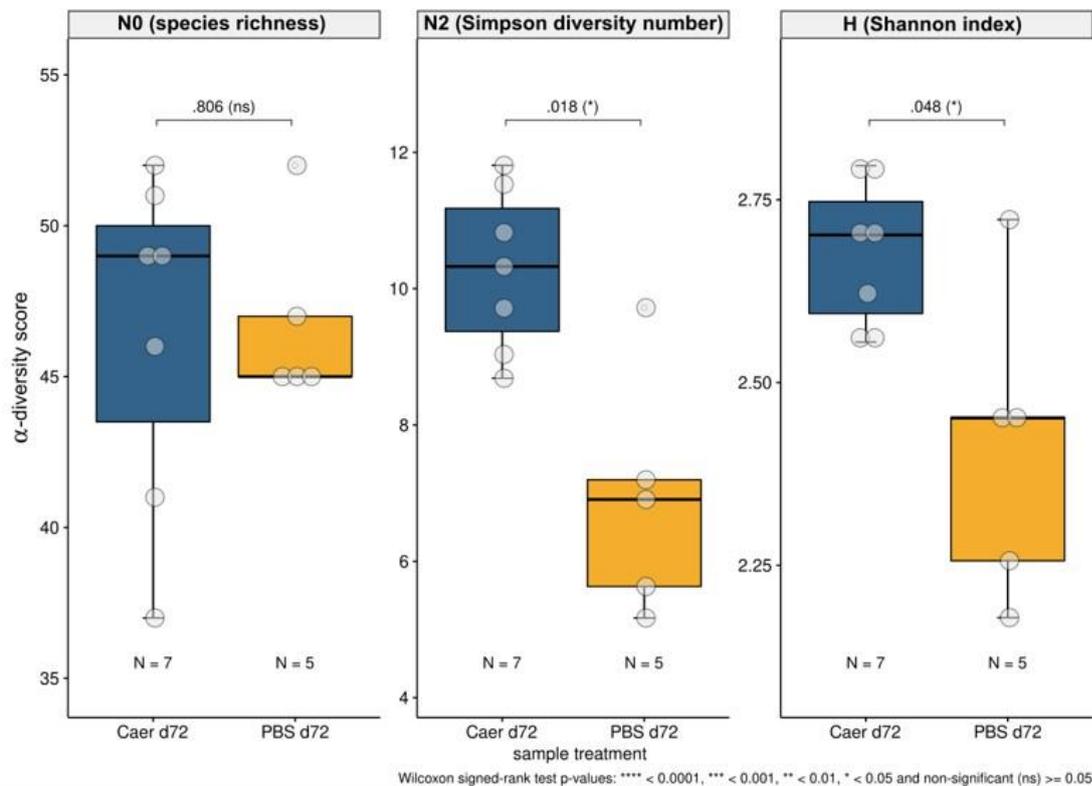
Vulkandiagramm der Serummetabolite mit Vergleich Ligatur-Tiere mit sham-operierten Tieren an Tag 21. Es finden sich keine signifikanten Veränderungen der Metabolite.

## 5.10 Stuhlmikrobiom

Als Mikrobiom wird die Gesamtheit aller Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren) beschrieben. Es umfasst die Mikrobiota, ihre Gene und Stoffwechselprodukte. Der Darm ist Lebensraum einer großen Anzahl an Mikroorganismen und bildet auch die sogenannte Darmflora. Die Zusammensetzung ist variabel und wird zum Beispiel vom Gesundheitszustand, der Ernährung und von Medikamenten beeinflusst. Die Daten liegen als Punktwolke in einem p-dimensionalen kartesischen Koordinatensystem vor.

### 5.10.1 Caeruleinmodell

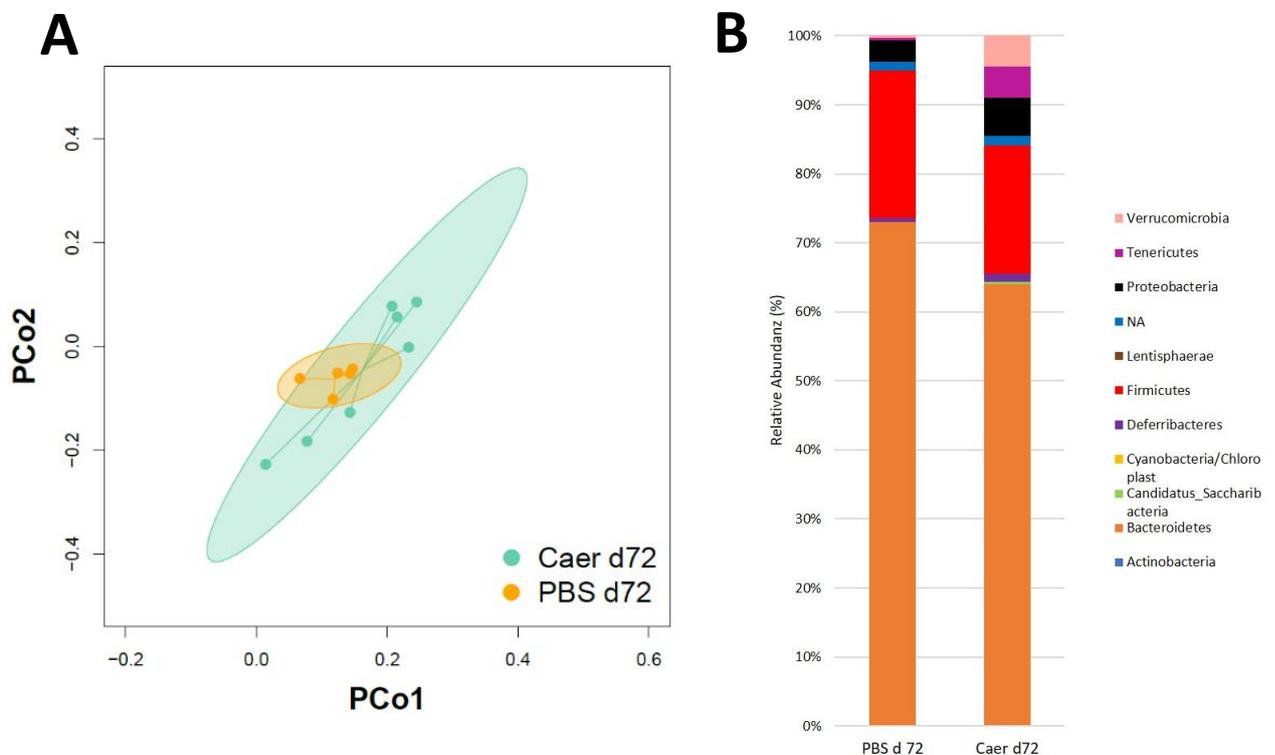
Für den Artenreichtum („species richness“) zeigte sich in dem Vergleich von chronischer Caerulein-induzierter Pankreatitis und Kontrollen kein signifikanter Unterschied (Abb. 20 links). Um die Diversität zu beschreiben, wurden die Simpson Diversität und der Shannon Index genutzt. Im Vergleich des fäkalen Mikrobioms von Mäusen mit chronischer Pankreatitis auf dem Boden repetitiver Caerulein-Injektionen an Tag 72 mit Kontrollen, die PBS erhalten haben, zeigte sich, dass beide Diversitäten, gemessen an dem Simpson und dem Shannon-Index, in den Caerulein-Tieren signifikant erhöht waren (Abb. 20).



**Abb. 20: Artenreichtum und Diversität des Stuhlmikrobioms in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis und PBS Kontrollen an Tag 72.**

Bezüglich des Artenreichtums (links) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der Simpson Index (Mitte) war für die mit Caerulein behandelten Tiere signifikant erhöht. Der Shannon Index (rechts) war für die mit Caerulein behandelten Tiere ebenfalls signifikant erhöht. n = 7.

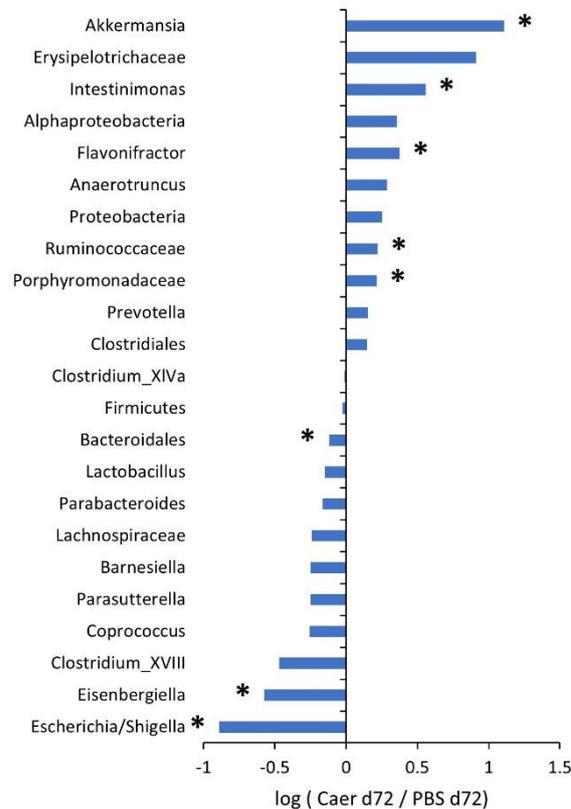
Um die Unterschiede der Darmmikrobiom-Zusammensetzungen besser zu strukturieren, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCoA) durchgeführt. Die Abb. 21 A stellt eine räumliche Trennung der Stuhlmikrobiota von den mit Caerulein behandelten Tieren (Cyan) und den Kontrollen (Orange) dar. Die beiden Cluster überlappten sich, wobei die Caerulein Tiere eine hohe Streuung aufwiesen, was für eine erhöhte Diversität der Messpunkte spricht. Auf Gattungsebene zeigte sich, dass Bacteroidetes und Firmicutes sowohl in der chronischen Pankreatitis als auch in den Kontrollen die dominierenden Gattungen waren (Abb. 21 B). Jedoch waren auch Unterschiede sichtbar. In Mäusen mit Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis nahmen im Vergleich zu mit PBS behandelten Mäusen die Gattungen Tenericutes, Proteobacteria und Verrucomicrobia zu.



**Abb. 21: Zusammensetzung des Stuhlmikrobioms im Caeruleinmodell.**

(A) Hauptkomponentenanalyse (PCoA) basierend auf Bray-Curtis Unähnlichkeit. Orange und cyane Punkte stellen Proben von mit PBS und mit Caerulein behandelten Tieren da. (B) Durchschnittliche Stuhlzusammensetzung der Mikrobiota. Die gestapelten Balkendiagramme zeigen die mittlere relative Häufigkeit der Mikrobiota an. n = 7.

Eine detaillierte Analyse zeigt weitere Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In der Caerulein-Gruppe fand sich eine signifikante Zunahme von Akkermansia, Intestinimonas, Flavonifractor, Ruminococcaceae und Porphyromonadaceae (Abb. 22). waren Bacteroidales, Eisenbergiella und Escherichia/Shigella signifikant vermindert.

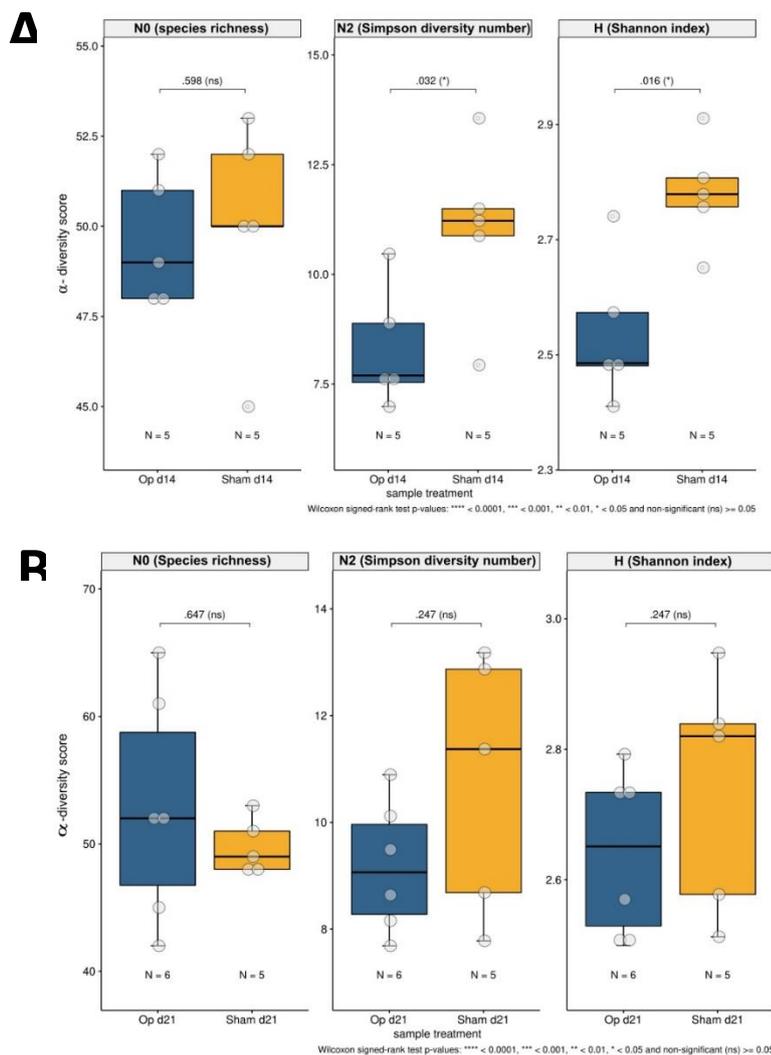


**Abb. 22: Veränderungen der Stuhlmikrobiota in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis.**

Dargestellt sind Mikrobiota, die sich in ihrer Häufigkeit an Tag 72 nach Behandlungsbeginn verändern. Die Änderungen wurden als logarithmische Änderung des mittleren Häufigkeitsverhältnisses dargestellt (Caer/PBS). Signifikante Änderungen nach Student's t Test sind mit einem Asterisk (\*) gekennzeichnet. \*:  $p \leq 0,05$ ,  $n = 7$ .

## 5.10.2 Ligaturmodell

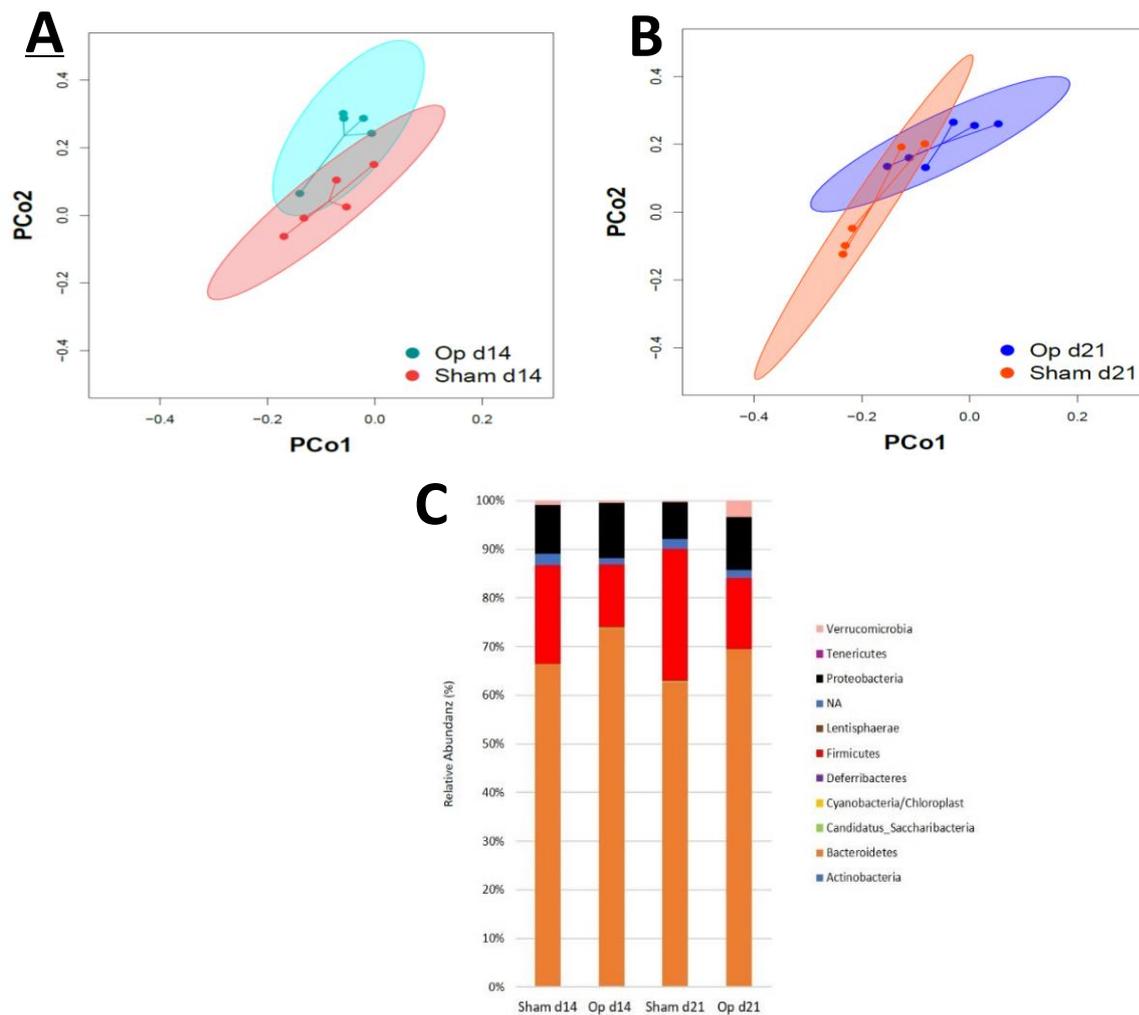
Analog zum Caeruleinmodell fand sich für den Artenreichtum auch im Ligaturmodell der chronischen Pankreatitis weder nach 14 noch nach 21 Tagen ein signifikanter Unterschied (Abb. 23). Im Unterschied zur Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis waren im Ligaturmodell an Tag 14 sowohl der Simpson als auch der Shannon Index signifikant vermindert, was auf eine verringerte Diversität der Mikrobiota hinweist (Abb. 23 A). Dieser Unterschied zeigte sich tendenziell auch an Tag 21 nach Ligatur, d.h. zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung, war jedoch nicht mehr statistisch signifikant (Abb. 23 B).



