

**Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Transplantations-, Gefäß- und
Kinderchirurgie der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer

**Roux-en-Y Magenbypass spezifische metabolomische Veränderungen in Urin, Faeces und
Plasma - Charakterisierung im Zucker (fa/fa) Rattenmodell**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Arno Wilhelm Nordbeck

aus Kelkheim (Taunus)

Würzburg, Juli 2021



Referent bzw. Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Florian Seyfried
Korreferent bzw. Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. med. Martin Fassnacht
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2022

Der Promovend ist Arzt

Roux-en-Y Magenbypass spezifische metabolomische Veränderungen in Urin, Faeces und Plasma - Charakterisierung im Zucker (fa/fa) Rattenmodell

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Adipositas	1
1.2	Adipositas assoziierte Morbidität: Typ 2 Diabetes Mellitus	4
1.3	Bariatrische/metabolische Chirurgie.....	5
1.4	Intestinales Mikrobiom	8
1.5	Gallensäuren	10
1.6	Offene Fragen metabolischer Veränderungen nach RYGB.....	11
1.7	Wertigkeit und Sinn translationaler, tierexperimenteller Forschung	12
1.8	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum.....	13
2.2	Zucker Ratten (fa/fa) und experimentelles Design	13
2.3	Präoperative Phase	14
2.4	Versuchsgruppen.....	14
2.5	Perioperative Behandlung.....	15
2.6	Operationen:.....	15
2.6.1	Roux-en-Y Magenbypass (RYGB).....	15
2.6.2	Operationen: Scheinoperation.....	16
2.7	Postoperative Versorgung	16
2.8	Stoffwechsellkäfige.....	16
2.9	Kalorimetrie	17
2.10	Oraler Glukosetoleranztest (oGTT) und ELISAs	18
2.11	Euthanasie und Probenasservierung	18
2.12	Metabolic profiling durch Kernspinresonanzspektroskopie von Urin, Faeces, systemischem sowie portalvenösem Plasma	19
2.13	Kernspinresonanzspektroskopie: Datenanalyse.....	21

2.14 Ultra-Performance Flüssigchromatographie (UPLC) Tandem Massenspektrometrie zur Gallensäuremessung	22
2.15 16S rRNA genbasierte Sequenzierungsanalyse	24
2.16 Statistik.....	24
3 Ergebnisse	26
3.1 Körpergewicht.....	26
3.2 Nahrungsaufnahme	27
3.3 Energiegehalt der Faeces (Kalorimetrie).....	28
3.4 Oraler Glukosetoleranztest (Glukose, Insulin).....	29
3.5 Globale Metabolite in den Faeces.....	32
3.6 Globale Metabolite im Urin.....	35
3.7 Biochemische Plasmazusammensetzung	37
3.8 Gallensäuren im Plasma (portalvenös und systemisch) und im Urin	39
3.9 Fäkale bakterielle Komposition	43
4 Diskussion.....	50
5 Zusammenfassung.....	64
6 Angabe des Eigenanteils.....	65
7 Literaturverzeichnis	65

1 Einleitung

1.1 Adipositas

Die pandemieartige Ausbreitung von Übergewicht und Adipositas ist eines der führenden gesundheitsökonomischen Probleme des 21. Jahrhunderts [1, 2]. So stehen aktuell Übergewicht und Adipositas laut der World Health Organisation (WHO) global auf Platz 5 der Erkrankungen mit den meisten Todesfällen [3].

Weltweit sind derzeit mehr als 1,9 Milliarden Menschen übergewichtig und von diesen über 650 Millionen adipös. Die Prävalenz der Adipositas hat sich in den letzten 40 Jahren insgesamt fast verdreifacht [4]. Aktuelle Hochrechnungen prognostizieren, dass im Jahr 2030 mehr als 50 Prozent der europäischen Bevölkerung adipös sein werden [5].

Die Gründe für diese Entwicklung sind vielfältig und komplex. Die alimentäre Adipositas, resultierend aus einer erhöhten Kalorienaufnahme und einem erniedrigten Kalorienverbrauch, ist in der westlichen Welt die häufigste Form. Deren Ausbreitung wird durch die ständige Verfügbarkeit hochkalorischer und wohlschmeckender Nahrung und einer Reduktion von körperlicher Aktivität begünstigt [6, 7].

Der Krankheitswert der Adipositas liegt neben der meist reduzierten physischen Funktionalität, der häufig mit der Erkrankung einhergehenden sozialen Stigmatisierung und reduzierten Lebensqualität insbesondere in der mit ihr assoziierten Morbidität, die je nach Krankheitsausprägung und Prävalenzdauer gehäuft auftritt [8]. Typische Begleiterkrankungen sind Diabetes Mellitus Typ 2, Bluthochdruck und Dyslipidämie (zusammengefasst als metabolisches Syndrom), sowie Arteriosklerose, koronare Herzerkrankungen, maligne Neoplasien, Arthrose und Gallenblasenerkrankungen. Aufgrund der epidemiologischen Entwicklung werden neue und effektive Behandlungsmöglichkeiten zur Behandlung von Übergewicht und Adipositas dringend benötigt [1, 6, 9]. Dies auch aus volkswirtschaftlicher Sicht. Aus den USA und Großbritannien liegen Daten vor, dass für eine adipöse Person ungefähr 30% mehr Kosten für das Gesundheitssystem entstehen als durch einen vergleichbaren

normalgewichtigen Menschen. Dabei sind schwer kalkulierbare indirekte Kosten, z.B. Arbeitsausfälle durch Krankschreibungen, noch nicht einbezogen [10].

Um die Adipositas zu klassifizieren, werden Einteilungen nach verschiedenen Parametern vorgenommen. Der Body-Mass-Index (BMI) ist das Verhältnis zwischen Körpergewicht und Körpergröße (kg/m^2) und beschreibt insgesamt sechs Kategorien: Untergewicht (BMI $<18,5$), Normalgewicht (BMI 18,5-25), Übergewicht (Präadipositas, BMI 25-29,9), Adipositas Grad I, II und III [11]. Tabelle 1 zeigt die Einteilung der Kategorien nach BMI.

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation nach BMI beim Erwachsenen

Kategorie	BMI (kg/m^2)
Untergewicht	$<18,5$
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht/Präadipositas	25-29,9
Adipositas Grad I	30-34,9
Adipositas Grad II	35-39,9
Adipositas Grad III (= morbide Adipositas)	≥ 40

Adipositas Grad III und der Begriff „morbide Adipositas“ werden synonym verwendet [12]. Grund hierfür ist, dass in dieser Kategorie die oben genannten Adipositas-assoziierten Erkrankungen häufiger auftreten. Trotzdem ist die Einteilung anhand des BMI rein deskriptiv und berücksichtigt nicht die individuelle Morbidität des Patienten.

Hierzu sind komplexere Klassifizierungssysteme, wie das evaluierte Edmonton Obesity Staging System (EOSS) besser geeignet. Mit Hilfe des EOSS kann die individuelle Morbidität eines jeden Patienten abgebildet werden. Dies ermöglicht prognostische Aussagen und erlaubt Hinweise zur Dringlichkeit einer Therapie. Die Klassifizierung nach EOSS hat drei unterschiedliche Dimensionen: funktionelle psychische und körperliche Einschränkungen im täglichen Leben sowie Komorbiditäten (Tab. 2) [13, 14].

Tabelle 2: EOSS Klassifizierung

EOSS Stage	Beschreibung
0	Keine Adipositas-assoziierten Komorbiditäten wie z.B. erhöhte Blutfette oder Bluthochdruck; keine physischen Symptome, keine psychischen Einschränkungen,
1	Vorhandensein subklinischer Adipositas-assoziiierter Komorbiditäten wie z.B. Borderline-Hypertension oder erhöhte Leberenzyme; milde physische oder psychische Symptome
2	Vorhandensein Adipositas-assoziiierter Komorbiditäten (z.B. Bluthochdruck oder Diabetes mellitus Typ 2); moderate physische oder psychische Symptome
3	Bestehende Endorganschäden, z.B. Herzinfarkt, diabetische Nephropathie/Polyneuropathie; erhebliche physische oder psychische Einschränkungen
4	Schwere Funktionseinschränkungen („end stage“) durch Adipositas-assoziierte Komorbiditäten; starke physische oder psychische Einschränkungen

In einer europäischen Studie mit ca. 14.000 Teilnehmenden konnte gezeigt werden, dass die meisten Befragten nicht ausreichend über die Risiken der Adipositas aufgeklärt sind. Zudem schätzten sich über 70% der übergewichtigen bzw. adipösen Personen nur als normalgewichtig bzw. übergewichtig ein [15]. Wenn die Adipositas als chronisch fortschreitende Erkrankung mit hoher Rezidivneigung verstanden wird, wird die Relevanz für eine Entwicklung erfolgreicher Präventionsstrategien deutlich [15].

Therapieziel für Patienten mit einem BMI ≥ 35 kg/m² ist laut der aktuellen interdisziplinären S3-Leitlinie „Prävention und Therapie der Adipositas“ ein Gewichtsverlust von mehr als zehn Prozent des Ausgangsgewichts innerhalb von 6-12 Monaten [11]. Bei diesem Patientenkollektiv und vor allem bei morbid adipösen Patienten (BMI ≥ 40 kg/m²) zeigen konservative Therapiemaßnahmen zumeist nur unzureichende und keine nachhaltigen Therapieerfolge [16]. Die konservativen Methoden werden dadurch erschwert, dass der menschliche Körper seinen Grundumsatz reduziert, sobald er weniger Energie zur Verfügung hat – evolutionsbiologisch ein wichtiger Mechanismus [17].

Als Therapieformen werden in erster Linie zumeist konservative Ansätze (intensive Life-Style-Intervention (ILI)) mit einer langfristigen Nahrungsumstellung, verringerter Kalorienaufnahme, einer Steigerung der körperlichen Aktivität und motivierender

Gruppen- und Individualtherapie mit Physio- und Bewegungstherapie genutzt [18]. In der großen randomisierten Look AHEAD Studie hatten übergewichtige, diabetische Patienten 8 Jahre nach Therapiestart der ILI einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von 4,7% erzielt. Patienten, die schon nach einem Jahr keinen adäquaten Gewichtsverlust erzielen konnten, hatten eine schlechte Prognose und nach 8 Jahren häufig sogar an Gewicht zugenommen [19].

Auch die bei vielen Krankheiten ansonsten sehr effektive Pharmakotherapie spielt bei der Behandlung der Adipositas bisher nur eine geringe Rolle und ist in der Behandlung morbid adipöser Patienten meist nicht erfolgreich. Aufgrund ungünstiger Nebenwirkungen wurden seit 1997 mehrere Substanzklassen von verschiedenen Zulassungsbehörden zurückgezogen [20, 21]. Derzeit sind in den USA vier Pharmaka für die Langzeittherapie zugelassen [21]. Orlistat, ein Lipaseinhibitor, verhindert die intestinale Verdauung von Fetten [22, 23]. Hochdosis Phentermin plus Topiramate extended release kombiniert mit einer lifestyle Intervention konnte einen additiven Gewichtsverlust von 9% im Vergleich zur Placebo Gruppe bewirken. Diese Medikamente bewirken eine Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren, eine Senkung der Mortalität oder Morbidität konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden [24].

Liraglutid, ein GLP-1 Analogon, konnte bei Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 38 kg/m² in einem Drittel der Fälle einen Gewichtsverlust von >10% erzeugen [25]. In zwei Drittel der Fälle wurde also auch mit diesem Medikament die Adipositas unzureichend therapiert. Neue Kombinationstherapien wie zum Beispiel GLP-1 Analoga mit Glukagon oder mit einem glukoseabhängigen, insulinotropen Peptid werden aktuell in präklinischen sowie klinischen Studien geprüft, um die Wirksamkeit zu verbessern [26].

1.2 Adipositas assoziierte Morbidität: Typ 2 Diabetes Mellitus

Der Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist eine der häufigsten Adipositas-assoziierten Erkrankungen. Adipöse haben ein mehr als 3-faches Risiko zu erkranken und etwa 80% der Patienten mit T2DM sind adipös [11]. Für diese Form des Diabetes, der sich aufgrund einer Adipositas (englisch=obesity) entwickelt, entstand der Begriff „Diabesity“ [27]. Laut einer Studie der International Diabetes Federation (IDF) litten im Jahr 2017 ca. 8,8% der Weltbevölkerung an T2DM. Prognosen zufolge soll sich dieser Anteil bis zum Jahr 2045

auf 9,9% erhöhen [28]. Die geschätzten Kosten der Diabetestherapie beliefen sich bereits im Jahr 2017 weltweit auf ca. 850 Milliarden US-Dollar [28].

Der T2DM kann pathophysiologisch durch unterschiedliche Ausprägungen einer Insulinresistenz sowie eines relativen Insulinmangels bis hin zu einem weitgehend sekretorischen Defekt charakterisiert werden und führt dadurch zu erhöhten Blutzuckerspiegeln [29].

Die WHO führt 6% aller globalen Todesfälle auf erhöhten Blutzucker zurück [3]. Zunächst ist der T2DM eine Erkrankung mit keinen oder nur milden, unspezifischen Symptomen. Mit zunehmender Krankheitsdauer und begünstigt durch nicht stattfindende oder unzureichende Therapie können sich durch die Angiopathie (Gefäßerkrankung) und Neuropathie (Nervenerkrankung) Endorganschäden wie z.B. eine Niereninsuffizienz, koronare Herzerkrankung oder ein diabetisches Fußsyndrom entwickeln [30].

Die Therapieziele sind der Erhalt bzw. das Wiedererlangen eines normalen Blutzuckerspiegels, eines normalen Blutdrucks, einer Cholesterinsenkung sowie einer Gewichtsreduktion. Die Ziele sollten dabei stets individuell angepasst werden, je nach Alter, Komorbiditäten und Lebenssituation jedes Patienten [31]. Zudem sollte eine multimodale Therapie erfolgen. Die Basistherapie und Therapiestufe 1 nach der Deutschen Diabetes Gesellschaft stellt eine gesunde, zuckerarme Ernährung, eine Diabetesschulung, eine Plasmaglukoseselbstbestimmung, die Steigerung körperlicher Aktivität sowie eine Tabakentwöhnung dar [31]. Werden hiermit die Therapieziele nach spätestens 3 Monaten nicht erreicht, ist eine medikamentöse Monotherapie indiziert (Therapiestufe 2). Sofern kardiovaskuläre oder renale Erkrankungen vorbestehen, wird eine medikamentöse 2-fach Kombination empfohlen (Therapiestufe 3). Therapiestufe 4 ist erreicht, wenn die Therapie mit einem Insulin begonnen werden muss [31].

1.3 Bariatrische/metabolische Chirurgie

Das Konzept der bariatrischen, also gewichtsreduzierenden Operationen entstand, als nach Dünndarm- oder Magenresektionen unbeabsichtigt relevante Gewichtsverluste auffielen [32]. Entwickelt wurde es in den Vereinigten Staaten, doch mittlerweile wird in über 40 Ländern bariatrisch operiert und im Jahr 2013 wurden weltweit 468.609 bariatrische Eingriffe registriert [33]. Mittlerweile hat sich die bariatrische Chirurgie von

einem initial experimentellen, risikoreichen Eingriff mit unklaren Langzeitfolgen zu einem evidenz-basierten Bereich der Spitzenmedizin entwickelt [34].

Die Indikation für eine bariatrische Operation ist laut nationaler interdisziplinärer S3-Leitlinie von 2018 gegeben, wenn (1.) ein BMI ≥ 40 ohne Begleiterkrankungen vorliegt und die konservativen Maßnahmen erschöpft sind, (2.) ein BMI ≥ 35 mit Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes oder Herzinsuffizienz vorliegt und die konservativen Maßnahmen erschöpft sind oder (3.) als Primärindikation ohne vorherige konservative Therapie, wenn entweder ein BMI ≥ 50 vorliegt oder eine besondere Schwere der Begleit- und Folgeerkrankungen, die einen Aufschub der operativen Therapie nicht gerechtfertigt erscheinen lassen [16].

In einer prospektiv randomisierten Studie von Schauer et. al. zeigten Patienten fünf Jahre postoperativ ca. 20% totalen Gewichtsverlust (TWL, total weight loss), wohingegen durch die medikamentöse Therapie lediglich ein Gewichtsverlust von 5% gefunden wurde [35]. In einer Publikation von Adams et. al. mit über 1100 Patienten stand ein totaler Gewichtsverlust von 27% in der Gruppe der mittels Roux-en-Y-Magenbypass (RYGB) operierten Patienten nach 12 Jahren einem totalen Gewichtsverlust von 2% in der nicht operierten Gruppe entgegen [36]. Weitere Studien zeigen ebenso nachhaltige Langzeitergebnisse nach bariatrischen Operationen und beweisen die Überlegenheit der bariatrischen Operation im Vergleich zu der konservativen Therapie, sodass im Langzeitverlauf die Operation als einzig wirksame Therapie der Adipositas Grad II und III gilt [37, 38].

Zusätzlich zu dem Gewichtsverlust zeigte sich eine verbesserte Blutzuckerkontrolle mit Remissionsraten eines etwaigen vorbestehenden T2DM in bis zu 40%, sodass der Begriff der metabolischen Chirurgie entstand [39, 40]. Hochrangig publizierte Studien beweisen die größere Effektivität der metabolischen OP gegenüber der intensiven konservativen Therapie beim T2DM [35, 37, 41].