**Abb. 23 Artenreichtum und Diversität des Stuhlmikrobioms im Modell der chronischen Pankreatitis nach Pankreasgangligatur Ligaturmodell.**

An Tag 14 nach Ligatur (A) zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Artenreichtum (links). Der Simpson Index (Mitte) war bei den Tieren mit Ligatur signifikant erniedrigt. Der Shannon Index (rechts) war ebenfalls signifikant erniedrigt. An Tag 21 nach Ligatur (B) zeigten sich weder im Artenreichtum noch in der Diversität signifikante Unterschiede.  $n \geq 5$ .

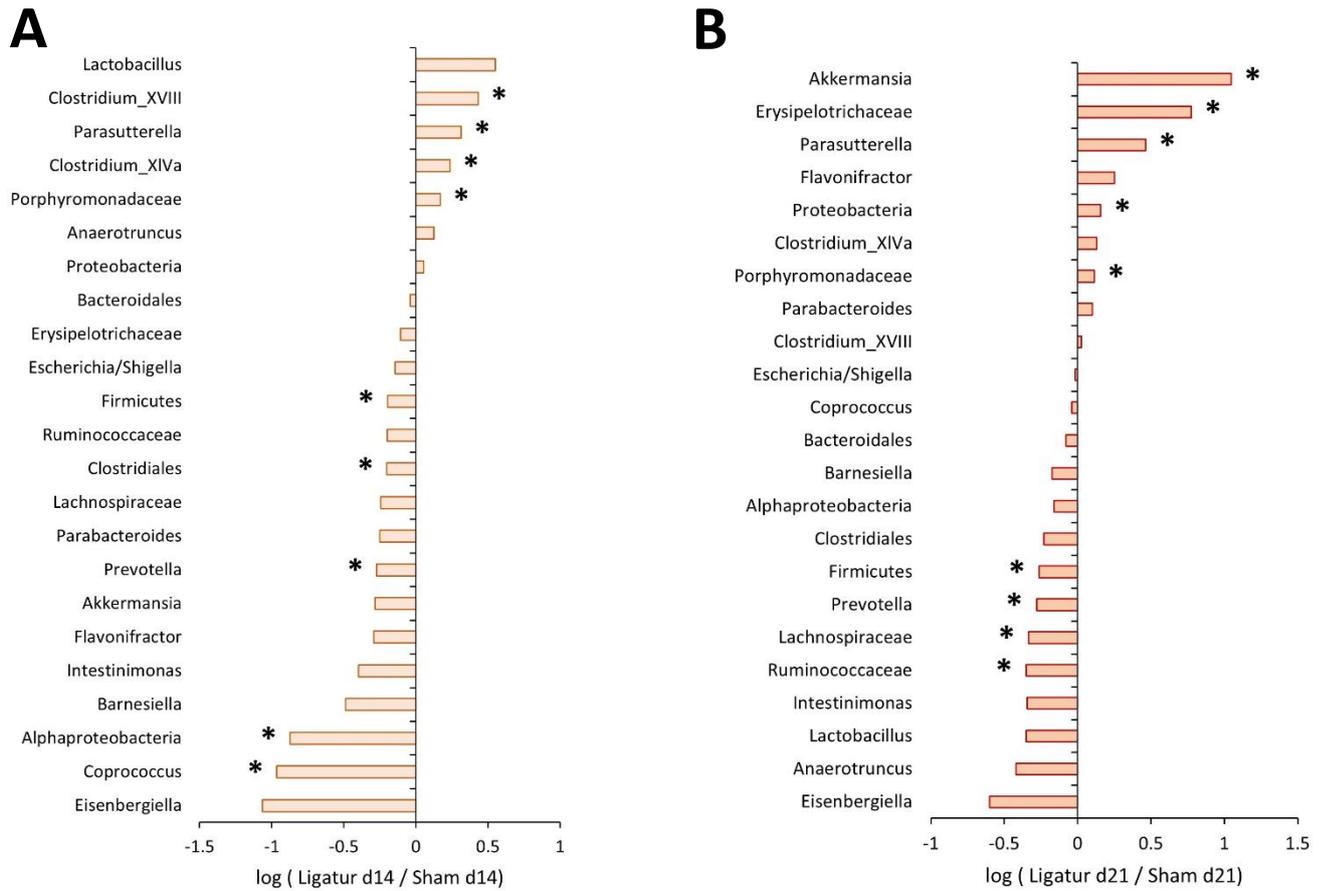
Die PCoA zeigte eine räumliche Trennung der Mikrobiota-Zusammensetzungen von den Tieren mit Ligatur an Tag 14 (Cyan) und den Kontrollen (Rot) (Abb. 24 A). Die Abb. 24 B, verdeutlicht, dass auch an Tag 21 eine räumliche Trennung von Tieren mit Ligatur induzierter chronischer Pankreatitis (Blau) und den entsprechenden Kontrollen (Orange) besteht. Dabei fällt auf, dass die sham-operierten Kontrollen des Ligaturmodells im Vergleich zu den PBS Kontrollen des Caeruleinmodells eine größere Streuung aufweisen. Die an chronischer Pankreatitis erkrankten Mäuse wiesen in beiden Modellen eine erhöhte Streuung auf. Auf Gattungsebene fanden sich analog zum Caeruleinmodell Bacteroidetes und Firmicutes als die dominierenden Gattungen in sämtlichen Versuchsgruppen (Abb. 24 C). Veränderungen in der Zusammensetzung der Gattungen zwischen Kontrollen und ligierten Tieren fanden sich sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen nach Ligatur mit einer Verminderung von Firmicutes und einem Anstieg von Bacteroidetes im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Weiter zeigte sich an Tag 21 nach Ligatur eine Zunahme von Verrucomicrobia.



**Abb. 24: Zusammensetzung des Stuhlmikrobioms im Ligaturmodell.**

Hauptkomponentenanalyse (PCoA) basierend auf Bray-Curtis Unähnlichkeit. (A) Rote und cyane Punkte repräsentieren sham-operierte und ligierte Tiere zum Zeitpunkt 14 Tage nach Pankreasgangligatur. (B) Rote und blaue Punkte stellen sham-operierte und ligierte Tiere nach 21 Tagen da. Bei Tieren mit einer chronischen Pankreatitis verschob sich die Mikrobiota-Zusammensetzung gegenüber den Kontrollen deutlich. (C) Durchschnittliche Stuhlzusammensetzung der Mikrobiota. Die gestapelten Balkendiagramme zeigen die mittlere relative Häufigkeit der Mikrobiota an.  $n \geq 5$ .

Die Abb. 25 A zeigt, dass in den Tieren mit Pankreasgangligatur an Tag 14 die Häufigkeiten von Clostridium XVIII, Parasuterella, Clostridium XIVa und Porphyromonadaceae deutlich zunehmen. Dagegen reduzierten sich Firmicutes, Clostridiales, Prevotella Alphaproteobacteria und Coprococcus signifikant. An Tag 21 (Abb. 25 B) nach Ligatur fand sich eine signifikante Zunahme von Akkermansia, Erysipelotrichaceae, Parasutterella, Proteobacteria und Porphyromonadaceae in den ligierten Tieren. Umgekehrt waren Firmicutes, Prevotella, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae in den Tieren mit Ligatur signifikant gegenüber den Kontrollen vermindert.



**Abb. 25: Veränderungen der Stuhl­mikrobiota in der durch Ligatur des Pankreasganges induzierten chronischen Pankreatitis (an Tag 14 und 21).**

Abgebildet sind Mikrobiota, die sich in ihrer Häufigkeit an Tag 14 (A) und Tag 21 (B) nach Pankreasgangligatur verändern. Die Änderungen wurden als logarithmische Änderung des mittleren Häufigkeitsverhältnisses dargestellt (Ligatur/Sham). Signifikante Änderungen nach Student's t Test sind mit einem Asterisk gekennzeichnet \*:  $p \leq 0,05$ ,  $n \geq 5$ .

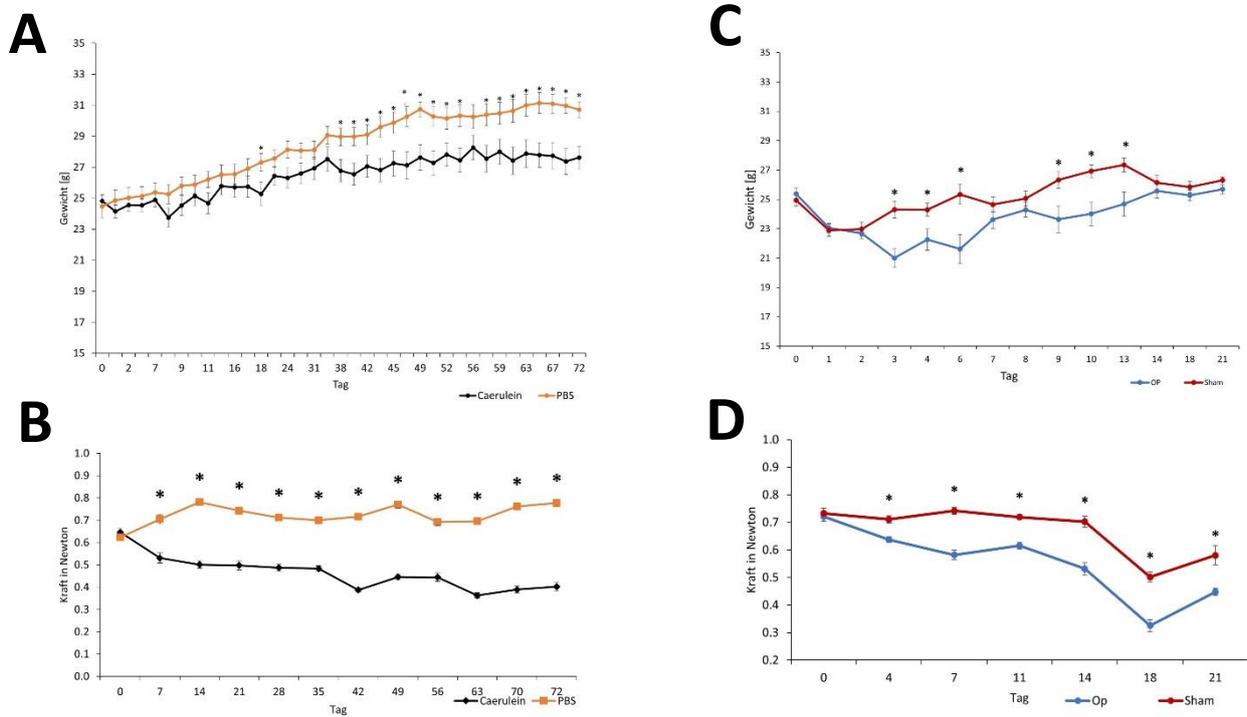
## **5.11 Untersuchung der Sarkopenie in der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät**

### **5.11.1 Verlust von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis**

Analog zu den Versuchen unter Verwendung von normalem Futter wurden eine chronische Pankreatitis auch in Mäusen induziert, die vorab eine fettangereicherte Diät erhalten hatten. Diese hatte einen Rohfettgehalt von 11 % (die Standarddiät enthält 4,8% Rohfett) und wurde bereits 4 Wochen vor Induktion der chronischen Pankreatitis den Mäusen als Futter begonnen. Ziel dieser Versuchsreihe war die Klärung, ob bei Vorliegen einer exokrinen Insuffizienz das fettreiche Futter möglicherweise zu einer Verstärkung einer Malabsorption und konsekutiv zu einem verstärkten Gewichts- und Kraftverlust führt. In beiden Modellen mit einer Hochfettdiät wurden das Körpergewicht sowie die skelettale Muskelkraft der Tiere erfasst. Sowohl der Gewichtsverlauf als auch die Muskelkraft wiesen im Vergleich zur chronischen Pankreatitis unter Standardfutter Gemeinsamkeiten und einige Unterschiede auf: Im Caeruleinmodell und Hochfettdiät verloren die Mäuse mit chronischer Pankreatitis ähnlich wie bei den Versuchsbedingungen unter Standardfutter signifikant Körpergewicht, wobei die Unterschiede sich später manifestierten. Im Caerulein-induzierten Pankreatitismodell fand sich erst nach etwa einem Monat ein anhaltender signifikanter Unterschied im Körpergewicht, wohingegen im Ligaturmodell signifikante Unterschiede nur vorübergehend bestanden und sich bei Versuchsende nach 21 Tagen wieder ausglich (Abb. 26 A). Analog wurde die Muskelkraft der Tiere im Verlauf der 72 Tage mehrfach gemessen. Dabei zeigten die Tiere mit Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis ab Tag 7 eine signifikant reduzierte Muskelkraft im Vergleich zu den Kontrollen, die ebenfalls in etwa vergleichbar mit dem Modell unter normalem Futter war.

Auch bei Verwendung des Ligaturmodells und Hochfettdiät reduzierte sich bei den Mäusen das Körpergewicht im Vergleich zu sham-operierten Tieren, wobei sich vorübergehend signifikante Gewichtsunterschiede fanden und diese sich am Beobachtungsende ab Tag 18 wieder ausglich (Abb. 26 B). Ebenso wurde die Muskelkraft der Tiere mehrfach vermessen. Bereits am vierten Tag nach Ligatur wiesen die Tiere eine signifikant verminderte Muskelkraft auf, wobei der Unterschied zu den Kontrollen über den Beobachtungszeitraum bestehen blieb.

m Vergleich mit dem Ligaturmodell und normaler Kost waren die Unterschiede zwischen den Mäusen mit chronischer Pankreatitis und sham-operierten Kontrollen in etwa vergleichbar.

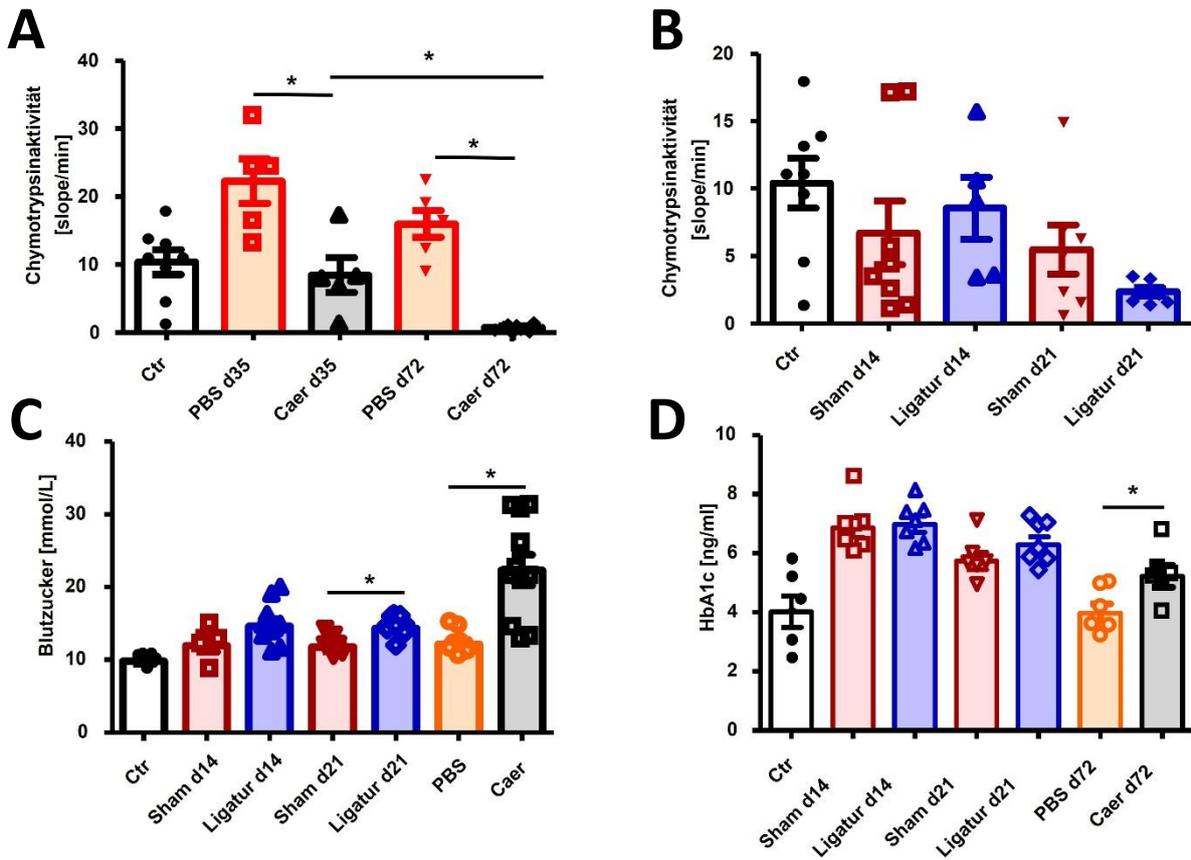


**Abb. 26: Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft während der chronischen Pankreatitis unter fettreicher Diät.**

Die Änderungen von Körpergewicht und Muskelkraft wurden in beiden Modellen im Verlauf der Erkrankung aufgezeichnet. Das Gewicht der mit Caerulein behandelten Tiere (A) ist verglichen mit den Kontrollen ab Tag 18 signifikant vermindert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Tagen lag das Gewicht der behandelten Tiere unter dem der Kontrollen. Das Gewicht der Tiere mit Pankreasgangligatur reduzierte sich nach dem dritten Tag signifikant und blieb bis Tag 14 unter dem der Kontrollen. Ab Tag 18 glichen sich die Unterschiede wieder an (B). Die Änderung der Muskelkraft wurde ebenso vermessen (C und D). Im Caeruleinmodell (C) war die Muskelkraft der behandelten Tiere ab Tag 7 signifikant gegenüber den mit PBS behandelten Tieren reduziert und blieb bestehen. Im Ligaturmodell (D) war die Muskelkraft der operierten Tiere an Tag 4 nach der Ligatur signifikant geringer. Beginnend ab Tag 7 vergrößerte sich der Unterschied leicht und blieb bis zum Versuchsende bestehen. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM angegeben. \* $p < 0,05$ ,  $n = 7$ .