Daraus ergibt sich die metabolische Indikation zur Operation unter Berücksichtigung des bisherigen individuellen Therapieerfolgs: Bei Patienten mit einem BMI zwischen 30 und 34,9 (Adipositas Grad I) und unzureichender Diabeteseinstellung soll laut internationaler Diabetes Organisationen sowie der nationalen S3 Leitlinie ein Eingriff erwogen, ab einem

BMI von $\geq 35 \text{ kg/m}^2$ (Adipositas Grad II) mit Adipositas-assoziierten Begleiterkrankungen empfohlen werden [16, 42, 43].

Die historischen Konzepte der Nahrungsrestriktion und Malabsorption erklären die Wirkungsweise der metabolisch-bariatrischen Chirurgie nur unzureichend. Heute ist bekannt, dass komplexe hormonelle und neuroendokrine Modifikationen den Effekt der Operationen herbeiführen. Der Darm fungiert zusammen mit dem enterischen Nervensystem als physiologische Schaltzentrale [44].

So konnte nach einer bariatrisch-metabolischen Operation bei den Patienten insgesamt ein geringeres Hungergefühl und eine veränderte Lebensmittelpräferenz hin zu weniger kohlenhydrat- und fettreichem Essen nachgewiesen werden [45, 46]. Als Ursache werden postprandial erhöhte physiologisch wirksame Spiegel von gastrointestinalen anorektischen Peptidhormonen wie z.B. dem Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und dem Peptid Tyrosyl-Tyrosin (PYY) diskutiert. Die Synthese und Sekretion dieser beiden Hormone erfolgt in intestinalen neuroendokrinen L-Zellen, die vorwiegend in der Mukosa des terminalen Ileums und Kolons lokalisiert sind [47-49]. GLP-1 ist ein potentes Peptidhormon und führt zu einer erhöhten Insulinausschüttung [50, 51]. Die Mechanismen, wodurch dieser postoperative Effekt hervorgerufen wird, sind noch nicht abschließend erforscht. Als mögliche Ursachen diskutiert werden unter anderem eine erhöhte enterische Konzentration von Fettsäuren und die Bedeutung biologisch aktiver Gallensäuren [52].

Der Roux-en-Y Magenbypass (RYGB) ist einer der weltweit am häufigsten durchgeführten bariatrischen Eingriffe [53]. Bei dieser Operationsmethode wird ein kleiner Vormagen von ca. 25-35 ml Volumen (Pouch) gebildet und mit dem oberen Dünndarm (alimentäre Schlinge) verbunden. Der Hauptanteil des Magens, sowie der Zwölffingerdarm und das obere Jejunum werden von der Nahrungspassage ausgespart (Bypass). Damit verliert der Magen weitgehend seine Nahrungsspeicher- und Verdauungsfunktion. Der von der Nahrungspassage ausgesparte Dünndarm (bilio-pankreatische Schlinge) leitet lediglich Verdauungssäfte (Galle, Sekrete der Bauchspeicheldrüse), wohingegen die alimentäre Schlinge zumeist unverdaute Nahrung transportiert. Beide Schlingen werden nach Roux zu einer gemeinsamen Schlinge

vereinigt [54]. Abbildung 1a) zeigt die physiologische Magen-Darm Anatomie und Abbildung 1b) die anatomischen Verhältnisse nach RYGB.

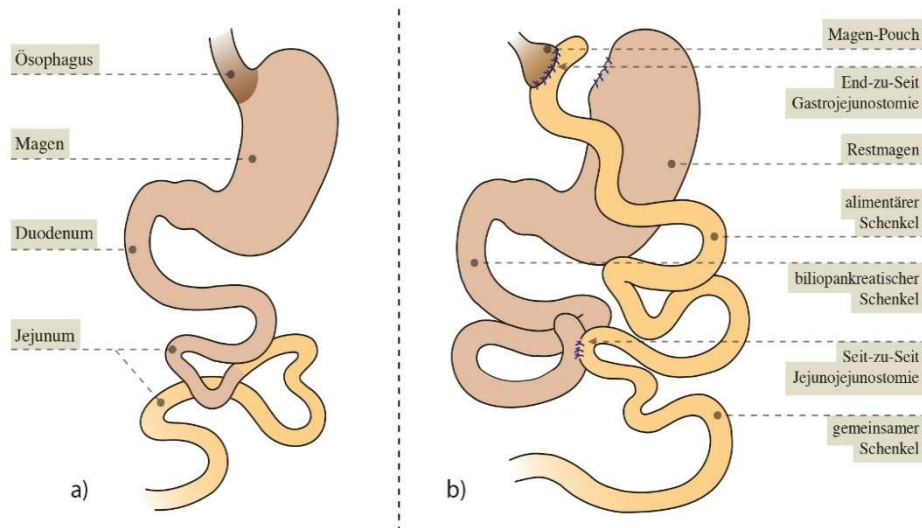


Abbildung 1 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. L. Rotzinger):
a) Magen-Darm-Anatomie physiologisch b) Magen-Darm-Anatomie nach RYGB

Die bariatrische Chirurgie stellt heute evidenzbasiert die effektivste Therapie der Adipositas dar. Dennoch ist der derzeitige Forschungsstand unbefriedigend. Gesucht wird nach weniger invasiven, nebenwirkungsarmen pharmakologischen Möglichkeiten der Adipositastherapie. Solche können sich aus dem Verständnis der physiologischen Folgen bariatrischer Chirurgie ergeben, sofern diese vollständig entschlüsselt sind.

1.4 Intestinales Mikrobiom

Das Mikrobiom des Menschen besteht aus den ihn besiedelnden Bakterien und Pilzen. Das intestinale Mikrobiom bildet dabei den größten Anteil des Mikrobioms des Menschen. Insgesamt geht man von einer Biomasse von ca. 1,5 kg im Intestinum aus, wobei der Hauptanteil von Bakterien gebildet wird [55]. Der Magen-Darm-Trakt stellt dabei eine riesige „Kommunikationsfläche“ (ca. 250-400 m²) für menschliche Zellen und dem Mikrobiom und anderen Umweltfaktoren (durch die Aufnahme von Nahrung) dar. Die Ausprägung des intestinalen Mikrobioms beginnt bereits mit der Geburt. Die anfängliche Dominanz der aeroben Bakterienstämme Actinobacteria und Proteobacteria [56, 57] weicht in den ersten Lebenswochen einer komplexen, zunehmend anaeroben

Besiedlung. Im Laufe des Lebens kommt es zu verschiedenen altersspezifischen und physiologischen Veränderungen im intestinalen Mikrobiom [58]. In diesem Zusammenhang stellt die Ernährung einen relevanten Einflussfaktor auf die Entwicklung des intestinalen Mikrobioms dar [59]. Das Erwachsenenalter zeigt im Allgemeinen eine eher konstante Ausprägung des intestinalen Mikrobioms, allerdings kann es durch Änderung der Nahrungsgewohnheiten sowie externe Trigger zu signifikanten Veränderungen kommen [60].

Studien konnten zeigen, dass sich das intestinale Mikrobiom adipöser Menschen deutlich unterscheidet von dem intestinalen Mikrobiom normalgewichtiger Menschen: Adipositas ist assoziiert mit signifikant weniger Bacteroides und mehr Firmicutes [61]. Bacteroides werden protektive Eigenschaften in Bezug auf das kardiovaskuläre System, auf die Karzinogenese sowie auf die metabolische Kontrolle zugeschrieben [62]. Bei Typ 2 Diabetikern konnten Butyrat-bildende Bakterien signifikant verringert und Lactobacillus spp. signifikant vermehrt gemessen werden [63]. In einer randomisierten Patientenstudie wurde gezeigt, dass eine allogene Mikrobiom-Transplantation von metabolisch gesunden Probanden bei Typ 2 Diabetikern die metabolische Kontrolle verbesserte und auch der Anteil von Butyrat-bildenden Bakterien anstieg [64]. Das intestinale Mikrobiom wird durch diese Erkenntnisse mittlerweile als metabolisches Organ angesehen, welches viele zentrale Stoffwechselwege im menschlichen Metabolismus beeinflusst. Zudem spielen Wechselwirkungen, zum Beispiel mit dem Gallensäurestoffwechsel, eine wichtige Rolle [65].