### **5.11.2 Beurteilung der endo- und exokrinen Funktion in beiden Modellen**

Die Messung der Chymotrypsinaktivität im Stuhl zeigte für das Caeruleinmodell (Abb. 27 A) bereits nach 35 Tagen einen signifikant verminderten Wert im Vergleich zu Kontrollen, die mit PBS behandelt wurden. Auch nach 72 Tagen bleibt die Chymotrypsinaktivität in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis und Hochfettdiät gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Im Ligaturmodell (Abb. 27 B) konnten zu den Zeitpunkten 14 und 21 Tage nach Ligatur keine signifikanten Unterschiede im Stuhl-Chymotrypsin zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die Messung des HbA1c ergab nach 14 und 21 Tagen keine Unterschiede zwischen Tieren mit chronischer Pankreatitis und Kontrollen, wohingegen sich im Caeruleinmodell sich Differenzen des HbA1c zeigten (Abb. 27 D). Ähnlich waren die Verläufe des Gelegenheitsblutzuckers in beiden Modellen. Während in der Ligatur-induzierten chronischen Pankreatitis die Unterschiede zwischen erkrankten Mäusen und Kontrollen nur marginal waren, so fanden sich in der Caerulein-induzierten Pankreatitis deutlich erhöhte Blutzuckerspiegel in den Mäusen mit chronischer Pankreatitis (Abb. 27 C). Vergleicht man beide Versuchsansätze mit Normal- und Hochfettdiät, so zeigt sich, dass die beiden Modelle bei der Aktivität von Chymotrypsin sehr ähnliche Messwerte aufwiesen. Gleiches zeigte sich für HbA1c. Beim Gelegenheitsblutzucker wiesen die Ligaturtiere an Tag 21 einen signifikant erhöhten Wert auf, wohingegen bei den Tieren unter Normaldiät keine signifikante Veränderung zu erkennen war. Beide Modelle zeigten somit vergleichbare Veränderungen der endo- und exokrinen Funktion des Pankreas.



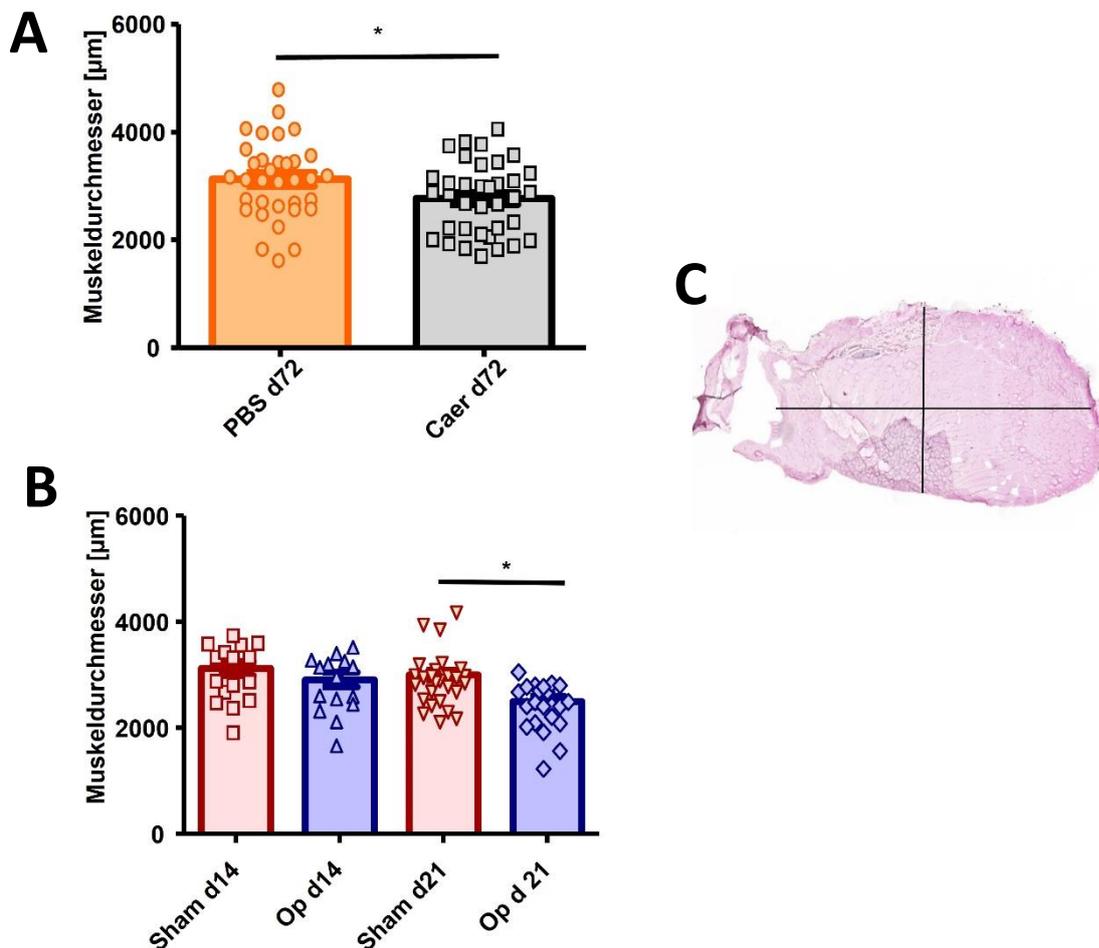
**Abb. 27: Bestimmung der endo- und exokrinen Pankreasfunktion unter fettreicher Diät.**

Die Aktivität von Chymotrypsin im Stuhl ist im Caeruleinmodell (A) bereits nach 35 Tagen signifikant im Vergleich zur PBS Gruppe reduziert und bleibt auch nach 72 Tagen bestehen. Im Ligaturmodell (B) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Gelegenheitsblutzucker, dessen Erhöhung eine diabetische Stoffwechsellaage anzeigt, (C) war in Mäusen mit chronischer Pankreatitis durch Pankreasgangligatur nach 21 Tagen gegenüber sham-operierten Tieren erhöht, jedoch nicht nach 14 Tagen. Im Caeruleinmodell war nach 72 Tag eine deutliche Hyperglykämie zu beobachten. Für den HbA1c (D) fanden sich im Ligaturmodell keine Unterschiede, im Caeruleinmodell jedoch eine Erhöhung. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM angegeben. \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

### 5.11.3 Quadrizeps-Muskeldurchmesser in der chronischen Pankreatitis unter fettreicher Diät

Analog zu den Versuchen mit Standardfutter wurde auch im Versuchsansatz mit fettreichem Futter der Durchmesser des Quadrizepsmuskels mittels HE Färbungen bestimmt. Dafür wurden Querschnitte angefertigt und der Durchmesser in zwei Ebenen ausgemessen. Es wurden nur die Beobachtungsendpunkte vermessen.

Tiere, bei denen durch repetitive Caerulein-Injektionen eine chronische Pankreatitis induziert wurde (Abb. 28 A), hatten nach 72 Tagen einen signifikant reduzierten Durchmesser des Quadrizeps-Muskels im Vergleich zur PBS Gruppe. Im Ligaturmodell (Abb. 28 B) verringerte sich ebenso an Tag 21 nach Ligatur der Muskeldurchmesser signifikant gegenüber Sham-operierten Tieren, jedoch war zu einem früheren Zeitpunkt, an Tag 14, kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

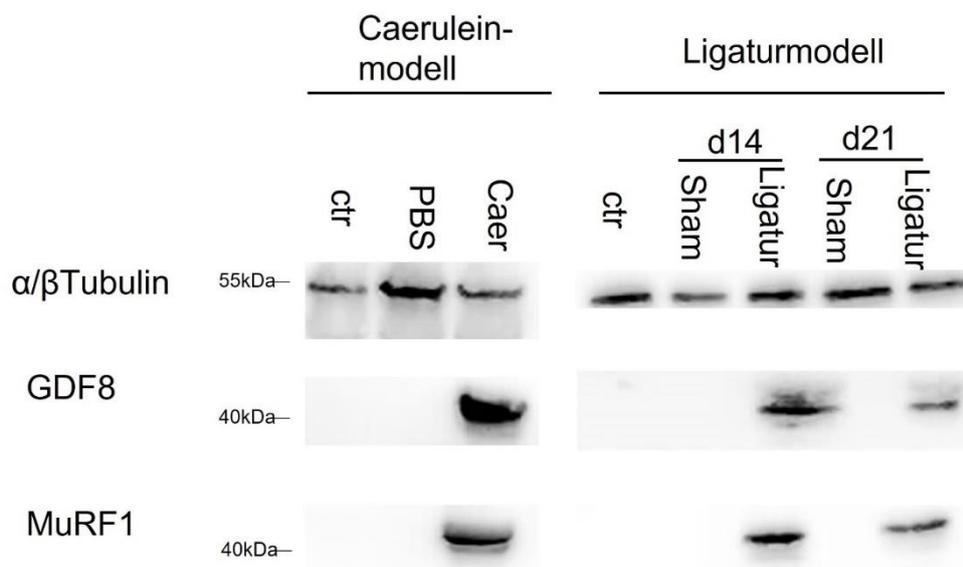


**Abb. 28: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis.**

Die Messung der Quadriceps-Durchmesser erfolgte über HE gefärbte Querschnitte. (A) An Tag 72 war der Quadrizepsdurchmesser der mit Caerulein behandelten Mäuse im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant vermindert. (B) Die beiden Versuchsgruppen des Ligaturmodells zeigten an Tag 14 keine Änderung. An Tag 21 war der Durchmesser des Quadrizepsmuskels der Tiere mit Ligatur signifikant reduziert. (C) Exemplarische HE-Aufnahme, in welchem die schwarzen Linien die gemessenen Durchmesser des Quadrizepsmuskels zeigen. Die Werte wurden als Mittelwerte +/- SEM dargestellt. \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 7$ .

#### 5.11.4 Untersuchung von Proteinabbauwegen im Skelettmuskel

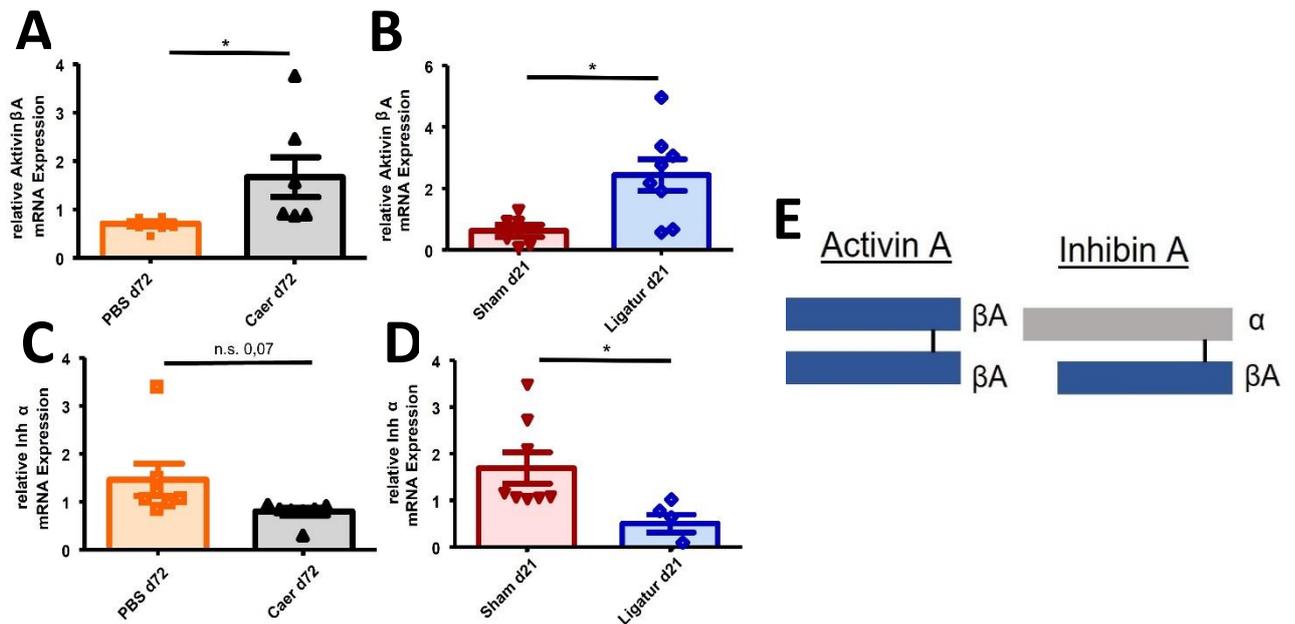
Mittels Western Blots konnte gezeigt werden, dass die Expression von  $\alpha/\beta$  Tubulin in allen Proben gleich stark war. Für GDF8 und MuRF1 fanden sich im Caeruleinmodell, (Abb. 29 links) deutliche Expressionssteigerungen gegenüber den mit PBS behandelten Kontrollen. Im Ligaturmodell (Abb. 29 rechts) erhöhte sich ebenfalls die Expression dieser beiden Proteine, was sowohl nach 14 als auch nach 21 Tagen zu erkennen war. Diese Ergebnisse deuten an, dass GDF8 und MuRF1 in beiden experimentellen Modellen für die chronische Pankreatitis auch unter fettreicher Nahrung beim Muskelabbau eine Rolle spielen.



**Abb. 29: GDF8 und MuRF1 Expression im Quadriceps-Muskel in der chronischen Pankreatitis unter fettreichem Futter.**

Sowohl im Caerulein- als auch Ligaturmodell finden sich deutliche Steigerungen der Proteinexpression von GDF8 und MuRF1 im Skelettmuskel. Die Expression der internen Ladekontrolle  $\alpha/\beta$  Tubulin blieb hingegen unverändert.

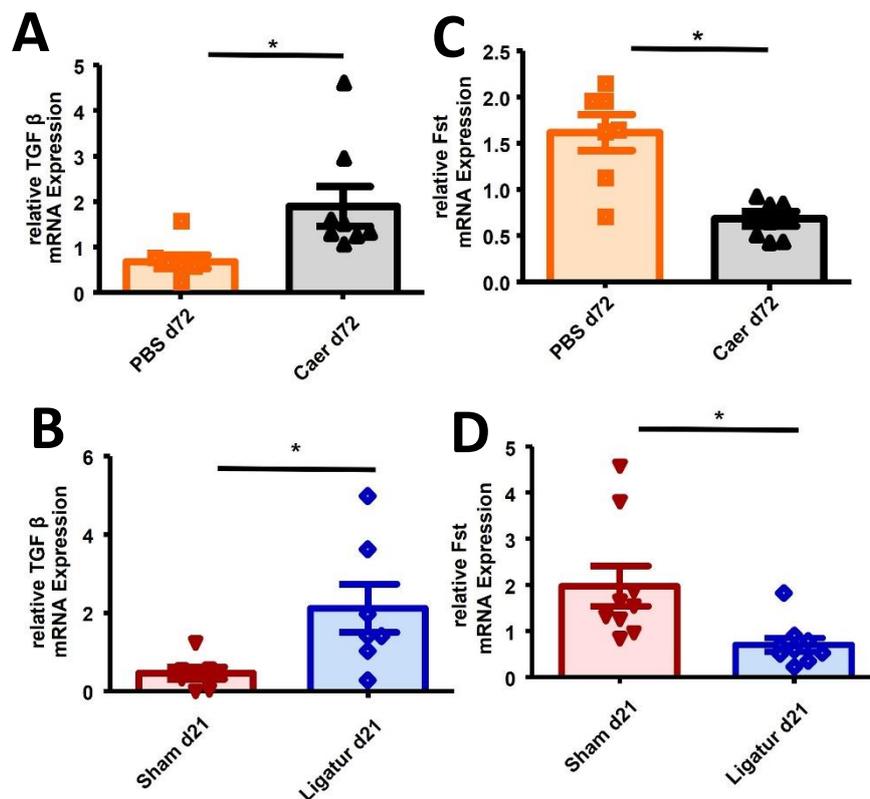
Des Weiteren wurde in beiden Modellen der chronischen Pankreatitis und Hochfetttdiät die Expression von Mitgliedern der TGF- $\beta$  Familie im Skelettmuskel analysiert, wobei derselbe methodische Ansatz wie bei den Versuchen unter Standarddiät verwendet wurde. Die Expression der Activin  $\beta$ A Kette war im Modell der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis signifikant erhöht (Abb. 30 A) was für eine Zunahme von Activin spricht, wohingegen die Expression des antagonistisch wirkenden Inhibin  $\alpha$  an Tag 72 vermindert, jedoch statistisch nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 30 C). Im Ligaturmodell fanden sich ähnliche Resultate der Activin und Inhibin Expressionsmuster mit einer Steigerung von Activin  $\beta$ A und einer Reduktion von Inhibin  $\alpha$  in Mäusen mit chronischer Pankreatitis nach 21 Tagen (Abb. 30 B und D).



**Abb. 30: Expression von Activin und Inhibin in der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät.**

Relative mRNA Expressionen von Activin  $\beta A$  und Inhibin  $\alpha$  im Quadrizeps. Activin  $\beta A$  war nach 72 Tagen repetitiver Caerulein Injektionen signifikant erhöht (A). Im Ligaturmodell war Activin  $\beta A$  nach Tag 21 in den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur signifikant erhöht (B). Inhibin  $\alpha$  war an Tag 72 in den mit Caerulein behandelten Tieren tendenziell vermindert (C). Im Ligaturmodell war die Expression von Inhibin  $\alpha$  an Tag 21 signifikant vermindert (D). Schematischer Aufbau von Activin und Inhibin mit Darstellung der Untereinheiten (E). Als Ladekontrolle wurde  $\beta$  Actin verwendet.  $n = \geq 5$ .

Die mRNA Expression von TGF- $\beta$  im M. quadriceps war an Tag 72 nach repetitiven Caerulein Injektionen signifikant erhöht (Abb. 31 A). Im Ligaturmodell war die Expression in den Muskeln nach 21 Tagen ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 31 B). Die Expression von Follistatin reduzierte sich in beiden Modellen der chronischen Pankreatitis (Abb. 31 C und D). Diese Ergebnisse belegen, dass auch bei Änderung der Kost auf ein fettreiches Futter TGF- $\beta$  vermittelte Mechanismen des Muskelabbaus von Relevanz sind.

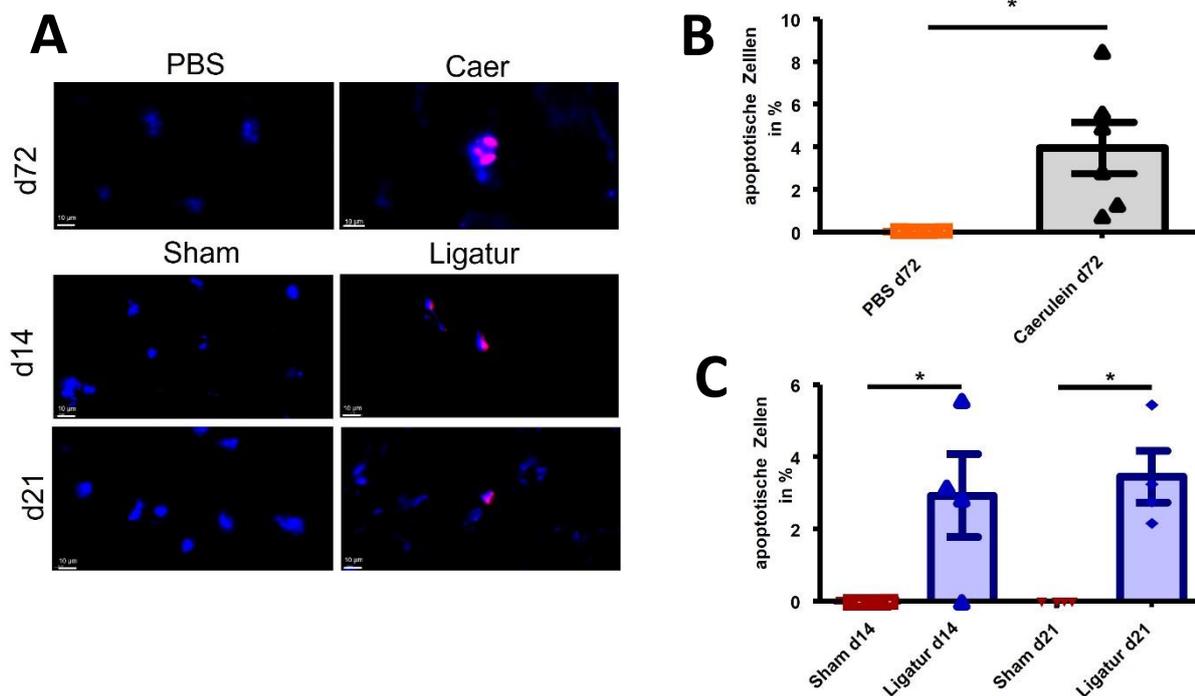


**Abb. 31: Expression von TGF- $\beta$  und Follistatin im Quadricepsmuskel bei chronischer Pankreatitis unter Hochfettdiät.**

Die Expression von TGF- $\beta$  im Skelettmuskel erhöhte sich in den mit Caerulein induzierten Tieren (A) und bei den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur signifikant (B). Follistatin war an Tag 72 in den Caerulein-induzierten Tieren signifikant reduziert (C), bei den Tieren mit Pankreasgang-Ligatur zeigte sich an Tag 21 eine signifikante Reduktion (D). Als Housekeeping Gen wurde  $\beta$  Actin verwendet,  $n \geq 4$ .

### 5.11.5 Apoptose im Quadrizeps-Muskel unter fettreicher Diät

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen im Quadrizepsgewebe wurde in Kryoschnitten des Muskels eine TUNEL Färbung durchgeführt. In beiden Modellen war eine Zunahme an apoptotischen Zellen im Skelettmuskel zu erkennen (Abb. 32 A). Diese war sowohl im Caeruleinmodell (nach 72 Tagen) als auch im Ligaturmodell (nach Tag 14 und Tag 21) statistisch signifikant gesteigert (Abb. 32 B und C).



**Abb. 32: Zunahme der apoptotischen Zellen im M. quadriceps femoris während der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät.**

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vom Quadrizepsquerschnitten nach TUNEL Färbung. Die Zellkerne wurden blau (DAPI) und apoptotische Zellen violett (FITC) gefärbt. Es war eine deutliche Zunahme an FITC positiven Zellen in den Muskeln nach Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis sowie nach Ligatur des Pankreasganges zu erkennen. (B) Eine Quantifizierung der apoptotischen Zellen bestätigte im Caeruleinmodell eine signifikante Zunahme der Apoptose an Tag 72 in den behandelten Tieren. (C) Nach Ligatur zeigte sich an Tag 14 eine signifikante Zunahme apoptotischer Zellen, nach Tag 21 blieb dieser Unterschied bestehen. Es wurde je ein kompletter Quadrizepsquerschnitt in jeweils mind. 4 Tieren ausgewertet. \*  $p < 0,05$ .

## **6. Diskussion**

### **6.1 Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft in der chronischen Pankreatitis**

Bei der Sarkopenie handelt es sich um einen fortschreitenden und generalisierten Zustand, welcher mit einem erhöhten Verlust von Muskelmasse und -funktion einhergeht. Der Begriff der Sarkopenie ist dabei abzugrenzen vom „Frailty“-Syndrom, welches auch Gebrechlichkeits-Syndrom genannt wird und in der Geriatrie relativ häufig vorkommt [108]. Dabei handelt es sich um ein Zusammenspiel verschiedener Symptome, die vorwiegend bei älteren Menschen auftreten. Es kommt zu einer Verminderung funktioneller Reserven, einer abnehmenden Widerstandsfähigkeit gegenüber Stressoren sowie einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber negativen Gesundheitsergebnissen [109]. Klinisch sind die Begriffe Sarkopenie und Frailty eng miteinander verbunden. Der Funktionsabfall in der Sarkopenie und eine Zunahme der Gebrechlichkeit führen zu einem Anstieg der Mortalität [110]. Bei der „primären“ Sarkopenie handelt es sich um einen altersbedingten Prozess, welcher durch genetische Faktoren und den Lebensstil beeinflusst wird [59]. Die „sekundäre“ Sarkopenie kann in Verbindung mit einer Reihe von Erkrankungen auftreten. Deshalb ist die Sarkopenie im Interesse der Forschung, um das Wissen über deren Pathophysiologie zu erweitern und so auch deren Diagnostik, deren Behandlung sowie deren Prävention zu verbessern. Für die murinen Modelle konnten wir zeigen, dass das Körpergewicht der behandelten Tiere mit Standard-Diät in beiden Modellen über den gesamten Versuchszeitraum signifikant unter dem der Kontrollen lag. Weiter wiesen die behandelten Tiere eine stark verminderte Muskelkraft auf. Über den Beobachtungszeitraum verminderte sich die Kraft der Tiere stetig. Diese Ergebnisse zeigen, dass in murinen Modellen der chronischen Pankreatitis sowohl ein Gewichtsverlust als auch ein Verlust an Muskelkraft auftreten. Diese Beobachtungen passen zu klinischen Beobachtungen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis, bei welchen ein Gewichtsverlust häufig beobachtet wird. Man geht davon aus, dass etwa ein Drittel der Patienten einen BMI von  $< 20 \text{ kg/m}^2$  haben [111]. Als Folge der Mangelernährung finden sich ein Verlust von Muskelmasse und -kraft und letztlich das Bild einer Sarkopenie [112]. Die Prävalenz der Sarkopenie liegt dabei zwischen 17-64 % [70]. Studien zeigen, dass das Vorhandensein der Sarkopenie im Zusammenhang mit erhöhter Mortalität steht [113] [114].

### **6.2 Charakterisierung der am Muskelabbaubeteiligten Mechanismen**

Die Skelettmuskulatur ist ein dynamisches, mehrzelliges Gewebe, welches in der Lage ist, sich lebenslang anzupassen. Die Muskelgröße, d.h. die Querschnittsfläche ist dabei besonders anpassungsfähig [115]. Die Funktion der Skelettmuskulatur wird von chronischen und malignen oder systemischen Erkrankungen, wie z.B. einer Sepsis, Diabetes mellitus, chronischen Erkrankungen wie einer chronischen Pankreatitis oder Krebserkrankungen

negativ beeinflusst und kann etwa zu einer Muskelschwäche, Inaktivität und letztendlich erhöhter Sterblichkeit führen. Während sich die genannten Diagnosen unterschiedlich entwickeln und verschiedene klinische Manifestationen aufweisen, so verursachen sie dennoch ähnliche Funktionsstörungen der Skelettmuskulatur [116] [117]. Ein gemeinsamer Mechanismus ist die Induktion von Entzündungen und die damit einhergehenden Veränderungen der Zytokinspiegel im Serum. Erhöhte Spiegel von Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 1 (IL1) sind mit dem Verlust der Skelettmuskelkraft assoziiert [3] [4]. Die konkreten molekularen Mechanismen, unter denen diese Zytokine beteiligt sind, sind bislang nur teilweise geklärt. Die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine wird teilweise über den Kernfaktor (nuclear factor) Kappa B (NF- $\kappa$ B) vermittelt [120]. TNF $\alpha$  ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt und reguliert unter anderem das Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Immunantwort und Apoptose [121] [122] [123]. In mit TNF $\alpha$  inkubierten C2C12-Zellen, einer immortalisierten Mausmyoblasten-Zelllinie, konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 24 Stunden die muskelspezifischen E3 Ligasen Muskel RING-Finger Protein1 (MuRF1) und Muskelatrophie-F-Box-Gen (MAFbx) hochreguliert werden [124] [125]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Reduktion der Skelettmuskelkraft von MuRF1 defizienten Mäusen TNF $\alpha$  abhängig ist [126]. Dabei wurde gezeigt, dass sich die MuRF1 Expression sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene in C57Bl6 Tieren, welchen TNF $\alpha$  injiziert wurde, erhöht hat. Weiter wiesen die behandelten Tiere eine verminderte Kraftentwicklung auf. Es ist bekannt, dass Myostatin, welches auch als Wachstums-/Differenzierungsfaktor 8 (growth differentiation factor 8, GDF8) bezeichnet wird, als Negativregulator für das Wachstum von Muskulatur wirkt [127] [128]. Genetische und biochemische Studien haben gezeigt, dass die Hemmung von GDF8 die Hypertrophie der Skelettmuskulatur fördert [129] [130]. Eine Deletion von GDF8 in Mäusen zeigte eine Hypertrophie der Skelettmuskulatur sowie eine Verringerung des Körperfettgewebes [131] [132]. In murinen C2C12 Myoblasten hemmt GDF8 in vivo die Synthese von Muskelproteinen [133]. Bei tumortragenden Mäusen mit einer Kachexie konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung des GDF8 Rezeptors den Muskelschwund umkehren kann und die Tiere sogar ein verlängertes Überleben aufwiesen [134]. Follistatin ist ein natürlich vorkommender Inhibitor von GDF8. In Mäusen, welche ein Muskeltraining durch Schwimmübungen durchgeführt haben, konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der Follistatin-Spiegel im Plasma als auch deren mRNA und Proteinexpressionen anstiegen [135]. Neben Zytokinen wie TNF $\alpha$  spielt auch Insulin als Wachstumsfaktor eine Rolle bei der Proteinsynthese im Muskel. So erhöht Insulin die Glykolyserate im Muskel und im Fettgewebe, steigert die Aufnahme von Triglyceriden aus dem Blut und reguliert die Proteinsyntheserate im Muskel, der Leber und weiteren Geweben [136]. Normalerweise ist die Menge von Proteinen in Zellen in einem Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau. Es ist bekannt, dass Insulin dieses Gleichgewicht hin zu einer vermehrten

Synthese und einer verminderten Degradation von Proteinen beeinflussen kann [137] [138]. Daraus resultiert eine Freisetzung von Aminosäuren aus der Muskulatur und ein erhöhter Einbau dieser in Proteine. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist bekannt, dass die fehlerhafte Regulation des Insulins zu Veränderungen der Muskulatur unabhängig vom Gewicht führt [139]. Die Skelettmuskulatur ist das primäre Gewebe für die Glukoseverwertung, welche durch Insulin stimuliert wird [140]. Die Stimulation der Proteinsynthese erfolgt dabei über die Aktivierung von mTOR (engl. mechanistic target of Rapamycin). Parallel dazu reduziert Insulin die Hemmung des Forkhead-Transkriptionsfaktors (FOXO) und die Aktivität der E3-Ubiquitinligase, welche über Atrogin 1, und MuRF1 Atrophie vermittelt wird [141].

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass in beiden murinen Modellen der chronischen Pankreatitis und unter Verwendung zweier verschiedener Diäten der Quadrizepsdurchmesser abnimmt. Es wurde ferner gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL12 im Verlauf der Erkrankung ansteigen. Im Caeruleinmodell konnte an Tag 72 eine signifikante Erhöhung von IL12, TNF $\alpha$ , IL6 und MCP1 nachgewiesen werden (Abb. 12 A). Im Ligaturmodell dagegen konnten erhöhte Werte für IL12 und TNF $\alpha$  nur an Tag 14 nach Ligatur gezeigt werden (Abb. 12 B). Die Änderungen der proinflammatorischen Zytokine ist somit modellspezifisch. Es wurde ferner nachgewiesen, dass sowohl die GDF8 als auch MuRF1 Proteinexpression in Tieren mit chronischer Pankreatitis erhöht sind. Möglicherweise erklärt die TNF $\alpha$  Ausschüttung die Expressionssteigerung von MuRF1 in einem gewissen Maße, wie anhand der zitierten Arbeiten vermutet werden kann. Allerdings scheinen auch modellspezifische Unterschiede zu bestehen, da im Pankreasgangligatur-Modell die MuRF1 Expression nach 21 Tagen zwar deutlich erhöht, das Serum-TNF $\alpha$  jedoch nicht erhöht war. So muss angenommen werden, dass weitere Mechanismen zu einer MuRF1 Steigerung führen. Die Expression von MuRF1 kann ferner durch die Bindung von Activin A an den ActRIIB Rezeptor induziert werden.

Activin A ist ein Wachstumsfaktor der TGF $\beta$ -Familie und setzt sich aus zwei  $\beta$ A-Untereinheiten zusammen. Inhibin A als Gegenspieler ist ein Heterodimer und besteht aus einer  $\beta$ A und einer  $\alpha$  Untereinheit [142]. Activin A defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Muskelmasse [143]. Die Antikörper-vermittelte Hemmung von GDF8 und Activin A führt zu einer Zunahme von Muskelmasse in Mäusen und Affen [144]: Bei Mäusen kam es nach 21 Tagen zu einer Zunahme von 43,9 % des Gewichtes des M. tibialis anterior. Bei Affen betrug die Steigerung des Muskelgewichtes 9,1 % nach fünfwöchiger Behandlung. Es konnte im Caeruleinmodell der chronischen Pankreatitis nachgewiesen werden, dass die mRNA Expression von Activin A zunimmt und Inhibin A abnimmt. Im Ligaturmodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Activin A Expression gesteigert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl

GDF8, MuRF1 als auch Activin A eine Rolle beim Muskelschwund in der chronischen Pankreatitis spielen.