Nach bariatrisch-metabolischer Operation konnte beim Menschen sowie im Tiermodell eine nachhaltige Veränderung des intestinalen Mikrobioms festgestellt werden [66]. Ein Review von über 20 tierexperimentellen und klinischen Studien kam zu dem Ergebnis, dass es postoperativ zu einem signifikant erhöhten Vorkommen von Bacteroides, Fusobacteria, Verrucomicrobia und Proteobacteria kommt. Firmicutes, Clostridiales, Clostridiaceae, Blautia und Dorea konnten hingegen postoperativ seltener nachgewiesen werden [67]. Zudem geht man davon aus, dass die Diversität insgesamt zunimmt [66, 67]. Veränderungen des Mikrobioms sind fast ein Jahrzehnt nach OP nachweisbar, und es wird postuliert, dass sie zur Fettreduktion bei den Patienten beitragen [68]. Des Weiteren haben Studien ausgeprägte Veränderungen im Urin bezüglich bakteriologischer Metabolite wie z.B. Phenylacetyl-glycin,

Phenylacetylglutamin, *p*-Cresyl-Sulfat und Trimethylamin-*N*-oxid gezeigt, sodass neben der kompositionellen Veränderung des Mikrobioms auch von einer konsekutiv funktionellen Veränderung des Mikrobioms nach RYGB ausgegangen werden kann [69, 70]. Insbesondere die Hinweise, dass diese Effekte nicht Folge der erreichten Gewichtsabnahme, sondern primär chirurgie- und prozeduren-spezifisch sind, verstärken das wissenschaftliche Interesse [66, 68].

Bei der Untersuchung des intestinalen Mikrobioms ist jedoch stets zu berücksichtigen, dass es schwierig ist, ein solch komplexes System *in vivo* isoliert zu betrachten. Die verschiedenen Abschnitte des Dün- und Dickdarms bieten unterschiedliche Bedingungen und können in klinischen Studien *in vivo* nur unzureichend getrennt voneinander untersucht werden.

1.5 Gallensäuren

Eine wichtige Rolle in Bezug auf die metabolischen Veränderungen nach RYGB wird auch den Gallensäuren zugeschrieben [71, 72]. Das Metabolom stellt hochkomplexe Reaktionsnetzwerke eines Organismus, einer Zelle, eines Organs oder einer biologischen Probe dar. Metabolitspiegel, Enzymaktivitäten sowie die verschiedenen Stoffwechselwege sind Teile des Metaboloms [73].

Klinische und tierexperimentelle Studien beschreiben erhöhte plasmatische Gallensäurekonzentrationen nach bariatrischen Operationen [74-76]. Gallensäuren gehören der Gruppe der Steroide an und Cholesterin dient als Grundsubstanz ihrer Synthese [77, 78]. Sie werden in der Leber synthetisiert und in das Gallengangsystem sezerniert. Diese Gallensäuren werden als primäre Gallensäuren bezeichnet. Zu einer Mahlzeit gelangen sie in das Duodenum. Im Magen-Darm-Trakt werden die Gallensäuren vom intestinalen Mikrobiom dekonjugiert, oxidiert und dehydroxyliert und es entstehen sekundäre und tertiäre Gallensäuren. Enterozyten im distalen Ileum resorbieren dann etwa 95% der Gallensäuren, die über den portalvenösen Kreislauf zur Leber gelangen. Dort absorbieren Hepatozyten mittels aktiver Transporter die Gallensäuren aus dem portalvenösen Blut und sezernieren sie wieder in die Gallenwege. Dieser Zyklus wird als enterohepatischer Kreislauf bezeichnet. Die übrigen 5% Gallensäuren gelangen ins Kolon und werden über den Stuhl ausgeschieden [79, 80].

Gallensäuren erfüllen wichtige Funktionen. Erstens sorgen sie durch Mizellenbildung für die Verdauung bzw. Absorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen. Zweitens werden sie für die Eliminierung von Cholesterin und Bilirubin benötigt. Und drittens verfügen sie über die Bindung an Gallensäurerezeptoren über hormonähnliche Eigenschaften in vielen Organsystemen [81].

Die Entdeckung des ersten Gallensäurerezeptors im Jahre 1999 kann als Beginn einer neuen Ära der Gallensäureforschung bezeichnet werden [82]. Spezifische intrazelluläre nukleare (FXR) und membrangebundene Rezeptoren (TGR5), die in vielen verschiedenen Geweben des Körpers exprimiert werden, können von Gallensäuren aktiviert werden [50, 75]. FXR-abhängig können Gallensäuren ihre eigene Synthese regulieren sowie die Glykogensynthese und -speicherung in der Leber erhöhen, wodurch der Blutzuckerspiegel sinkt [83, 84]. In Fett- und Muskelgewebe sorgt eine TGR5-Aktivierung für einen erhöhten Energieumsatz, in beta-Zellen des Pankreas zu einer vermehrten Insulinsekretion und im Gefäßsystem für eine geringere Inflammation [51, 85, 86]. In einem Review von 2015 werden die durch Gallensäuren beeinflussten Systeme durch das Akronym SLIMMER zusammengefasst: **S**ättigung, **L**ipid und Cholesterinmetabolismus, **I**nkretin- und **G**lukosemetabolismus, **(E**nergie-) **M**etabolismus, **M**ikrobiom (intestinal) und **e**ndoplasmatisches **R**etikulum [87]. Eine verbesserte Insulinsensitivität nach RYGB wurde mit erhöhten Spiegeln sekundärer Gallensäuren, insbesondere Glycodesoxycholsäure in Verbindung gebracht [88]. Es gibt weitere Beweise einer positiven Wirkung von Gallensäuren auf die diabetische Stoffwechsellage, sodass Gallensäuren und ihre (halb-) synthetischen Derivate einen relativ neuen, bisher wenig untersuchten und vielversprechenden Komplex in der Diabetes- und Adipositas therapie darstellen [89, 90].

1.6 Offene Fragen metabolischer Veränderungen nach RYGB

Die Wirkungsweise der bariatrischen Chirurgie und insbesondere die gewichtsverlust-unabhängigen, systemisch-metabolischen Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und Gallensäurestoffwechsels nach RYGB sind nicht ausreichend verstanden. In der klinischen Forschung sind aussagekräftige Studien bezüglich der gewichtsverlustunabhängigen Effekte schwierig zu konzipieren, da die Bildung körperrgewichtsangepasster Kontrollgruppen nur schwer möglich ist. Zudem können für weiterführende Studien einige Kompartimente des menschlichen Körpers (wie z.B.

portalvenöses Blut) nicht oder nur durch erheblichen invasiven Aufwand gewonnen werden. Wäre die Wirkungsweise des RYGB vollständig verstanden, bestünde die Hoffnung, die Therapie der Adipositas und des T2DM mit neuen, effektiven und effizienten Medikamenten, die die positiven Effekte des RYGB nachahmen, revolutionieren zu können [91].

1.7 Wertigkeit und Sinn translationaler, tierexperimenteller Forschung

Die translationale tierexperimentelle Forschung hat bereits viele Erkenntnisse zum Verständnis der Wirkungsweise metabolisch-bariatrischer Operationen beigetragen [92-94]. Es gibt vier wichtige Vorteile der experimentellen Chirurgie im Tiermodell: Erstens können im Tiermodell gewichtsverlust-unabhängige Effekte besser beobachtet und quantifiziert werden, indem eine gewichtsgleiche Kontrollgruppe durch artifizielle Nahrungsrestriktion gebildet wird. Zweitens sind standardisierte Abläufe und Methoden leicht anwendbar, wohingegen bei klinischen Studien von Patientenseite großer Aufwand und Compliance notwendig wäre. Drittens stellt die zu Versuchsende durchgeführte Organentnahme ein Alleinstellungsmerkmal der tierexperimentellen Forschung dar, wodurch die Generierung einer Vielzahl von hochqualitativem Probenmaterial möglich ist. Und viertens können auch invasive Untersuchungsmethoden und Interventionen durchgeführt werden [95, 96].

1.8 Ziele der Arbeit

In einem kontrollierten, tierexperimentellen Versuchssetting sollte das Metabolom nach RYGB qualifiziert und quantifiziert werden. Dazu wurden Faeces und Urin von vier verschiedenen Zeitpunkten analysiert und miteinander verglichen. Außerdem konnten Ergebnisse zur Absorption von Gallensäuren sowie Metaboliten des intestinalen Mikrobioms durch die Untersuchung des portalvenösen Plasmas gesammelt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine Hypothesengenerierung, welche Metabolite in den unterschiedlichen Kompartimenten für den positiven, gewichtsverlustunabhängigen Effekt des RYGB verantwortlich sein könnten.

Dazu wurde ein bereits etabliertes Tiermodell mit adipösen, männlichen Zucker Ratten (fa/fa) verwendet [97]. Neben scheinoperierten adipösen Tieren wurde eine körporgewichtsangepasste Kontrollgruppe gebildet, um gewichtsverlustunabhängige, RYGB-spezifische Effekte auf das Metabolom messen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Sämtliche Tierversuche dieser Studie wurden nach Tierschutzverordnung durchgeführt und von der Regierung von Unterfranken, Bayern, genehmigt (Lizenz 55.2-2531.01-72/12).

2.2 Zucker Ratten (fa/fa) und experimentelles Design

Für die Versuche wurden sechs Wochen alte, männliche 'Zucker Ratten' (nach Lois M. und Theodore F. Zucker) von Charles River (France) verwendet. Der Phänotyp dieses Stammes ist in seiner homozygot-rezessiven Form (fa/fa) durch einen Leptinrezeptordefekt gekennzeichnet. Daher entwickeln die Ratten eine Hyperphagie (gesteigerte Nahrungsaufnahme) und konsekutiv Übergewicht, mit einer Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und einer Störung der Glukosetoleranz (ohne einen progressiven Diabetes mellitus zu entwickeln) [98]. Abbildung 2 zeigt das experimentelle Design, welches alle Tiere durchliefen.