### **6.3 Bedeutung der Apoptose für die Sarkopenie**

Apoptose ist entscheidend, um die Integrität von proliferativen Geweben aufrechtzuhalten. Bei postmitotischen Geweben wie etwa der Skelettmuskulatur ist die Rolle der Apoptose weniger gut definiert. [145]. Es können sowohl extrinsische als auch intrinsische Stimuli zur Apoptose führen [146] [147] [148]. Bei der extrinsischen Apoptose wird der Zelltod durch einen Stimulus von außen induziert. Es wird eine Signalkaskade ausgelöst, welche über Adaptermoleküle und verschiedene Caspasen den Zelltod herbeiführt. Bei der intrinsischen Apoptose wird die Apoptose über zellinterne Stimuli wie etwa DNA-Schäden oder osmotischen Stress ausgelöst. Es kommt zur Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs und als Folge dessen zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Es tritt Cytochrom C in das Mitochondrium ein, welches Caspasen aktiviert und somit den Zelltod vermittelt. Im Hinblick auf den Zelltod sind Muskelfasern einzigartig, da sie mehrkernig sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in beiden experimentellen Modellen die Apoptose signifikant zunimmt (Abb. 16). Gleiches konnte bei den Tieren gezeigt werden, welche eine Hochfett-Diät erhielten (Abb. 32). Die Daten sprechen dafür, dass die Apoptose beim Modell der chronischen Pankreatitis sowohl unter Standard-Diät als auch unter einer Hochfett-Diät eine Rolle spielt. Es wird vermutet, dass die Apoptose von wachstumsregulatorischen Signalen beeinflusst wird, wie aus mehreren experimentellen Arbeiten hervorgeht: Für den Wachstumsfaktor TGF $\beta$  konnte nachgewiesen werden, dass nach Inkubation von Uterusepithelzellen vom Kaninchen mit TGF $\beta$  die Apoptoserate zunimmt [149]. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass es vermehrt zur Apoptose kommt, wenn Hepatozyten von Ratten mit TGF $\beta$  behandelt werden [150]. Bei der Leberhyperplasie konnte ein Zusammenhang zwischen TGF $\beta$  und einer abnehmenden DNA Synthese gezeigt werden [151]. Diese Erkenntnisse passen zu unserer Beobachtung, dass wir eine erhöhte Expression von TGF $\beta$  sowohl nach Caeruleinbehandlung als auch an Tag 14 und 21 nach Ligatur nachweisen konnten. An den Endzeitpunkten der beiden Modelle unter der Hochfett-Diät konnten wir ebenfalls eine Steigerung der Apoptose beobachten. Es ist bekannt, dass Activine und Inhibine an der Regulation biologischer Prozesse beteiligt sind. In der menschlichen Prostatakrebs-Zelllinie LNCaP hemmt Activin A die Proliferation und induziert Apoptose [152] [153]. In murinen Myelomzellen wurde gezeigt, dass nach Inkubation mit Activin A in den Zellen die Apoptose induziert wurde und die Proteinexpression von Caspase 3 anstieg [154]. In dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass sich die Expression von Activin A an den Endzeitpunkten beider Modelle signifikant erhöht war, was den Zusammenhang von Activin A und Apoptose untermauert. Gleiches konnten wir unter der

Hochfettdiät nachweisen. Follistatin, als Negativregulator von Activin, hat ebenfalls Einfluss auf die Apoptose. An Ratten mit einem Nierenschaden, die mit Follistatin behandelt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass Follistatin eine nephroprotektive Wirkung hat und die Apoptose verhindert. Weiter fanden sich im Serum verminderten Spiegel von Activin A [155]. Wir konnten in beiden Modellen der chronischen Pankreatitis zeigen, dass sich die Expression von Follistatin im Quadrizeps der behandelten Tiere signifikant vermindert. Gleiches konnte bei den Tieren mit der Hochfettdiät gezeigt werden. Unsere Daten lassen vermuten, dass Activin A und TGF $\beta$  während der chronischen Pankreatitis im Quadrizeps-Muskel die Apoptose begünstigen, wohingegen Follistatin möglicherweise protektiv wirkt.

In den Versuchsgruppen mit Hochfettdiät fanden sich ebenfalls eine Reduktion von Gewicht und Muskelkraft. Der Gewichtsverlust war im Vergleich zur Normaldiät allerdings nicht so stark ausgeprägt bzw. trat verzögert auf. Dies lässt vermuten, dass der Makronährstoff Fett in beiden experimentellen Modellen - selbst im Caeruleinmodell, wo die Chymotrypsin Aktivität deutlich vermindert war - zumindest noch teilweise aus dem Futter aufgenommen werden konnte und einem Gewichtsverlust entgegenwirkte. Trotz der vermehrten Zufuhr dieser hochenergetischen Nahrung fanden sich in beiden experimentellen Modellen Zeichen eines Muskelabbaus mit Verminderung der Muskelquerschnitte, Aktivierung von Proteinen der TGF $\beta$  Superfamilie sowie Induktion der Apoptose. Diese Beobachtungen unterstreichen die Hypothese, dass für die Entwicklung der Sarkopenie in der chronischen Pankreatitis von der exokrinen Pankreasinsuffizienz unabhängige Mechanismen mitvorliegen müssen.

#### **6.4 Bedeutung des Serum-Metaboloms und des fäkalen Mikrobioms in der experimentellen chronischen Pankreatitis**

Eine Untersuchung an gesunden Probanden der populationsbasierten Study of Health in Pomerania (SHIP) konnte zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der exokrinen Pankreasfunktion und einer Änderung der Plasmametabolite sowie des intestinalen Mikrobioms besteht [156]. Dabei ging eine verminderte exokrine Pankreasfunktion mit der Abnahme von Phosphatidylcholinen (aaC40:5 und aaC32:1) und einzelner Carnitine (z.B. Hydroxybutyrylcarnitin, Tiglylcarnitin) einher. Gleichzeitig wurde eine Zunahme von Serotonin, Threonin, Asparagin und dem Sphingomyelin C14:1 gezeigt. Die Studie schlussfolgert, dass die Änderungen der intestinalen mikrobiellen Komposition zu einer Veränderung von Mikrobiota-assoziierten Metaboliten führt. In einer klinischen Studie konnte bei Patienten mit akuter Pankreatitis ein Anstieg von Citrat im Blut gemessen werden [157] [158]. Es ist bekannt, dass der Cholin-Stoffwechsel an Entzündungsreaktionen beteiligt ist [159]. Cholin ist das Ausgangsprodukt für die Synthese von Lysophosphatidylcholin (LPC) und Phosphatidylcholin

(PC) [160], die beide Vorstufen von Acetylcholin, einem Methyl donor, sind. Bei Patienten mit akuter Pankreatitis fanden sich erhöhte Spiegel von LPC, PC und Triacylglycerolen (TAG) [161] [162]. Im Modell der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis wurden in dieser Arbeit drei Metabolite hochreguliert: Cholsäure, LPC (a.C.16.1) und 3-Indolpropionsäure (siehe Tabelle 6). Diese Beobachtung passt zu den Daten von Patienten mit akuter Pankreatitis. Dagegen konnten fünf Metabolite identifiziert werden, die herunterreguliert werden. Dabei handelt es sich jeweils um ein Tri- und ein Diglycerid, um ein Lysophosphatidylcholin und um Trimethylamin-N-Oxid. Die Abnahme dieser Tri- und Diglyceride widerspricht jedoch den Beobachtungen der genannten Humanstudie. Denkbar ist, dass speziesspezifische Unterschiede bestehen und nicht alle Metabolite vom Tier auf den Menschen übertragen werden können.

Im Modell der chronischen Caerulein-induzierten Pankreatitis waren 15 Metabolite herunterreguliert, darunter eine Reihe von Phosphatidylcholinen, einige Ceramide sowie zwei Aminosäuren. Die Abnahme von PC's könnte durch den Abbau der Muskulatur auf Grund der Sarkopenie erklärt werden. In Mäusen mit L-Arginin-induzierter akuter Pankreatitis wurden erhöhte Werte für Serin, Lysin, Histidin, Cumarsäure und Adenin gemessen [163]. Vermindert waren Glutamat, Phosphoethanolamin und 2-Desoxy-D-Glucose. Sie gelten als bedeutende Stoffwechselprodukte für die Energiegewinnung und für die Synthese von Phosphatidylcholin. Eine weitere Studie mit L-Arginin- und Natriumtaurocholat-induzierter akuter Pankreatitis in Wistar Ratten zeigte erhöhte Spiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin, wohingegen bei chronischer Pankreatitis ein gegensätzlicher Trend beobachtet wurde. Sowohl bei akuter als auch chronischer Pankreatitis fanden sich vermehrte Metabolite von Cholin, Phosphocholin und PC's und eine Verminderung von Fettsäuren und Glycin [164]. Eine gestörte Aminosäurebilanz kann sich negativ auf den Stoffwechsel und die Homöostase im Organismus auswirken. Die Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin spielen eine Rolle im Citratzyklus, wo sie als Ausgangsprodukte für Succinyl-CoA und Acetyl-CoA dienen. Damit sind sie für die Energiegewinnung von Bedeutung [165]. Dabei wird angenommen, dass während der Pankreatitis ein erhöhter Energiebedarf bzw. eine verringerte Energieproduktion besteht. In Patienten mit akuter Pankreatitis wurde eine Verminderung von Alanin, Valin, Glycin, Prolin, Phenylalanin und Ornithin nachgewiesen [157], wohingegen bei Patienten mit chronischer Pankreatitis eine Abnahme von essentiellen, aromatischen Aminosäuren nachgewiesen wurde, was der reduzierten exokrinen Funktion zugeschrieben wurde [166]. Wir konnten an Tag 14 nach Ligatur signifikante Veränderungen von sechs Metaboliten identifizieren, welche hochreguliert wurden. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Valin, Cystein, Isoleucin, Leucin und Histidin. Diese Beobachtung deckt sich mit den Daten der Patienten mit chronischer Pankreatitis. Der Anstieg von Valin, Leucin und Isoleucin könnte für

die Notwendigkeit einer erhöhten Energiegewinnung während der chronischen Pankreatitis sprechen.

Das Darmmikrobiom kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden, zu denen die Ernährung, körperliche Aktivität und geographische Faktoren gehören [89] [90]. Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms sind mit entzündlichen sowie metabolischen Erkrankungen assoziiert. In einer Studie zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten spezifische Veränderungen der Darmmikrobiota, vor allem von Firmicutes, Bacteroides (Clostridium XIVa und IV), Proteobacteria und Actinobacteria, als potentielle Biomarker zur Vorhersage der Krankheitsprädisposition, Schweregrad und das Ansprechen auf die Therapie identifiziert werden [167]. Eine Studie an Probanden aus einer populationsbasierten Studie zeigte, dass eine erhöhte pankreatische Elastase in Zusammenhang mit einer Zunahme der Mikrobiota Diversität steht [90]. Dabei konnten ein Anstieg von Prevotella und eine Abnahme von Bacteroides festgestellt werden. Die Studie weist darauf hin, dass die exokrine Funktion des Pankreas offenbar einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms hat. Bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis fand sich hingegen eine reduzierte Diversität des Mikrobioms mit Zunahme von Bacteroides und Clostridium XIVa sowie einer erhöhten Häufigkeit von pathogenen Mikrobiota wie Enterococcus, Streptococcus, Escherichia und Shigella [106].

Nach Ligatur des Pankreasganges kam es zu einer Reduktion der Firmicutes und einer Zunahme von Bacteroidetes. In unserem Caerulein-induziertem Mausmodell der chronischen Pankreatitis fanden sich jedoch eine deutliche Reduktion von Bacteroidetes bei etwa gleichbleibender Firmicutes-Häufigkeit. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Beobachtungen aus einem Mausmodell mit Caerulein-induzierter chronischer Pankreatitis, in welchem sich eine Verminderung von Firmicutes und eine Zunahme von Bacteroidetes, Actinobacteria und Verrucomicrobia fanden [168]. Allerdings wiesen diese Mäuse keinen Gewichtsverlust auf und der Beobachtungszeitraum was in dieser Arbeit mit 6 Wochen deutlich kürzer als in unserer Untersuchung.

In sarkopenen Patienten konnte ferner gezeigt werden, dass diese eine erhöhte Häufigkeit von Micrococcaceae, Akkermansia und Coprobacillus aufwiesen [169]. Dagegen waren die Gattungen Acidamiooccus und Gemella reduziert. In dieser Arbeit konnten wir in beiden Modellen eine Zunahme von Akkermansia nachweisen. Akkermansia gilt wegen seiner entzündungshemmenden Eigenschaften als „protektives“ Bakterium und es korreliert negativ mit der Häufigkeit entzündlicher Darmerkrankungen [170] und Fettleibigkeit [171]. Es konnte Übereinstimmungen aber auch Unterschiede mit publizierten murinen- und Humanstudien gezeigt werden. Die Interpretation von Gemeinsamkeiten und Unterschieden der Mikrobiota-

Zusammensetzungen von Mensch und Maus ist jedoch herausfordernd. Beim Vergleich humaner und muriner Studien ist zu beachten, dass Mäuse Koprophagie betreiben, was durchaus die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen kann. Weiter ist zu beachten, dass es modellspezifische Unterschiede gibt, die vermutlich auf die Art der Induktion der Pankreatitis zurückzuführen sind. Weiter ist zu erwähnen, dass Vergleiche von Messungen aus verschiedenen Laboren nicht immer vollständig übertragbar sind [172]. Es ist außerdem zu berücksichtigen, dass die Lebensweise und somit auch das Futter der Tiere einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms hat [89].

## 7. Ausblick/Limitation

In dieser Arbeit konnte anhand von zwei Modellen für die chronische Pankreatitis gezeigt werden, dass neben einem Gewichtsverlust auch ein Verlust der skelettalen Muskelkraft auftritt und sich der Querschnitt der skelettalen Muskulatur reduziert. Die Reduktion des Muskeldurchmessers ist dabei nicht so dominant, um die Gewichtsabnahme der Tiere zu erklären. Es ist somit denkbar, dass die Sarkopenie nicht den alleinigen Grund für die Reduktion des Körpergewichtes darstellt. Möglicherweise bedingt die Gewichtsreduktion auch einen Verlust von Fettmasse, die wir in dieser Studie nicht untersuchten. Es konnten ferner molekulare Mechanismen identifiziert werden, die bereits bei anderen zum Muskelabbau führenden Erkrankungen beobachtet wurden und somit auch in der chronischen Pankreatitis von Bedeutung sind. Dabei scheinen GDF8, MuRF1, Activin A und Follistatin eine wichtige Rolle zu spielen. Zur genaueren Klärung der proteindegradierenden Mechanismen, die letztendlich zum Muskelabbau führen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Unsere Analysen beschränkten sich auf die Messung der Apoptose sowie der Aktivität lysosomaler Enzyme im Muskel. Weitere interessante Ansätze umfassen den Ubiquitin-Proteasom Weg. Die Ubiquitinierung spielt eine Rolle bei der DNA-Reparatur, der Regulation der Transkription und dem Abbau fehlerhafter Proteine. Es ist außerdem denkbar, dass es während der Sarkopenie zu Änderungen der Zusammensetzung und Verteilung von Immunzellen wie etwa TH1-, TH2-Zellen und Makrophagen lokal im Muskel und auch systemisch im Blut kommt. Diese Änderungen können mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden. Noch nicht ausreichend geklärt ist außerdem, ob und inwieweit Zytokine, vor allem TNF $\alpha$  eine Sarkopenie begünstigen, da zumindest in unseren Versuchen die Serum-Zytokinpiegel nicht mit dem Ausmaß des Gewichts- und Muskelkraftverlustes korrelierten. Möglicherweise wäre die Behandlung sarkopener Mäuse mit TNF $\alpha$ -Antikörpern ein Ansatz, die Bedeutung dieses Zytokins für die Pathogenese der Sarkopenie eingehender zu untersuchen. Die Auswertung des fäkalen Mikrobioms zeigt, dass sich in der chronischen Pankreatitis zwar Unterschiede in der Zusammensetzung und Diversität ergeben, diese sich aber in Abhängigkeit des verwendeten Modells der chronischen Pankreatitis unterscheiden. Es scheinen demnach modellspezifische Effekte zu geben, die zu einer Veränderung des Mikrobioms führen. Möglicherweise spielt auch der Pathomechanismus der chronischen Pankreatitis, sei es infolge rezidivierender Entzündungen oder einer akuten schweren Pankreatitis eine wichtige Rolle für die Zusammensetzung des fäkalen Mikrobioms. Modell-abhängige Unterschiede konnten wir auch bei der Analyse der Serummetabolite beobachten, so dass unsere bisherigen Arbeiten keinen eindeutigen Serummarker für die Detektion einer Sarkopenie bei chronischer Pankreatitis nachweisen konnten. Zukünftige Arbeiten sollten versuchen, die Ergebnisse aus tierexperimentellen Versuchen und humanen Studien intensiver zu vergleichen und zu klären, ob sich bei sarkopenen Patienten mit chronischer Pankreatitis wirklich spezifische Metaboliten-