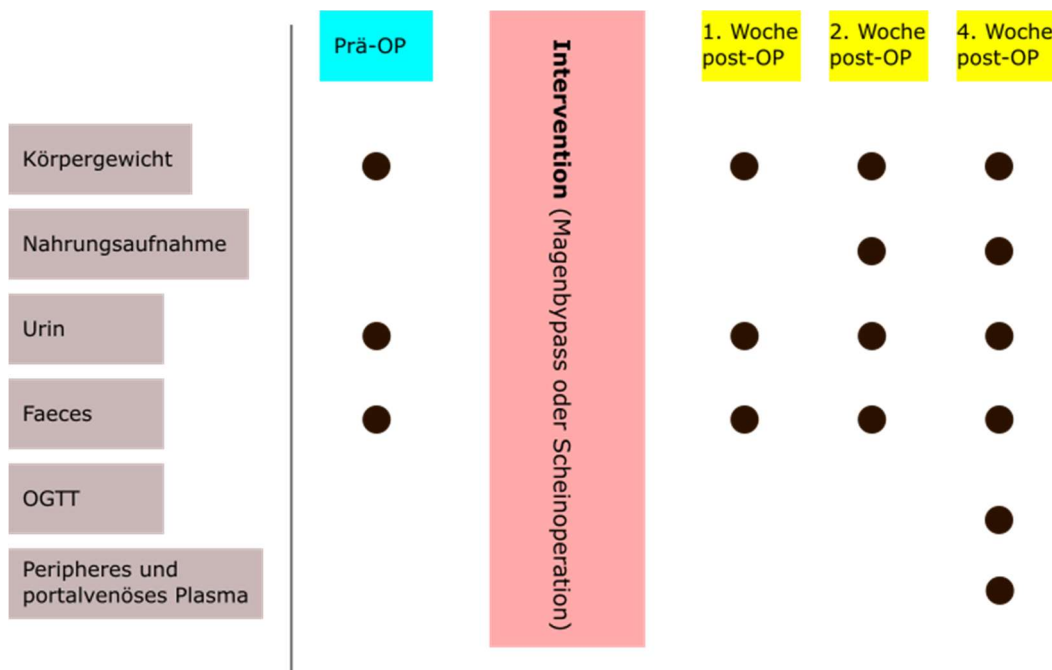


Abbildung 2: Experimentelles Design der Arbeit. Die durchgeführten Messungen bzw. Abnahmen sind jeweils mit einem Punkt markiert.

2.3 Präoperative Phase

Einundzwanzig homozygote Zucker Ratten (fa/fa) wurden in Gruppen gehalten und erhielten für sechs Wochen Purina 5008 (Purina Mills, USA) ad libitum. Drei Tage vor der Operation wurden sie einzeln gesetzt, um fortan die tägliche individuelle Futteraufnahme zu messen.

Die Tierhaltung befand sich im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM), Würzburg. Über die gesamte Dauer des Versuches waren die Tiere in einem ausschließlich für Ratten genutzten, klimatisierten Raum (22 °C) untergebracht, in dem ein 12h-Hell/Dunkel- Rhythmus eingestellt war.

2.4 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden nach Gewicht randomisiert und insgesamt drei Gruppen zugeordnet (Tab. 3). Die Versuchsgruppen bestanden aus elf Magen-Bypass-Tieren (RYGB Gruppe), fünf schein-operierten, adipösen Tieren (Sham ad libitum Gruppe) und fünf schein-operierten Tieren, deren Körpergewicht an das Gewicht der RYGB Tiere durch Futter-Restriktion angepasst wurde (Sham body-weight-matched = Sham-BWM Gruppe). Die ersten beiden Gruppen hatten jederzeit freien Zugang zum Haltungsfutter, falls nicht anders angegeben (Ad libitum Fütterung).

Tabelle 3: Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Anzahl	Abkürzung	Operation	Fütterung
1. Magen-Bypass	n=11	RYGB	RYGB	Ad libitum
2. Schein-operiert, adipös	n=5	Sham ad libitum	Schein OP	Ad libitum
3. Schein-operiert, körperlengewichtsangepasst	n=5	Sham-BWM	Schein OP	Restriktion

2.5 Perioperative Behandlung

Die Ratten wurden sechs Stunden vor den Operationen nüchtern gesetzt. Um das präoperative Fressen von Streu oder Zellstoff zu verhindern und für eine bessere Operabilität zu sorgen, wurden sie während der Nüchternheit auf Gittern gehalten. Die chirurgische Anästhesie wurde mit einem Isofluran/O²-Gemisch induziert und aufrechterhalten. Zur Überprüfung der Narkose wurde mit einer chirurgischen Pinzette ein Schmerzreiz zwischen den Zehen gesetzt und anschließend für eine zusätzliche perioperative Analgesie und Entzündungshemmung das nicht-steroidale Antiphlogistikum Carprofen subcutan gespritzt (5 mg/kg Körpergewicht). Auf eine perioperative Antibiotikaphylaxe wurde verzichtet, da diese eine aussagekräftige Untersuchung und Interpretation des intestinalen Mikrobioms im weiteren Versuchsablauf erschwert hätte. Die Operationen wurden mit sterilen Kautelen in mikrochirurgischer Technik durchgeführt. Um ein intraoperatives Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden die Tiere auf einer Heizplatte operiert.

2.6 Operationen:

2.6.1 Roux-en-Y Magenbypass (RYGB)

Als operativer Zugangsweg zum Abdomen wurde eine Medianlaparatomie durchgeführt. Anschließend wurde das Jejunum 15 cm aboral des Treitz'schen Bandes zwischen zwei Ligaturen durchtrennt. Der bilio-pankreatische Schenkel wurde durch den oralen Anteil gebildet, der alimentäre Schenkel durch den aboralen Anteil. Beide blinden Enden wurden mit Einzelknopfnähten versorgt. Es folgte die Darstellung des ileocoecalen Übergangs und eine etwa 7 mm lange Seit-zu-Seit Jejunum-Jejunostomie zwischen der bilio-pankreatischen und der alimentären Schlinge 25 cm oral der Ileocoecalclappe. Nun wurde der gastro-ösophageale Übergang dargestellt und der Ösophagus mobilisiert. Die linken Magengefäße und Vagusfasern wurden vorsichtig mobilisiert und abgeschoben, um intraoperative Blutungen zu vermeiden und die postoperative Blutversorgung des Magens sicherzustellen. Der Magen wurde ca. 3 mm unterhalb des gastro-ösophagealen Übergangs abgesetzt und so ein kleiner Pouch gebildet, anschließend wurde der Restmagen mit Einzelknopfnähten verschlossen. Magenpouch und aborales Jejunum wurden End-zu-Seit anastomosiert. Die Bauchwand wurde mit einer fortlaufenden Naht (Prolene 4-0) verschlossen; zur Hautnaht wurde Prolene 5-0 verwendet. Abbildung 1b) (s. Kapitel 1.3) zeigt eine schematische Darstellung der postoperativen Anatomie nach einem Magenbypass.

2.6.2 Operationen: Scheinoperation

Das Abdomen wurde eröffnet und der gastro-ösophageale Übergang sowie der komplette Dünndarm mobilisiert. Dann erfolgte jeweils eine kleine Inzision in den Magen sowie in das Jejunum, anschließend wurde beides wieder verschlossen. Vor der Rekonstruktion der Bauchwand äquivalent zur RYGB Operation wurde eine Wartezeit eingelegt, um die gleichen OP-Zeiten wie bei der RYGB-OP zu erhalten.

2.7 Postoperative Versorgung

Nach der Operation wurden die Tiere dreimal am Tag kontrolliert und erhielten routinemäßig morgens und abends 2-3 ml 0,9 %-iges NaCl sowie Caprofen (2,5 mg/kg Körpergewicht) subkutan. Die RYGB Gruppe wurde vier Tage lang auf Gittern gehalten, um ein Fressen der Einstreu oder von Zellstoff zu verhindern. Der Kostaufbau begann mit Schmelzflocken und ab dem 4. postoperativen Tag hatten RYGB und Sham ad libitum Gruppe wieder freien Zugang zum Haltungsfutter. Die Nahrungsaufnahme sowie das Gewicht jedes Tieres wurden täglich dokumentiert (Kern PCB 6000-0 Tischwaage). Um eine möglichst physiologische Ernährung der Sham-BWM Tiere zu gewährleisten, erhielten diese Tiere ein Drittel der täglichen Nahrung morgens und zwei Drittel abends.