bzw. Mikrobiotaprofile zeigen und ob sich diese von der Krankheitsentstehung unterscheiden. Ebenso würden Analysen humaner Muskelgewebeprouben detailliertere Erkenntnisse über die Bedeutung der TGF- $\beta$  Superfamilie und MuRF1 beim Menschen liefern und die Rolle der Apoptose und der Aktivierung lysosomaler Proteasen klären. Sofern sich die im murinen Modell gewonnenen Erkenntnisse auch im humanen Gewebe bestätigen, könnte eine gezielte Intervention des Activin/Inhibin Signalweges einen möglichen Therapieansatz für die Sarkopenie bei chronischer Pankreatitis, etwa durch die Gabe spezifischer Antikörper gegen Activin A und GDF8 oder spezifischer Inhibitoren, darstellen.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur der Skelettmuskulatur (vereinfacht nach Rave et al.) .....	17
Abb. 2: TGF- $\beta$ vermittelte Signalwege der Kachexie in Mäusen. ....	20
Abb. 3: Übersicht über einzelne Bereiche von „Omics“-Analysen. ....	21
Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes des Ligatur-Modells. ....	36
Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes des repetitiven Caeruleininjektions-Modells. ....	36
Abb. 6: Zeitlicher Ablauf der MRT Messungen. ....	45
Abb. 7: Morphologische Veränderungen des Pankreas in der experimentellen chronischen Pankreatitis. ....	49
Abb. 8: Bestimmung der endo- und exokrinen Pankreasinsuffizienz. ....	52
Abb. 9: Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft während der chronischen Pankreatitis. ....	53
Abb. 10: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis. ....	54
Abb. 11: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis. ....	56
Abb. 12: Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Serum. ....	57
Abb. 13: GDF8 und MuRF1 Expression im Quadriceps-Muskel in der chronischen Pankreatitis. ....	59
Abb. 14: Expression von Activin und Inhibin in der chronische Pankreatitis. ....	60
Abb. 15: Expression von TGF $\beta$ und Follistatin. ....	61
Abb. 16: Zunahme apoptotischer Zellen im M. quadriceps femoris während der chronischen Pankreatitis. ....	62
Abb. 17: Veränderungen der Serummetabolite im Caeruleinmodell (an Tag 72). ....	63
Abb. 18: Veränderungen der Serummetabolite im Ligaturmodell (an Tag 14). ....	65
Abb. 19: Veränderungen der Serummetabolite im Ligaturmodell (an Tag 21). ....	66
Abb. 20: Artenreichtum und Diversität des Stuhlmikrobioms in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis und PBS Kontrollen an Tag 72. ....	67
Abb. 21: Zusammensetzung des Stuhlmikrobioms im Caeruleinmodell. ....	68
Abb. 22: Veränderungen der Stuhlmikrobiota in der Caerulein-induzierten chronischen Pankreatitis. ....	69
Abb. 23 Artenreichtum und Diversität des Stuhlmikrobioms im Modell der chronischen Pankreatitis nach Pankreasgangligatur Ligaturmodell. ....	70
Abb. 24: Zusammensetzung des Stuhlmikrobioms im Ligaturmodell. ....	72
Abb. 25: Veränderungen der Stuhlmikrobiota in der durch Ligatur des Pankreasganges induzierten chronischen Pankreatitis (an Tag 14 und 21). ....	73
Abb. 26: Verlauf von Körpergewicht und Muskelkraft während der chronischen Pankreatitis unter fettreicher Diät. ....	75

Abb. 27: Bestimmung der endo- und exokrinen Pankreasfunktion unter fettreicher Diät.....	77
Abb. 28: Verminderung des Quadrizepsdurchmessers in der chronischen Pankreatitis.....	78
Abb. 29: GDF8 und MuRF1 Expression im Quadriceps-Muskel in der chronischen Pankreatitis unter fettreichem Futter. ....	79
Abb. 30: Expression von Activin und Inhibin in der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät. ....	80
Abb. 31: Expression von TGF- $\beta$ und Follistatin im Quadricepsmuskel bei chronischer Pankreatitis unter Hochfettdiät.....	81
Abb. 32: Zunahme der apoptotischen Zellen im M. quadriceps femoris während der chronischen Pankreatitis unter Hochfettdiät.....	82

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Zusammensetzung des Einbettmediums für die Muskulatur. ....	37
Tabelle 2: Reagenzien und Temperaturprofil der cDNA Synthese.....	39
Tabelle 3: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsgemisches.....	40
Tabelle 4: Temperatur-Zeit-Programm des Thermalcyclers.....	41
Tabelle 5: Übersicht der Messbedingungen der Enzyme im Stuhl. ....	44
Tabelle 6: Serummetabolite im Caeruleinmodell an Tag 72.....	64
Tabelle 7: Serummetabolite im Ligaturmodell an Tag 14.....	66

## Literaturverzeichnis

- [1] Flay N W, Gorelick F S., *Exocrine Pancreas. Encyclopedia of Gastroenterology*. 2004.
- [2] B. Hofbauer *et al.*, "Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats," *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 275, no. 2, pp. G352–G362, Aug. 1998, doi: 10.1152/ajpgi.1998.275.2.G352.
- [3] A. K. Saluja, M. Saluja, H. Printz, A. Zaverchnik, A. Sengupta, and M. L. Steer, "Experimental pancreatitis is mediated by low-affinity cholecystokinin receptors that inhibit digestive enzyme secretion.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 86, no. 22, pp. 8968–8971, Nov. 1989, doi: 10.1073/pnas.86.22.8968.
- [4] Longnecker, D., "Pancreapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base," *Anatomy and Histology of the Pancreas*. pp. 1–24, 2022.
- [5] Witt, H., *Physiologie und Embryologie des Pankreas. Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.
- [6] Gerok, W, *Taschenlehrbuch Anatomie*, 11th ed. Schattauer Verlag, 2007.
- [7] J. Gromada, P. Chabosseau, and G. A. Rutter, "The  $\alpha$ -cell in diabetes mellitus," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 14, no. 12, pp. 694–704, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41574-018-0097-y.
- [8] M. Watts and A. Sherman, "Modeling the Pancreatic  $\alpha$ -Cell: Dual Mechanisms of Glucose Suppression of Glucagon Secretion," *Biophysical Journal*, vol. 106, no. 3, pp. 741–751, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.bpj.2013.11.4504.
- [9] X. W. Ng, Y. H. Chung, and D. W. Piston, "Intercellular Communication in the Islet of Langerhans in Health and Disease," in *Comprehensive Physiology*, 1st ed., R. Terjung, Ed. Wiley, 2021, pp. 2191–2225. doi: 10.1002/cphy.c200026.
- [10] C. B. Newgard and J. D. McGarry, "METABOLIC COUPLING FACTORS IN PANCREATIC  $\beta$ -CELL SIGNAL TRANSDUCTION," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 64, no. 1, pp. 689–719, Jun. 1995, doi: 10.1146/annurev.bi.64.070195.003353.
- [11] P. E. MacDonald and P. Rorsman, "Oscillations, Intercellular Coupling, and Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$  Cells," *PLoS Biol*, vol. 4, no. 2, p. e49, Feb. 2006, doi: 10.1371/journal.pbio.0040049.
- [12] P. Rorsman and M. O. Huising, "The somatostatin-secreting pancreatic  $\delta$ -cell in health and disease," *Nat Rev Endocrinol*, vol. 14, no. 7, pp. 404–414, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41574-018-0020-6.
- [13] O. M. Tiscornia, G. A. Negri, G. Otero, F. N. López Mingorance, H. Waisman, and P. G. Tiscornia-Wasserman, "Pancreatic polypeptide: a review of its involvement in neuro-endocrine reflexes, islet-acinar interactions and ethanol-evoked physiopatologic pancreatic gland changes," *Acta Gastroenterol Latinoam*, vol. 45, no. 2, pp. 155–164, Jun. 2015.
- [14] S. Bank, P. Singh, N. Pooran, and B. Stark, "Evaluation of Factors That Have Reduced Mortality From Acute Pancreatitis Over the Past 20 Years:," *Journal of Clinical Gastroenterology*, vol. 35, no. 1, pp. 50–60, Jul. 2002, doi: 10.1097/00004836-200207000-00012.
- [15] Chiari, Hans., *Über Selbstverdauung des menschlichen Pankreas.*, vol. 17. Zeitschrift für Heilkunde., 1896.
- [16] R. Law, M. Parsi, R. Lopez, G. Zuccaro, and T. Stevens, "Cigarette Smoking Is Independently Associated with Chronic Pancreatitis," *Pancreatology*, vol. 10, no. 1, pp. 54–59, Apr. 2010, doi: 10.1159/000225927.
- [17] M. A. Bess, "Hyperparathyroidism and Pancreatitis: Chance or a Causal Association?," *JAMA*, vol. 243, no. 3, p. 246, Jan. 1980, doi: 10.1001/jama.1980.03300290028015.
- [18] G. J. Jurkovich and C. J. Carrico, "Pancreatic Trauma," *Surgical Clinics of North America*, vol. 70, no. 3, pp. 575–593, Jun. 1990, doi: 10.1016/S0039-6109(16)45131-5.
- [19] G. A. Lehman, S. Sherman, R. Nisi, and R. H. Hawes, "Pancreas divisum: results of minor papilla sphincterotomy," *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 39, no. 1, pp. 1–8, Jan. 1993, doi: 10.1016/S0016-5107(93)70001-2.

- [20] Ammann RW, Akovbiantz A, Largiader F, et al., *Course and outcome of chronic pancreatitis. Longitudinal study of a mixed medical-surgical series of 245 patients.*, vol. 86. *Gastroenterology*, 1984.
- [21] H. Sarles, J. P. Bernard, and L. Gullo, "Pathogenesis of chronic pancreatitis.," *Gut*, vol. 31, no. 6, pp. 629–632, Jun. 1990, doi: 10.1136/gut.31.6.629.
- [22] B. Etemad and D. C. Whitcomb, "Chronic pancreatitis: Diagnosis, classification, and new genetic developments," *Gastroenterology*, vol. 120, no. 3, pp. 682–707, Feb. 2001, doi: 10.1053/gast.2001.22586.
- [23] G. Zamboni *et al.*, "Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens," *Virchows Arch*, vol. 445, no. 6, pp. 552–563, Dec. 2004, doi: 10.1007/s00428-004-1140-z.
- [24] P. G. Lankisch, "Natural Course of Chronic Pancreatitis," *Pancreatology*, vol. 1, no. 1, pp. 3–14, Jan. 2001, doi: 10.1159/000055786.
- [25] R. W. Ammann and B. Muellhaupt, "The natural history of pain in alcoholic chronic pancreatitis," *Gastroenterology*, vol. 116, no. 5, pp. 1132–1140, May 1999, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70016-8.
- [26] N. Angelopoulos *et al.*, "Endocrine pancreatic insufficiency in chronic pancreatitis," *Pancreatology*, vol. 5, no. 2–3, pp. 122–131, Jan. 2005, doi: 10.1159/000085264.
- [27] S. Larsen, "Diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis," *Dan Med Bull*, vol. 40, no. 2, pp. 153–162, Apr. 1993.
- [28] D. C. Whitcomb *et al.*, "Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene," *Nat Genet*, vol. 14, no. 2, pp. 141–145, Oct. 1996, doi: 10.1038/ng1096-141.
- [29] J. Rosendahl *et al.*, "Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis," *Nat Genet*, vol. 40, no. 1, pp. 78–82, Jan. 2008, doi: 10.1038/ng.2007.44.
- [30] E. Masson, C. Le Maréchal, R. Delcenserie, J.-M. Chen, and C. Férec, "Hereditary pancreatitis caused by a double gain-of-function trypsinogen mutation," *Hum Genet*, vol. 123, no. 5, pp. 521–529, Jun. 2008, doi: 10.1007/s00439-008-0508-6.
- [31] M. H. M. Derikx, A. Geisz, É. Kereszturi, and M. Sahin-Tóth, "Functional significance of SPINK1 promoter variants in chronic pancreatitis," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 308, no. 9, pp. G779–784, May 2015, doi: 10.1152/ajpgi.00022.2015.
- [32] M. S. Petrov and D. Yadav, "Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis," *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, vol. 16, no. 3, pp. 175–184, Mar. 2019, doi: 10.1038/s41575-018-0087-5.
- [33] F. Lammert Lammert, Lynen, *Weissbuch Gastroenterologie 2020/2021 Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes, der Leber und der Bauchspeicheldrüse*. DGVS.
- [34] H. Miyake, H. Harada, K. Kunichika, K. Ochi, and I. Kimura, "Clinical Course and Prognosis of Chronic Pancreatitis:," *Pancreas*, vol. 2, no. 4, pp. 378–385, Jul. 1987, doi: 10.1097/00006676-198707000-00003.
- [35] DGVS, Ed., "S3-Leitlinien der Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS)."
- [36] G. Beyer, A. Habtezion, J. Werner, M. M. Lerch, and J. Mayerle, "Chronic pancreatitis," *The Lancet*, vol. 396, no. 10249, pp. 499–512, Aug. 2020, doi: 10.1016/S0140-6736(20)31318-0.
- [37] A. A. Aghdassi, J. Mayerle, S. Christochowitz, F. U. Weiss, M. Sendler, and M. M. Lerch, "Animal models for investigating chronic pancreatitis," *Fibrogenesis Tissue Repair*, vol. 4, no. 1, p. 26, Dec. 2011, doi: 10.1186/1755-1536-4-26.
- [38] M. Sendler *et al.*, "Complement Component 5 Mediates Development of Fibrosis, via Activation of Stellate Cells, in 2 Mouse Models of Chronic Pancreatitis," *Gastroenterology*, vol. 149, no. 3, pp. 765–776.e10, Sep. 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.012.
- [39] B. A. Neuschwander-Tetri, L. D. Ferrell, R. J. Sukhabote, and J. H. Grendell, "Glutathione monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse.," *J. Clin. Invest.*, vol. 89, no. 1, pp. 109–116, Jan. 1992, doi: 10.1172/JCI115550.

- [40] D. Feng *et al.*, "Interleukin-22 ameliorates cerulein-induced pancreatitis in mice by inhibiting the autophagic pathway," *Int J Biol Sci*, vol. 8, no. 2, pp. 249–257, 2012, doi: 10.7150/ijbs.3967.
- [41] B. A. Neuschwander-Tetri *et al.*, "Repetitive Self-Limited Acute Pancreatitis Induces Pancreatic Fibrogenesis in the Mouse," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 45, no. 4, p. 10, 2000.
- [42] M. Yamamoto, M. Otani, and M. Otsuki, "A new model of chronic pancreatitis in rats," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 291, no. 4, pp. G700-708, Oct. 2006, doi: 10.1152/ajpgi.00502.2005.
- [43] R. P. Sah, V. Dudeja, R. K. Dawra, and A. K. Saluja, "Cerulein-induced chronic pancreatitis does not require intra-acinar activation of trypsinogen in mice," *Gastroenterology*, vol. 144, no. 5, pp. 1076-1085.e2, May 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.041.
- [44] T. Mizunuma, S. Kawamura, and Y. Kishino, "Effects of injecting excess arginine on rat pancreas," *J Nutr*, vol. 114, no. 3, pp. 467–471, Mar. 1984, doi: 10.1093/jn/114.3.467.
- [45] J. Merkord and G. Hennighausen, "Acute pancreatitis and bile duct lesions in rat induced by dibutyltin dichloride," *Exp Pathol*, vol. 36, no. 1, pp. 59–62, 1989, doi: 10.1016/s0232-1513(89)80113-6.
- [46] W. R. Frontera and J. Ochala, "Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function," *Calcif Tissue Int*, vol. 96, no. 3, pp. 183–195, Mar. 2015, doi: 10.1007/s00223-014-9915-y.
- [47] H. Shiozu, M. Higashijima, and T. Koga, "Association of sarcopenia with swallowing problems, related to nutrition and activities of daily living of elderly individuals," *J Phys Ther Sci*, vol. 27, no. 2, pp. 393–396, 2015, doi: 10.1589/jpts.27.393.
- [48] C. Meyer, J. M. Dostou, S. L. Welle, and J. E. Gerich, "Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 282, no. 2, pp. E419–E427, Feb. 2002, doi: 10.1152/ajpendo.00032.2001.
- [49] R. R. Wolfe, "The underappreciated role of muscle in health and disease," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 84, no. 3, pp. 475–482, Dec. 2006, doi: 10.1093/ajcn/84.3.475.
- [50] P. B. Raven, Ed., *Exercise physiology: an integrated approach*. Australia ; Belmont, CA: Wadsworth Cengage Learning, 2013.
- [51] L. Sherwood, *Human physiology: from cells to systems*, 8th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013.
- [52] A. F. Huxley and R. Niedergerke, "Structural Changes in Muscle During Contraction: Interference Microscopy of Living Muscle Fibres," *Nature*, vol. 173, no. 4412, pp. 971–973, May 1954, doi: 10.1038/173971a0.
- [53] H. Huxley and J. Hanson, "Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation," *Nature*, vol. 173, no. 4412, pp. 973–976, May 1954, doi: 10.1038/173973a0.
- [54] R. Javan *et al.*, "Generating color-coded anatomic muscle maps for correlation of quantitative magnetic resonance imaging analysis with clinical examination in neuromuscular disorders," *Muscle Nerve*, vol. 48, no. 2, pp. 293–295, Aug. 2013, doi: 10.1002/mus.23780.
- [55] M. Fortin, T. Videman, L. E. Gibbons, and M. C. Battié, "Paraspinal Muscle Morphology and Composition: A 15-yr Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study," *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 46, no. 5, pp. 893–901, May 2014, doi: 10.1249/MSS.0000000000000179.
- [56] I. H. Rosenberg, "Summary comments," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 50, no. 5, pp. 1231–1233, Nov. 1989, doi: 10.1093/ajcn/50.5.1231.
- [57] I. H. Rosenberg, "Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance," *The Journal of Nutrition*, vol. 127, no. 5, pp. 990S-991S, May 1997, doi: 10.1093/jn/127.5.990S.
- [58] A. J. Cruz-Jentoft *et al.*, "Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis," *Age and Ageing*, vol. 48, no. 1, pp. 16–31, Jan. 2019, doi: 10.1093/ageing/afy169.

- [59] A. J. Cruz-Jentoft *et al.*, “Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People,” *Age and Ageing*, vol. 39, no. 4, pp. 412–423, Jul. 2010, doi: 10.1093/ageing/afq034.
- [60] Tidmarsh F. W., *Malnutrition*. Can Med Assoc J., 1923.
- [61] B. H. L. Tan *et al.*, “Sarcopenia is associated with toxicity in patients undergoing neo-adjuvant chemotherapy for oesophago-gastric cancer,” *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, vol. 41, no. 3, pp. 333–338, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.ejso.2014.11.040.
- [62] C. Yip *et al.*, “Assessment of sarcopenia and changes in body composition after neoadjuvant chemotherapy and associations with clinical outcomes in oesophageal cancer,” *Eur Radiol*, vol. 24, no. 5, pp. 998–1005, May 2014, doi: 10.1007/s00330-014-3110-4.
- [63] M. J. Santos, F. Vinagre, J. Canas da Silva, V. Gil, and J. E. Fonseca, “Body composition phenotypes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study of Caucasian female patients,” *Clin Exp Rheumatol*, vol. 29, no. 3, pp. 470–476, Jun. 2011.
- [64] L. Vlietstra, S. Stebbings, K. Meredith-Jones, J. H. Abbott, G. J. Treharne, and D. L. Waters, “Sarcopenia in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: The association with self-reported fatigue, physical function and obesity,” *PLoS One*, vol. 14, no. 6, p. e0217462, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0217462.
- [65] C. Corallo, A. Fioravanti, S. Tenti, G. Pecetti, R. Nuti, and N. Giordano, “Sarcopenia in systemic sclerosis: the impact of nutritional, clinical, and laboratory features,” *Rheumatol Int*, vol. 39, no. 10, pp. 1767–1775, Oct. 2019, doi: 10.1007/s00296-019-04401-w.
- [66] D. K. Mullady *et al.*, “Type of pain, pain-associated complications, quality of life, disability and resource utilisation in chronic pancreatitis: a prospective cohort study,” *Gut*, vol. 60, no. 1, pp. 77–84, Jan. 2011, doi: 10.1136/gut.2010.213835.
- [67] H. Regunath, B. M. Shivakumar, A. Kurien, K. Satyamoorthy, and C. G. Pai, “Anthropometric measurements of nutritional status in chronic pancreatitis in India: comparison of tropical and alcoholic pancreatitis,” *Indian J Gastroenterol*, vol. 30, no. 2, pp. 78–83, Mar. 2011, doi: 10.1007/s12664-011-0093-9.
- [68] R. Laugier, J.-P. Bernard, P. Berthezene, and P. Dupuy, “Changes in Pancreatic Exocrine Secretion with Age: Pancreatic Exocrine Secretion Does Decrease in the Elderly,” *Digestion*, vol. 50, no. 3–4, pp. 202–211, 1991, doi: 10.1159/000200762.
- [69] L. Kunovský *et al.*, “Causes of Exocrine Pancreatic Insufficiency Other Than Chronic Pancreatitis,” *JCM*, vol. 10, no. 24, p. 5779, Dec. 2021, doi: 10.3390/jcm10245779.
- [70] L. L. Kuan, A. R. Dennison, and G. Garcea, “Prevalence and Impact of Sarcopenia in Chronic Pancreatitis: A Review of the Literature,” *World J Surg*, vol. 45, no. 2, pp. 590–597, Feb. 2021, doi: 10.1007/s00268-020-05828-0.
- [71] K. Fearon *et al.*, “Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus,” *The Lancet Oncology*, vol. 12, no. 5, pp. 489–495, May 2011, doi: 10.1016/S1470-2045(10)70218-7.
- [72] F. E. Marino, G. Risbridger, and E. Gold, “Activin- $\beta_c$  modulates cachexia by repressing the ubiquitin-proteasome and autophagic degradation pathways: Activin- $\beta_c$  represses catabolic factors in the inhibin-KO mice,” *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, vol. 6, no. 4, pp. 365–380, Dec. 2015, doi: 10.1002/jcsm.12031.
- [73] M. J. Tisdale, “Reversing Cachexia,” *Cell*, vol. 142, no. 4, pp. 511–512, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.08.004.
- [74] K.-I. Goh, M. E. Cusick, D. Valle, B. Childs, M. Vidal, and A.-L. Barabási, “The human disease network,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, no. 21, pp. 8685–8690, May 2007, doi: 10.1073/pnas.0701361104.
- [75] O. Fiehn, “Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks,” *Comparative and Functional Genomics*, vol. 2, no. 3, pp. 155–168, 2001, doi: 10.1002/cfg.82.
- [76] W. R. Wikoff *et al.*, “Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 106, no. 10, pp. 3698–3703, Mar. 2009, doi: 10.1073/pnas.0812874106.

- [77] O. Beckonert *et al.*, “Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts,” *Nat Protoc*, vol. 2, no. 11, pp. 2692–2703, Nov. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.376.
- [78] S. Becker, L. Kortz, C. Helmschrodt, J. Thiery, and U. Ceglarek, “LC–MS-based metabolomics in the clinical laboratory,” *Journal of Chromatography B*, vol. 883–884, pp. 68–75, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2011.10.018.
- [79] H. G. Gika, G. A. Theodoridis, R. S. Plumb, and I. D. Wilson, “Current practice of liquid chromatography–mass spectrometry in metabolomics and metabonomics,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 87, pp. 12–25, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2013.06.032.
- [80] A. Zhang, H. Sun, and X. Wang, “Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 404, no. 4, pp. 1239–1245, Sep. 2012, doi: 10.1007/s00216-012-6117-1.
- [81] A. Moayyeri, C. J. Hammond, D. J. Hart, and T. D. Spector, “Effects of age on genetic influence on bone loss over 17 years in women: The Healthy Ageing Twin Study (HATS),” *J Bone Miner Res*, vol. 27, no. 10, pp. 2170–2178, Oct. 2012, doi: 10.1002/jbmr.1659.
- [82] M. Korostishevsky, C. J. Steves, I. Malkin, T. Spector, F. M. Williams, and G. Livshits, “Genomics and metabolomics of muscular mass in a community-based sample of UK females,” *Eur J Hum Genet*, vol. 24, no. 2, pp. 277–283, Feb. 2016, doi: 10.1038/ejhg.2015.85.
- [83] C. Stretch *et al.*, “Sarcopenia and myosteatorosis are accompanied by distinct biological profiles in patients with pancreatic and periampullary adenocarcinomas,” *PLoS ONE*, vol. 13, no. 5, p. e0196235, May 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0196235.
- [84] L. R. Viana, L. Lopes-Aguiar, R. Rossi Rosolen, R. Williams dos Santos, and M. C. Cintra Gomes-Marcondes, “<sup>1</sup>H-NMR Based Serum Metabolomics Identifies Different Profile between Sarcopenia and Cancer Cachexia in Ageing Walker 256 Tumour-Bearing Rats,” *Metabolites*, vol. 10, no. 4, p. 161, Apr. 2020, doi: 10.3390/metabo10040161.
- [85] L. C. Johnson *et al.*, “The plasma metabolome as a predictor of biological aging in humans,” *GeroScience*, vol. 41, no. 6, pp. 895–906, Dec. 2019, doi: 10.1007/s11357-019-00123-w.
- [86] J. H. Lautaoja *et al.*, “Muscle and serum metabolomes are dysregulated in colon-26 tumor-bearing mice despite amelioration of cachexia with activin receptor type 2B ligand blockade,” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 316, no. 5, pp. E852–E865, May 2019, doi: 10.1152/ajpendo.00526.2018.
- [87] Y.-Y. Zhao, “Metabolomics in chronic kidney disease,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 422, pp. 59–69, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.cca.2013.03.033.
- [88] E. E. Balashova *et al.*, “Plasma Metabolome Signature in Patients with Early-stage Parkinson Disease,” *CMB*, vol. 6, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.2174/2213235X05666170221161735.
- [89] T. P. Campbell, X. Sun, V. H. Patel, C. Sanz, D. Morgan, and G. Dantas, “The microbiome and resistome of chimpanzees, gorillas, and humans across host lifestyle and geography,” *ISME J*, vol. 14, no. 6, pp. 1584–1599, Jun. 2020, doi: 10.1038/s41396-020-0634-2.
- [90] F. Frost *et al.*, “Impaired Exocrine Pancreatic Function Associates With Changes in Intestinal Microbiota Composition and Diversity,” *Gastroenterology*, vol. 156, no. 4, pp. 1010–1015, Mar. 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2018.10.047.
- [91] L. M. Proctor, “The Human Microbiome Project in 2011 and Beyond,” *Cell Host & Microbe*, vol. 10, no. 4, pp. 287–291, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.chom.2011.10.001.
- [92] T. A. Manolio and F. S. Collins, “The HapMap and Genome-Wide Association Studies in Diagnosis and Therapy,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 60, no. 1, pp. 443–456, Feb. 2009, doi: 10.1146/annurev.med.60.061907.093117.
- [93] T. Yatsunenکو *et al.*, “Human gut microbiome viewed across age and geography,” *Nature*, vol. 486, no. 7402, pp. 222–227, Jun. 2012, doi: 10.1038/nature11053.
- [94] T. W. Buford, “(Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease,” *Microbiome*, vol. 5, no. 1, p. 80, Dec. 2017, doi: 10.1186/s40168-017-0296-0.

- [95] G. Falony *et al.*, “Population-level analysis of gut microbiome variation,” *Science*, vol. 352, no. 6285, pp. 560–564, Apr. 2016, doi: 10.1126/science.aad3503.
- [96] J. Arnemann, “16S-rDNA-Sequenzierung,” in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A. M. Gressner and T. Arndt, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019, pp. 2202–2202. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4\_3636.
- [97] M. W. Gray, D. Sankoff, and R. J. Cedergren, “On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA,” *Nucl Acids Res*, vol. 12, no. 14, pp. 5837–5852, 1984, doi: 10.1093/nar/12.14.5837.
- [98] B. Yang, Y. Wang, and P.-Y. Qian, “Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis,” *BMC Bioinformatics*, vol. 17, no. 1, p. 135, Dec. 2016, doi: 10.1186/s12859-016-0992-y.
- [99] A. Ticinesi, F. Lauretani, C. Tana, A. Nouvenne, E. Ridolo, and T. Meschi, “Exercise and immune system as modulators of intestinal microbiome: implications for the gut-muscle axis hypothesis,” *Exerc Immunol Rev*, vol. 25, pp. 84–95, 2019.
- [100] R. B. Batacan *et al.*, “A gut reaction: the combined influence of exercise and diet on gastrointestinal microbiota in rats,” *J Appl Microbiol*, vol. 122, no. 6, pp. 1627–1638, Jun. 2017, doi: 10.1111/jam.13442.
- [101] S. C. Campbell *et al.*, “The Effect of Diet and Exercise on Intestinal Integrity and Microbial Diversity in Mice,” *PLoS ONE*, vol. 11, no. 3, p. e0150502, Mar. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150502.
- [102] E. V. Lamoureux, S. A. Grandy, and M. G. I. Langille, “Moderate Exercise Has Limited but Distinguishable Effects on the Mouse Microbiome,” *mSystems*, vol. 2, no. 4, pp. e00006-17, Aug. 2017, doi: 10.1128/mSystems.00006-17.
- [103] J. R. Marchesi *et al.*, “The gut microbiota and host health: a new clinical frontier,” *Gut*, vol. 65, no. 2, pp. 330–339, Feb. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2015-309990.
- [104] T. S. B. Schmidt, J. Raes, and P. Bork, “The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation,” *Cell*, vol. 172, no. 6, pp. 1198–1215, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.02.044.
- [105] F. R. Ponziani *et al.*, “Characterization of the gut-liver-muscle axis in cirrhotic patients with sarcopenia,” *Liver Int*, vol. 41, no. 6, pp. 1320–1334, Jun. 2021, doi: 10.1111/liv.14876.
- [106] F. Frost *et al.*, “The Gut Microbiome in Patients With Chronic Pancreatitis Is Characterized by Significant Dysbiosis and Overgrowth by Opportunistic Pathogens,” *Clin Transl Gastroenterol*, vol. 11, no. 9, p. e00232, Sep. 2020, doi: 10.14309/ctg.0000000000000232.
- [107] A. C. Logan, F. N. Jacka, and S. L. Prescott, “Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue,” *Curr Allergy Asthma Rep*, vol. 16, no. 2, p. 13, Feb. 2016, doi: 10.1007/s11882-015-0590-5.
- [108] Q.-L. Xue, “The Frailty Syndrome: Definition and Natural History,” *Clinics in Geriatric Medicine*, vol. 27, no. 1, pp. 1–15, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.cger.2010.08.009.
- [109] J. E. Morley *et al.*, “Frailty Consensus: A Call to Action,” *Journal of the American Medical Directors Association*, vol. 14, no. 6, pp. 392–397, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.jamda.2013.03.022.
- [110] M. J. Delmonico *et al.*, “Alternative Definitions of Sarcopenia, Lower Extremity Performance, and Functional Impairment with Aging in Older Men and Women: SARCOPENIA INDICES, PERFORMANCE, AND AGING,” *Journal of the American Geriatrics Society*, vol. 55, no. 5, pp. 769–774, May 2007, doi: 10.1111/j.1532-5415.2007.01140.x.
- [111] Ockenga, J., *et al.*, *S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) in Zusammenarbeit mit der GESKES, der AKE und der DGVS, Klinische Ernährung in der Gastroenterologie (Teil 2) - Pankreas*, 39th ed. Aktual Ernährungsmed, 2014.
- [112] J. M. Argilés, S. Busquets, B. Stemmler, and F. J. López-Soriano, “Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention,” *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 22, pp. 100–106, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.coph.2015.04.003.

- [113] S. S. Olesen, A. Büyükuslu, M. Køhler, H. H. Rasmussen, and A. M. Drewes, "Sarcopenia associates with increased hospitalization rates and reduced survival in patients with chronic pancreatitis," *Pancreatology*, vol. 19, no. 2, pp. 245–251, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.pan.2019.01.006.
- [114] S. S. Olesen, J. L. Poulsen, M. C. H. Broberg, A. Madzak, and A. M. Drewes, "Opioid treatment and hypoalbuminemia are associated with increased hospitalisation rates in chronic pancreatitis outpatients," *Pancreatology*, vol. 16, no. 5, pp. 807–813, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.pan.2016.06.004.
- [115] M. Miyazaki and K. A. Esser, "Cellular mechanisms regulating protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy in animals," *J Appl Physiol (1985)*, vol. 106, no. 4, pp. 1367–1373, Apr. 2009, doi: 10.1152/jappphysiol.91355.2008.
- [116] V. Adams, C. Doring, and G. Schuler, "Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure," *Front Biosci*, vol. 13, pp. 302–311, Jan. 2008, doi: 10.2741/2680.
- [117] M. Eikermann *et al.*, "Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure," *Intensive Care Med*, vol. 32, no. 2, pp. 251–259, Feb. 2006, doi: 10.1007/s00134-005-0029-x.
- [118] M. J. Toth, P. A. Ades, M. D. Tischler, R. P. Tracy, and M. M. LeWinter, "Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure," *International Journal of Cardiology*, vol. 109, no. 2, pp. 179–187, May 2006, doi: 10.1016/j.ijcard.2005.06.006.
- [119] C. Dogra, H. Changoua, N. Wedhas, X. Qin, J. E. Wergedal, and A. Kumar, "TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine," *FASEB j.*, vol. 21, no. 8, pp. 1857–1869, Jun. 2007, doi: 10.1096/fj.06-7537com.
- [120] H. Li, S. Malhotra, and A. Kumar, "Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy," *J Mol Med*, vol. 86, no. 10, pp. 1113–1126, Oct. 2008, doi: 10.1007/s00109-008-0373-8.
- [121] C. H. Lang, R. A. Frost, and T. C. Vary, "Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 293, no. 2, pp. E453–459, Aug. 2007, doi: 10.1152/ajpendo.00204.2007.
- [122] D. J. MacEwan, "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences," *Cell Signal*, vol. 14, no. 6, pp. 477–492, Jun. 2002, doi: 10.1016/s0898-6568(01)00262-5.
- [123] L. Bertazza and S. Mocellin, "Tumor necrosis factor (TNF) biology and cell death," *Front Biosci*, vol. 13, pp. 2736–2743, Jan. 2008, doi: 10.2741/2881.
- [124] J. M. Satchek, A. Ohtsuka, S. C. McLary, and A. L. Goldberg, "IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1," *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 287, no. 4, pp. E591–601, Oct. 2004, doi: 10.1152/ajpendo.00073.2004.
- [125] Y.-P. Li *et al.*, "TNF- $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle," *FASEB j.*, vol. 19, no. 3, pp. 362–370, Mar. 2005, doi: 10.1096/fj.04-2364com.
- [126] V. Adams *et al.*, "Induction of MuRF1 Is Essential for TNF- $\alpha$ -Induced Loss of Muscle Function in Mice," *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, no. 1, pp. 48–59, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.087.
- [127] A. C. McPherron, A. M. Lawler, and S. J. Lee, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member.," *Nature*, no. 387, pp. 83–90, 1997.
- [128] S.-J. Lee and A. C. McPherron, "Regulation of myostatin activity and muscle growth," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 98, no. 16, pp. 9306–9311, Jul. 2001, doi: 10.1073/pnas.151270098.
- [129] R. Sartori, P. Gregorevic, and M. Sandri, "TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease," *Trends Endocrinol Metab*, vol. 25, no. 9, pp. 464–471, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.tem.2014.06.002.
- [130] S. Cohen, J. A. Nathan, and A. L. Goldberg, "Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 14, no. 1, pp. 58–74, Jan. 2015, doi: 10.1038/nrd4467.