2.8 Stoffwechselkäfige

Für die standardisierte Asservierung von Urin und Faeces wurden Stoffwechselkäfige (Techniplast, 3701M081, s. Abb. 3) verwendet. Dazu wurden die Tiere für 12 Stunden (19-07 Uhr) einzeln gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Boden bestand aus einem Gitter und einer Kunststoffkonstruktion, sodass Stuhl und Urin in zwei getrennten Röhrchen gesammelt wurden.



Abbildung 3: Stoffwechselkäfig zur Asservierung von Faeces und Urin.

Die Probengewinnung erfolgte präoperativ (Baseline) sowie 1, 2 und 4 Wochen postoperativ. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.9 Kalorimetrie

Zur Durchführung einer Bombenkalorimetrie wurden von jedem Tier 24h-Stuhlproben gesammelt und zunächst bei -80°C aufbewahrt. Die Proben wurden getrocknet, homogenisiert und gewogen. Anschließend wurde eine abgewogene Menge der Probe in das Kalorimeter (Gallenkamp Ballistic bomb calorimeter) gegeben und die Wärmeentwicklung mit einem Galvanometer (Cam METRIC LTD. Euro galvanometer) gemessen. Es erfolgte eine Doppelbestimmung mit Bildung des Mittelwertes und anschließender Berechnung des Energiegehalts.

2.10 Orale Glukosetoleranztest (oGTT) und ELISAs

Von einer oralen Gavage der Tiere wurde aufgrund der erhöhten Aspirationsgefahr wegen des reduzierten Magenvolumens, des damit für die Ratten verbundenen Stresses sowie des Verletzungsrisikos der oberen Anastomose abgesehen, sodass zur Durchführung des oralen Glukosetoleranztests die Ratten trainiert wurden, eine 25%-ige Glukoselösung (10 ml/kg Körpergewicht) zu trinken. Acht Stunden vor dem OGTT wurden die Tiere nüchtern gesetzt und erhielten zu Beginn in ihrer aktiven Nachtphase 10 ml/kg Körpergewicht der Glukoselösung. Dann erfolgte die Blutzuckermessung (Bayer Contour XT) sowie die Entnahme von 100 µl Blut aus der Schwanzvene jeweils zu den Zeitpunkten t=0 min, t=15 min, t=30 min, t=60 min und t=120 min. Die mit EDTA und einem Dipeptidyl-Peptidase-4 Inhibitor präparierten Mikroreaktionsgefäße wurden dann 10 Minuten bei 8000/min zentrifugiert, um das Plasma zu isolieren. Das Plasma wurde auf Trockeneis gestellt und danach bei -80°C aufbewahrt. Es folgte die Insulinmessung per ELISA (Ultrasensitive Rat Insulin ELISA, Firma Mercodia AB, Schweden 10-1251-10) gemäß dem Protokoll des Herstellers.

2.11 Euthanasie und Probenasservierung

Die Euthanasie fand vier Wochen nach der jeweiligen Operation zu Beginn der Dunkelphase statt. Die Tiere fasteten vier Stunden und erhielten danach eine definierte Nahrungsmenge von 3 g. 15 Minuten später erhielten sie Butorphanol (2 mg/kg KG) als Schmerzmedikation. Weitere 30 Minuten später wurden die Ratten mittels Isofluran in die terminale Anästhesie versetzt. Es erfolgte eine mediane Laparotomie und die Präparation der Pfortader und Vena cava inferior. Die Pfortader wurde dann mit einem 24 G Venenkatheter punktiert, sodass etwa 2 ml portalvenöses Blut gewonnen werden konnte. Dann erfolgte die systemische Blutentnahme aus der Vena cava inferior mit anschließender Exsanguination mit bis zu 10 ml und danach der Herzschnitt. Die Blutproben wurden 10 Minuten bei 8000 Umdrehungen zentrifugiert, bevor das Plasma in Mikroreaktionsgefäße pipettiert und auf Trockeneis gelegt wurde. Die weitere Lagerung des Plasmas erfolgte bei -80°C.

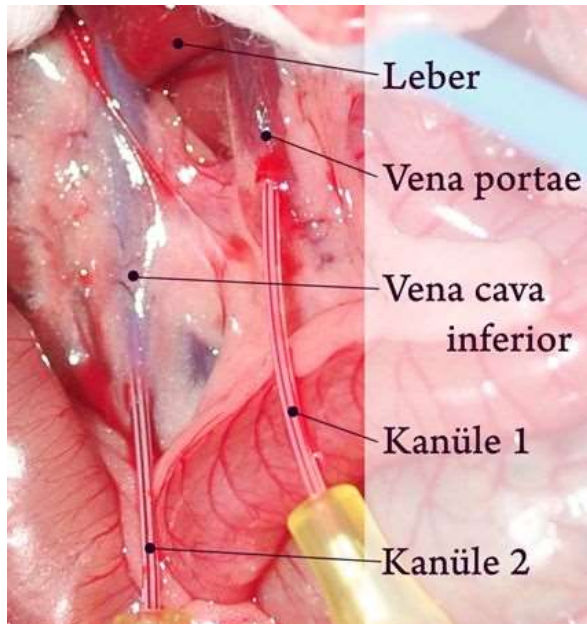


Abbildung 4 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. L. Rotzinger): Situs während der terminalen Anästhesie mit Punktion der V. cava inferior und V. portae

2.12 Metabolic profiling durch Kernspinresonanzspektroskopie von Urin, Faeces, systemischem sowie portalvenösem Plasma

Zur metabolischen Charakterisierung der entnommenen Biofluide (Urin, Faeces und Plasma (systemisch und portalvenös) wurden die Gewebe wie folgt prozessiert und analysiert. Von den zu unterschiedlichen Messzeitpunkten (Präoperativ, 1., 2., und 4. Woche postoperativ) gewonnenen fäkalen Proben wurden 250 mg abgemessen, homogenisiert und mit 500 μL Flüssigkeitschromatographie-Wasser in 1,5 ml Röhrchen gemischt. Anschließend wurden die Proben für 3 x 10 Minuten bei 25°C im Ultraschallbad behandelt und nach jedem Zyklus mit dem Vortex gemischt. Dann folgte das Zentrifugieren mit 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C, anschließend das Sammeln des Überstands für die folgende Kernspinresonanz (NMR) Analyse. Insgesamt wurden 400 μL fäkales Probenmaterial in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen gegeben und mit 250 μL 0,2 M Natrium Phosphat Puffer (100% D_2O , 0.01% 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d4-säure-Natriumsalz (TSP)) vermischt; anschließend wurden 3 mM Natriumazid (NaN_3) als bakteriostatisches Reagenz (pH 7.4) hinzugefügt. Die Proben wurden dann mit dem

Vortex gemischt und mit 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. 600 µL des Überstands wurde in ein NMR Röhrchen pipettiert.

Unter Verwendung eines 600 MHz Spektrometers (Bruker Avance III, Bruker Biospin, Germany) wurden ¹H NMR Spektren von allen fäkalen Proben generiert. Ein 1-dimensional (1-D) NMR Puls [recycle delay (RD)-90°-t₁-90°-t_m-90°-acquire free induction decay (FID)] wurde bei 300 K für das Akquirieren der Spektren angelegt. Insgesamt wurden 128 Scans auf 64.000 Datenpunkten mit einer spektralen Breite von 20 ppm generiert.

Die Urinproben wurden zur Analyse wie folgt prozessiert: Zu 400 µL Urin wurden 250 µL 0,2 M Natrium Phosphat Puffer (100% D₂O, 0.01% TSP) und 3 mM Natriumazid (NaN₃) hinzugegeben und mit Hilfe des Vortex gemischt. Die Zentrifugierung erfolgte mit 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C. 600 µL des Überstands wurden in ein NMR Röhrchen pipettiert.

Von allen Urinproben wurden mittels eines 600 MHz Spektrometers (Bruker Avance III, Bruker Biospin, Germany) ¹H NMR Spektren generiert. Ein 1-dimensional (1-D) NMR Puls [recycle delay (RD)-90°-t₁-90°-t_m-90°-acquire free induction decay (FID)] wurde bei 300 K für das Akquirieren der Urinspektren angelegt. Insgesamt wurden 128 Scans auf 64.000 Datenpunkten mit einer spektralen Breite von 20 ppm generiert.

Die gewonnenen Plasmaproben wurden zunächst mit dem Vortex gemischt. Anschließend wurden 400 µL Plasma mit 250 µL 0,9% NaCl (20% D₂O) versetzt. Das Gemisch wurde mit 16.000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. 600 µL des Überstands wurden in ein NMR Röhrchen pipettiert. Eine Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Pulssequenz [RD-90°-(τ-180°-τ)_n-acquisition] wurde bei 310 K (2τ_n=76.8 ms) angelegt, um die Sichtbarkeit der Signale, welche durch niedrig-molekular-gewichtige Metabolite erzeugt werden, zu verbessern. Insgesamt wurden 32 Scans auf 72.000 Datenpunkten mit einer spektralen Breite von 20 ppm generiert. Tabelle 4 zeigt den kondensierten Workflow zur Methodik der Kernspinresonanzspektroskopie.