- [131]J. Lin, H. B. Arnold, M. A. Della-Fera, M. J. Azain, D. L. Hartzell, and C. A. Baile, "Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 291, no. 3, pp. 701–706, Mar. 2002, doi: 10.1006/bbrc.2002.6500.
- [132]A. C. McPherron and S.-J. Lee, "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice," *J Clin Invest*, vol. 109, no. 5, pp. 595–601, Mar. 2002, doi: 10.1172/JCI13562.
- [133]W. E. Taylor *et al.*, "Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> muscle cells," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 280, no. 2, pp. E221–E228, Feb. 2001, doi: 10.1152/ajpendo.2001.280.2.E221.
- [134]X. Zhou *et al.*, "Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival," *Cell*, vol. 142, no. 4, pp. 531–543, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.011.
- [135]J. Hansen *et al.*, "Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine," *Endocrinology*, vol. 152, no. 1, pp. 164–171, Jan. 2011, doi: 10.1210/en.2010-0868.
- [136]G. Dimitriadis, P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou, and S. A. Raptis, "Insulin effects in muscle and adipose tissue," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 93, pp. S52–S59, Aug. 2011, doi: 10.1016/S0168-8227(11)70014-6.
- [137]E. Newsholme and G. Dimitriadis, "Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism," *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, vol. 109, no. Suppl 2, pp. S122–S134, Nov. 2001, doi: 10.1055/s-2001-18575.
- [138]Z. Liu and E. J. Barrett, "Human protein metabolism: its measurement and regulation," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 283, no. 6, pp. E1105–E1112, Dec. 2002, doi: 10.1152/ajpendo.00337.2002.
- [139]R. A. DeFronzo, "The Triumvirate:  $\beta$ -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM," *Diabetes*, vol. 37, no. 6, pp. 667–687, Jun. 1988, doi: 10.2337/diab.37.6.667.
- [140]R. A. DeFronzo, E. Jacot, E. Jequier, E. Maeder, J. Wahren, and J. P. Felber, "The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose: Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization," *Diabetes*, vol. 30, no. 12, pp. 1000–1007, Dec. 1981, doi: 10.2337/diab.30.12.1000.
- [141]S. Schiaffino, K. A. Dyar, S. Ciciliot, B. Blaauw, and M. Sandri, "Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy," *FEBS J*, vol. 280, no. 17, pp. 4294–4314, Sep. 2013, doi: 10.1111/febs.12253.
- [142]Burger HG, Igarashi M., "Inhibin: Definition and Nomenclature, Including Related Substances," *Endocrinology*, vol. 122, no. 4, pp. 1701–1702, Apr. 1988, doi: 10.1210/endo-122-4-1701.
- [143]S.-J. Lee *et al.*, "Regulation of muscle mass by follistatin and activins," *Mol Endocrinol*, vol. 24, no. 10, pp. 1998–2008, Oct. 2010, doi: 10.1210/me.2010-0127.
- [144]E. Latres *et al.*, "Activin A more prominently regulates muscle mass in primates than does GDF8," *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 15153, Apr. 2017, doi: 10.1038/ncomms15153.
- [145]E. E. Dupont-Versteegden, "Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy," *WJG*, vol. 12, no. 46, p. 7463, 2006, doi: 10.3748/wjg.v12.i46.7463.
- [146]A. J. Primeau, P. J. Adhihetty, and D. A. Hood, "Apoptosis in Heart and Skeletal Muscle," *Can. J. Appl. Physiol.*, vol. 27, no. 4, pp. 349–395, Aug. 2002, doi: 10.1139/h02-020.
- [147]B. Mayer and R. Oberbauer, "Mitochondrial Regulation of Apoptosis," *Physiology*, vol. 18, no. 3, pp. 89–94, Jun. 2003, doi: 10.1152/nips.01433.2002.
- [148]E. E. Dupont-Versteegden, "Apoptosis in muscle atrophy: Relevance to sarcopenia," *Experimental Gerontology*, vol. 40, no. 6, pp. 473–481, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.exger.2005.04.003.
- [149]Rocco J. Rotello, Rita C. Lieberman, Anthony F. Purchio and Lazaro E. Gerschenson, "Coordinated Regulation of Apoptosis and Cell Proliferation by Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Cultured Uterine Epithelial Cells," *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, no. Vol. 88, No. 8, pp. 3412–3415, 1991.

- [150]F. A. Oberhammer *et al.*, “Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 89, no. 12, pp. 5408–5412, Jun. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.12.5408.
- [151]F. Oberhammer *et al.*, “Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes,” *Cancer Res*, vol. 51, no. 9, pp. 2478–2485, May 1991.
- [152]Q. F. Wang *et al.*, “Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP.,” *Endocrinology*, vol. 137, no. 12, pp. 5476–5483, Dec. 1996, doi: 10.1210/endo.137.12.8940374.
- [153]S. J. McPherson, S. L. Mellor, H. Wang, L. W. Evans, N. P. Groome, and G. P. Risbridger, “Expression of Activin A and Follistatin Core Proteins by Human Prostate Tumor Cell Lines,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 11, pp. 5303–5309, Nov. 1999, doi: 10.1210/endo.140.11.7141.
- [154]Y. Zhang, Y. Qi, Y. Zhao, H. Sun, J. Ge, and Z. Liu, “Activin A induces apoptosis of mouse myeloma cells via the mitochondrial pathway,” *Oncol Lett*, Dec. 2017, doi: 10.3892/ol.2017.7584.
- [155]E. Koken *et al.*, “Exogenous follistatin administration ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury through anti-inflammation and anti-apoptosis effects,” *BLL*, vol. 121, no. 02, pp. 143–150, 2021, doi: 10.4149/BLL\_2020\_020.
- [156]M. Pietzner *et al.*, “Exocrine Pancreatic Function Modulates Plasma Metabolites Through Changes in Gut Microbiota Composition,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 106, no. 5, pp. e2290–e2298, Apr. 2021, doi: 10.1210/clinem/dgaa961.
- [157]Q. Yang, J. Sun, and Y. Q. Chen, “Multi-dimensional, comprehensive sample extraction combined with LC-GC/MS analysis for complex biological samples: application in the metabolomics study of acute pancreatitis,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 31, pp. 25837–25849, 2016, doi: 10.1039/C5RA26708K.
- [158]H. Xiao *et al.*, “Identification of potential diagnostic biomarkers of acute pancreatitis by serum metabolomic profiles,” *Pancreatology*, vol. 17, no. 4, pp. 543–549, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.pan.2017.04.015.
- [159]E. Sanchez-Lopez *et al.*, “Choline Uptake and Metabolism Modulate Macrophage IL-1 $\beta$  and IL-18 Production,” *Cell Metabolism*, vol. 29, no. 6, pp. 1350-1362.e7, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.011.
- [160]S. H. Zeisel and K.-A. da Costa, “Choline: an essential nutrient for public health,” *Nutrition Reviews*, vol. 67, no. 11, pp. 615–623, Nov. 2009, doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x.
- [161]D. Ouyang, “Metabolomic Characterization of Human Pancreatitis by 1H-NMR Spectroscopy,” *HGE*, Feb. 2012, doi: 10.5754/hge11839.
- [162]P. Takis *et al.*, “Fingerprinting Acute Digestive Diseases by Untargeted NMR Based Metabolomics,” *IJMS*, vol. 19, no. 11, p. 3288, Oct. 2018, doi: 10.3390/ijms19113288.
- [163]A. Sakai *et al.*, “Metabolomic analysis to discover candidate therapeutic agents against acute pancreatitis,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 522, no. 2, pp. 107–120, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.abb.2012.03.025.
- [164]J.-P. Lu, “Metabolic characteristics of acute necrotizing pancreatitis and chronic pancreatitis,” *Mol Med Report*, Apr. 2012, doi: 10.3892/mmr.2012.881.
- [165]R. L. Lyman and S. S. Wilcox, “Effect of Acute Amino Acid Deficiencies on Carcass Composition and Pancreatic Function in the Force-fed Rat,” *The Journal of Nutrition*, vol. 79, no. 1, pp. 37–44, Jan. 1963, doi: 10.1093/jn/79.1.37.
- [166]B. N. Girish, G. Rajesh, K. Vaidyanathan, and V. Balakrishnan, “Alterations in Plasma Amino Acid Levels in Chronic Pancreatitis,” *JOP. Journal of the Pancreas*, vol. Vol 12, pp. 11-18 Pages, Jan. 2011, doi: 10.6092/1590-8577/3377.
- [167]D. N. Frank, A. L. St. Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz, and N. R. Pace, “Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 104, no. 34, pp. 13780–13785, Aug. 2007, doi: 10.1073/pnas.0706625104.
- [168]C. Wu, M. Li, and W. Chen, “Characteristics of Gut Microbiota in Cerulein-Induced Chronic Pancreatitis,” *DMSO*, vol. Volume 14, pp. 285–294, Jan. 2021, doi: 10.2147/DMSO.S291822.

- [169]E. Margiotta *et al.*, “Association of Sarcopenia and Gut Microbiota Composition in Older Patients with Advanced Chronic Kidney Disease, Investigation of the Interactions with Uremic Toxins, Inflammation and Oxidative Stress,” *Toxins*, vol. 13, no. 7, p. 472, Jul. 2021, doi: 10.3390/toxins13070472.
- [170]S. N. Freedman, S. K. Shahi, and A. K. Mangalam, “The ‘Gut Feeling’: Breaking Down the Role of Gut Microbiome in Multiple Sclerosis,” *Neurotherapeutics*, vol. 15, no. 1, pp. 109–125, Jan. 2018, doi: 10.1007/s13311-017-0588-x.
- [171]Q. Hu *et al.*, “Intestinal flora alterations in patients with early chronic kidney disease: a case-control study among the Han population in southwestern China,” *J Int Med Res*, vol. 48, no. 6, p. 030006052092603, Jun. 2020, doi: 10.1177/0300060520926033.
- [172]A. Hiergeist, U. Reischl, and A. Gessner, “Multicenter quality assessment of 16S ribosomal DNA-sequencing for microbiome analyses reveals high inter-center variability,” *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 306, no. 5, pp. 334–342, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.ijmm.2016.03.005.

### **Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.

Greifswald \_\_\_\_\_

Doller, Julia \_\_\_\_\_

**Lebenslauf**

## Veröffentlichungen

Mats L. Wiese, Simone Gärtner, Nele von Essen, **Julia Doller**, Fabian Frost, Quang Trung Tran, Frank Ulrich Weiß, Fatuma Meyer, Luzia Valentini, Leif-Alexander Garbe, Cornelia C. Metges, Karen Bannert, Lea Franziska Sautter, Luise Ehlers, Robert Jaster, Georg Lamprecht, Antje Steveling, Markus M. Lerch, Ali A. Aghdassi: Malnutrition is highly prevalent in patients with chronic pancreatitis and characterized by loss of skeletal muscle mass but absence of impaired physical function. *Frontiers in Nutrition*, section Clinical Nutrition 2022, Akzeptiert.

Tran QT, van Tran H, Sendler M, **Doller J**, Wiese M, Bolsmann R, Wilden A, Glaubitz J, Modenbach JM, Thiel FG, de Freitas Chama LL; Weiss FU, Lerch MM, Aghdassi AA.: Role of Bile Acids and Bile Salts in Acute Pancreatitis. *Pancreas* 2021;50(1):3-11.

Wiese M, Gärtner S, **Doller J**, Tran TQ, Frost F, Bannert K, Jaster R, Berlin P, Valentini L, Meyer F, Metges CC, Lamprecht G, Lerch MM; Aghdassi AA.: Nutritional management of chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Gastroenterol Hepatol*, Volume 36, 2020, Page 588-600

**J. Doller**, M. Sendler, F.U. Weiss, M.L. Wiese, J. Fielitz, M. Delcea, S. Görs, C. Metges, L. Ehlers, K. Bannert, R. Jaster, M. Lerch, A. Aghdassi, Loss of muscle mass and strength in experimental chronic pancreatitis, *Pancreatology*, Volume 21, Supplement 1, 2021, Page S21, ISSN 1424-3903

Ehlers L\*, Bannert K\*, Rohde S, Berlin P, Reiner J, Wiese ML, **Doller J**, Lerch MM, Aghdassi AA, Meyer F, Valentini L, Agrifoglio O, Metges CC, Lamprecht G, Jaster R. Preclinical insights into the gut-skeletal muscle axis in chronic gastrointestinal diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2020; 24(15):8304-8314.

## **Kongressbeiträge und Poster**

Deutscher Pankreas Kongress (DPC) 2022

**Doller J**, Sendler M, Weiss FU, Wiese M, Fielitz J, Delcea M, Görs S, Metges C, Ehlers L, Bannert K, Jaster R, Lambrecht G., Lerch MM, Aghdassi A. Loss of muscle mass and strength in experimental chronic pancreatitis. Poster und Vortrag DPC

European Pancreatic Club (EPC) 2021

**Doller J**, Sendler M, Weiss FU, Wiese M, Fielitz J, Delcea M, Görs S, Metges C, Ehlers L, Bannert K, Jaster R, Lerch MM, Aghdassi A. Loss of muscle mass and strength in experimental chronic pancreatitis. Poster und Vortrag EPC

Forschungscamp Universität Rostock 2019

EnErGie: Enteral Nutrition in Malnutrition due to Gastrointestinal Diseases From Basic Understanding to Innovative Treatment Concepts Dr. Luise Ehlers, Dr. Sarah Rohde, Lea Sautter, **Julia Doller**, Mats Wiese, Fatuma Meyer, Susanne Esau, Ottavia Agrifoglio, Fabian Schröder, Matthias Koch, Dr. Karen Bannert

## **Danksagung**

Als erstes danke ich Frau Prof. Dr. Mihaela Delcea und Herrn Prof. Dr. Markus M. Lerch für die Übernahme sowie Anerkennung meiner Arbeit. Vor allem für die freundliche und kompetente Betreuung möchte ich mich bei Ihnen bedanken.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Ali A. Aghdassi. Ich bedanke mich nicht nur für die großartige fachliche Betreuung, sondern auch für die immerwährende Hilfsbereitschaft sowie für viele konstruktive Diskussionen. Ich möchte mich hiermit für dein „offenes Ohr“ und deine Hilfe jeglicher Art sowie für deine aufbauenden Worte bedanken.

Weiterhin danke ich unserem Laborleiter Herrn Dr. F. Ulrich Weiss und PD Dr. Matthias Sandler für anregende Diskussionen, immerwährende Hilfsbereitschaft und die herzliche Aufnahme im Labor.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Susan Mouchantat und Herr Stefan Hadlich für die Einarbeitung, Betreuung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente am Kleintier MRT. Sowie Frau Dr. Marie-Luise Kromrey für die Unterstützung bei der Auswertung der MRT-Bilder.

Herrn PD Dr. Fabian Frost und Herrn Dr. Stefan Weiß möchte ich für die Unterstützung bei der Auswertung und Analyse der Mikrobiomdaten danken.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald für die Messung und Auswertung der Metabolomdaten danken. Besondere Dank gilt hier Frau Dr. K. Budde und Frau Dr. F. Gauß.

Weiter danke ich den Kooperationspartnern aus dem EnErGie Projekt von der Universität Rostock und vom FBN im Dummerstorf. Die Zusammenarbeit war stets geprägt von einer angenehmen Atmosphäre, wertvollen Diskussionen und gegenseitiger Unterstützung. Besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle der Projektmanagerin Anne-Marie Schmitt aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren KollegInnen der Arbeitsgruppe „Innere Medizin A“. Ich bedanke mich bei jedem einzelnen für die Hilfe und Unterstützung. Besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang an Dr. Franziska Thiel, Jenny Radel und Susi Wiche, ihr wart stets ein großer Rückhalt für mich. Auch auf die Hilfe von Diana Krüger und Kathrin Gladrow konnte ich immer zählen.

Schließlich möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für eure grenzenlose Unterstützung und Hilfe bedanken. Besondere Dank geht dabei an Marco Scharf und Anne Vormelchert für eure Unterstützung und Ermutigungen.

Die Promotion wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „EnErGie“ angefertigt und durch Mittel des Europäischen Sozialfonds (ESF) finanziert (ESF/14-BM-A55-0007/18 bis ESF/14-BM-A55-0011/18). Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil des Qualifikationsprogrammes „Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in exzellenten Forschungsverbänden - Exzellenzforschungsprogramm des Landes Mecklenburg-Vorpommern“.



Europäische Fonds EFRE, ESF und ELER  
in Mecklenburg-Vorpommern 2014-2020



**EUROPÄISCHE UNION**  
Europäischer Sozialfonds