Tabelle 4: Workflow der Kernspinresonanzspektroskopie

1. Erfassung der Spektren (Urin, Faeces, syst. und portalven. Plasma; s. Kap. 2.12)
2. Datenreduktion und Vorverarbeitung der Daten (s. Kap. 2.13)
3. Multivariate statistische Analyse (s. Kap.2.13)
4. Durchführung der Hauptkomponentenanalyse (PCA) und Erstellung der O-PLS-DA Plots (s. Kap.2.13)

2.13 Kernspinresonanzspektroskopie: Datenanalyse

Die erhaltenen ^1H NMR Spektren wurden automatisiert mit der TopSpin 3.1 Software analysiert. Dieses Verfahren umfasste eine Synchronisation, eine Basislinienkorrektur sowie das Referenzieren der Spektren. Die so gewonnenen Datensätze wurden in die MATLAB (MathWorks) Software eingelesen und analysiert. Die Wasserspitzen der Spektren des Urins ($\delta^1\text{H}$ 4.72 und 4.90), der Faeces ($\delta^1\text{H}$ 4.50 und 5.10) und des Plasmas ($\delta^1\text{H}$ 4.50 und 5.10) wurden herausgerechnet, um den Effekt der Basislinienverzerrung durch unvollkommene Wassersuppression zu minimieren. Zusätzlich wurden in den Urinspektren die Urea-Signale entfernt (zwischen $\delta^1\text{H}$ 5.45 und 6.15). Da die Plasmaproben in Citratröhrchen gesammelt worden waren, wurde die Citrat Signatur aus den Plasmaspektren herausgerechnet ($\delta^1\text{H}$ 2.48 and 2.70). Ein Beibehalten dieser Spektren hätte die multivariante statistische Analyse negativ beeinflusst. Die resultierenden NMR Spektren wurden in SIMCA 14.0 (Umetrics) importiert, um eine Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis, PCA) mit Einheitenvarianz (UV) durchzuführen. Daran anschließend wurde ein O-PLS-DA (orthogonal signal correction-projection to latent structures-discriminant analysis) in MATLAB (R2014a) auf Basis des im Imperial College London entwickelten Skripts durchgeführt. MATLAB wurde benutzt, um O-PLS-DA Plots mit einer Farbvisualisierung für den Korrelationskoeffizienten (r^2) jeder Variable zu erstellen. Die Farbe Rot indiziert eine hohe Korrelation, Blau indiziert eine niedrige Korrelation der Variablen.

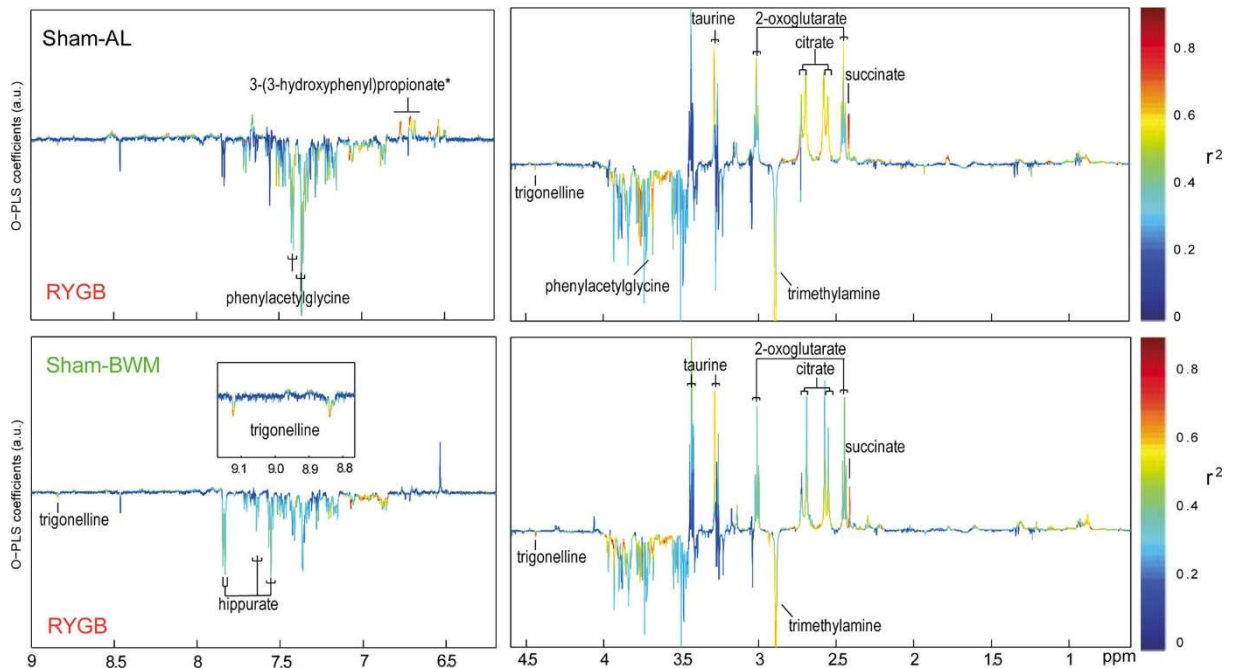


Abbildung 5: Beispielhafter O-PLS-DA Plot. Die Urinspektren von Mäusen (C57BL/6 (H-2b)) wurden paarweise verglichen. In der oberen Zeile RYGB und Sham ad. lib. Gruppe; in der unteren Zeile RYGB und Sham-BWM Gruppe. Nachdruck mit Erlaubnis von Seyfried et al. "Urinary Phenotyping Indicates Weight Loss-Independent Metabolic Effects of Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice"; *Journal of Proteome Research* 2013 [99]. Copyright 2013 American Chemical Society.

Die metabolischen Profile von Urin und Faeces zu sämtlichen Messzeitpunkten (präoperativ, 1., 2. und 4. Woche postoperativ) sowie das Plasma bei Organentnahme (4. Woche postoperativ) wurden mittels O-PLS Regressionsanalyse mit dem Körpergewicht korreliert. Die Validierung von allen O-PLS-DA und O-PLS Modellen wurde erreicht, indem ein 1000-facher Permutationstest verwendet wurde. Um die metabolische Zuordnung zu erleichtern, wurden J-aufgelöste Spektroskopie (JRES) sowie interne und öffentliche Datensets verwendet [100]. Die weitere Spezifizierung der Metabolite wurde durch die Verwendung von STOCSY (statistical total correction spectroscopy) in 1-D Spektren erreicht [101].

2.14 Ultra-Performance Flüssigchromatographie (UPLC) Tandem

Massenspektrometrie zur Gallensäuremessung

Urin- und Plasmaproben wurden bei 4°C aufgetaut und bei 18.000 g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand jeder Probe wurden insgesamt 100 µL in ein Eppendorf

Deepwell Plates 96 pipettiert und mit 300 µL eiskaltem Methanol zur Proteinausfällung versetzt. Alle Platten wurden bei 4°C für 30 Minuten mit Hilfe eines Eppendorf MixMate bei 1400 rpm vermischt und danach für 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend erfolgte für 15 Minuten ein erneutes Zentrifugieren bei 4°C und 4500 U/min. Vom Überstand jeder Probe wurden 200 µL jeweils in Eppendorf Mikroplatten transferiert und bis zur Analyse temperaturstabil verschlossen. Von jeder Urin- und Serumprobe wurden weitere 20 µL Überstand gesammelt, um die Qualitätskontrollen (QK) zu bilden (1420 µL in toto für jeden Probenotyp).

Die Gallensäureanalysen wurden mit einem ACQUITY UPLC (ultraperformance liquid-chromatography, Waters Ltd., Elstree, UK) durchgeführt, welcher an ein Xevo G2-S Q-Tof Massenspektrometer (Waters, Manchester, UK) angeschlossen war. Das Injektionsvolumen aller Proben betrug 10 µL. Um Injektionsfehler zu minimieren wurden drei Waschzyklen mit schwachem (H₂O:2-propanol, 9:1, v:v) und starkem (2-propanol) Lösungsmittel durchgeführt. Eine ACQUITY BEH C8 Column (1.7 µm, 100 mm × 2.1 mm) wurde bei einer Temperatur von 60°C verwendet. Die mobile Phase A bestand aus Acetonitril und Wasser (1:10, v:v) mit 1mM Ammoniumacetat und wurde mit Essigsäure auf einen pH von 4,15 titriert. Die mobile Phase B bestand aus Acetonitril und 2-Propanol (1:1, v:v). Die Flüssigkeitschromatographie wurde nach der von Sarafian et al. publizierten Methodik [102] durchgeführt. Die Massenspektroskopie war mit einer Elektrospray-Ionisierungs-Quelle ausgerüstet und verwendete den negativen Ionenmodus (ESI-). Massenspektrometrie Parameter wurden wie folgt festgelegt: Die Kapillarspannung betrug 1,5 kV, Kegelspannung 60 V, Quelltemperatur 150 °C, Desolvatisierungstemperatur 600°C, Desolvatisierungsgasfluss 1000 L/h und Kegelflußrate 150 l/h. Vor Analyse der Proben wurden 7x Lösungsmittelstandards und 10x Qualitätskontrollen (QK) injiziert. Die Messung einer QK wurde alle elf Proben wiederholt. Dreizehn standardisierte Gallensäuregemische wurden zur Identifikation der Gallensäuren verwendet. DDA (data dependent acquisition), MSE und DRE (dynamic range enhancement) wurden als massenspektroskopische Methoden an den Qualitätskontrollen zur Gallensäureidentifikation angewandt.

Zur Analyse der Gallensäureprofile wurden die Rohdaten in das NetCDF Format mittels des Databridge built in MassLynx V 4.1 (Waters, Inc) konvertiert und die Daten mittels

XCMS in die Software R extrahiert. Die relativen Konzentrationen der identifizierten Gallensäuren wurden durch Anwendung mehrerer Student's t-tests ermittelt.

2.15 16S rRNA genbasierte Sequenzierungsanalyse

Bakteriologische DNA wurde von den Faeces mittels PowerFecal® DNA isolation kit (MOBIO Laboratories, Inc., USA) isoliert. Insgesamt wurden je 250 mg Probenmaterial abgewogen, in ein Bead-Beating-Röhrchen transferiert und 750 µL Beadlösung sowie 60 µL von C1 Lösung mit Natriumdodecylsulfat (SDS) hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 10 min auf 65°C aufgeheizt und anschließend für 2 x 20 Sekunden bei 5500Hz behandelt. Dann wurde es bei 13.000 g für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurden ca. 400 µL Überstand in ein steriles Röhrchen transferiert. Die DNA-Sequenzierung wurde durch das Research and Testing Laboratory (Austin, Texas, USA) mit Hilfe von Illumina MiSeq durchgeführt. Um die Diversität und Struktur der Bakterienkolonien zu bestimmen, wurde das Protokoll von Caporaso et. al. verwendet [103]. Die PCR Amplifizierung für die V4 Region der 16s rRNA wurde mit den Primern 515F (5-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') und 806R (5-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') durchgeführt. Die PCR Produkte wurden mittels Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) quantifiziert und danach gemischt. Um Fehler zu minimieren, wurden zusätzlich 20 unabhängige PCR Fragmente verwendet. Die Sequenzierung wurde auf einer Illumina MiSeq Plattform durchgeführt. Die 16S rRNA Gensequenzen wurden mittels bioinformatischer Software analysiert (Mothur und MiSeq SOP Pipeline).

Mit Hilfe der Software R und des analytischen Erweiterungstools „vegan“ wurden die Daten ausgewertet, indem eine nichtmetrische multidimensionale Skalierung sowie eine multivariate Analyse verwendet wurden. Weitere Daten wurden mittels STAMP (STatistical Analysis of Metagenomic Profiles) analysiert [104].

2.16 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden, falls nicht anders erwähnt, SPSS 17.0 sowie GraphPad PRISM Version 7 ® verwendet. Mittels Kolmogorov-Smirnov Normalitätstest wurde die Normalität der Variablen überprüft. Kontinuierliche Variablen mit Normalverteilung sind beschrieben als Mittelwert ± Standardfehler vom Mittelwert (SEM) und kontinuierliche Variablen ohne Normalverteilung als Median mit Interquartilsabstand (IQR). Aufgrund der clusterartigen Daten wurden die Gewichtsverläufe der Gruppen

mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichungen (generalized estimating equations, GEE) analysiert. Statistische Unterschiede des Gewichts, der Nahrungsaufnahme, des Energiegehalts der Faeces sowie der Glukose und Insulin Konzentrationen zwischen den einzelnen Gruppen wurden durch eine two-way analysis of variance (two-way ANOVA) mit anschließendem Tukey-Test festgestellt. Die Area under the curve (AUC) von Glukose und Insulin wurde mittels der Trapezoidalmethode berechnet, gefolgt von einem Kruskal-Wallis Test sowie einem Dunn's Test zum Vergleich der Gruppen. Das statische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht

Postoperativ nahmen die Tiere aller Gruppen zunächst an Körpergewicht ab. Die Sham ad libitum Tiere nahmen ab Tag 2 wieder kontinuierlich an Gewicht zu, während die RYGB Tiere an Tag 6 ihr Minimalgewicht erreichten (403,8 g). Fortan lag die RYGB Gruppe stetig unter ihrem Ausgangsgewicht und erreichten ab Tag 16 ein Plateau von ca. 430 g. Die Sham-BWM Gruppe erreichte ihr Minimalgewicht an Tag 7 (403,6 g). Das Plateau von ca. 430 g wurde in der Sham-BWM Gruppe an Tag 18 erreicht. Zu diesem Zeitpunkt war das durchschnittliche Gewicht der Sham ad libitum Gruppe bereits auf 525 g angestiegen.

Der Gewichtsunterschied der RYGB Gruppe und der Sham-BWM Gruppe im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe war bereits ab Tag 6 signifikant. Bezüglich der Gewichtsentwicklung gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der RYGB und Sham-BWM Gruppe. Der Gewichtsverlauf der einzelnen Gruppen wird in Abbildung 6 dargestellt.

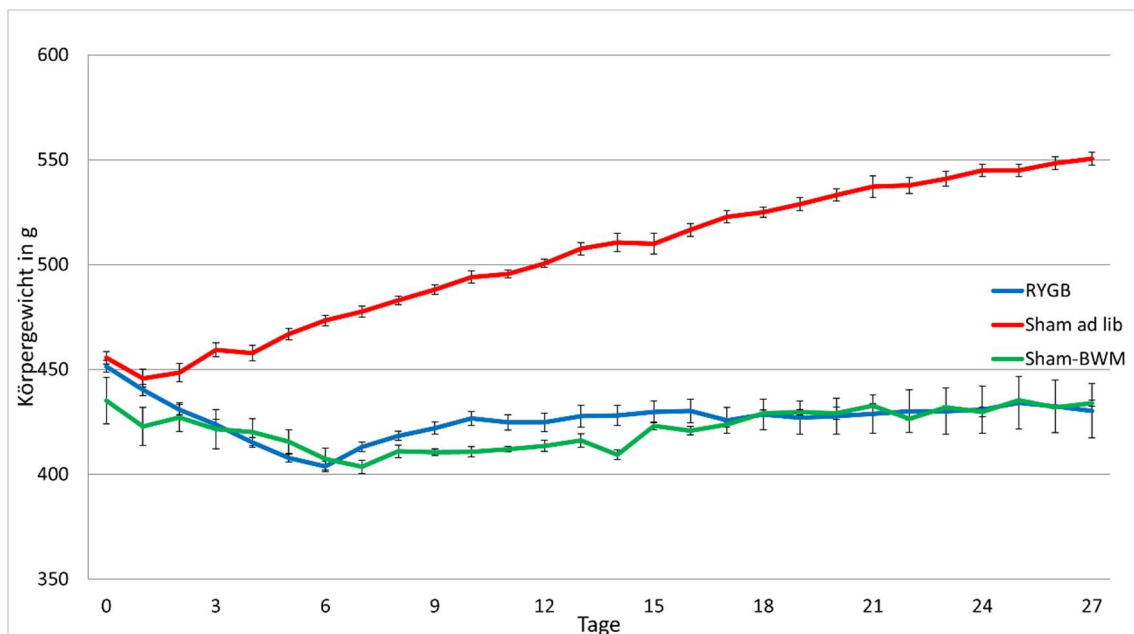


Abbildung 6: Durchschnittliches Körpergewicht der Gruppen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).

3.2 Nahrungsaufnahme

Die minimale durchschnittliche Nahrungsaufnahme der Sham ad libitum Gruppe betrug 28,9 g an Tag 9. Die maximale Nahrungsaufnahme der Sham ad libitum Gruppe bestand an Tag 24 (36,2 g). Die RYGB Gruppe aß täglich durchschnittlich 21,0 g (Tag 8-26) Futter mit einem Minimum an Tag 8 (17,3 g). Die Sham-BWM Gruppe hatte durchschnittlich eine Nahrungsaufnahme von 19,6 g (Tag 8-26).

Statistisch ergab sich eine signifikant höhere tägliche Nahrungsaufnahme der Sham ad libitum Gruppe im Vergleich zur RYGB Gruppe sowie Sham-BWM Gruppe. Die Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und der Sham-BWM Gruppe erreichten keine Signifikanz. Abbildung 7 zeigt die durchschnittliche tägliche Nahrungsaufnahme der einzelnen Gruppen.

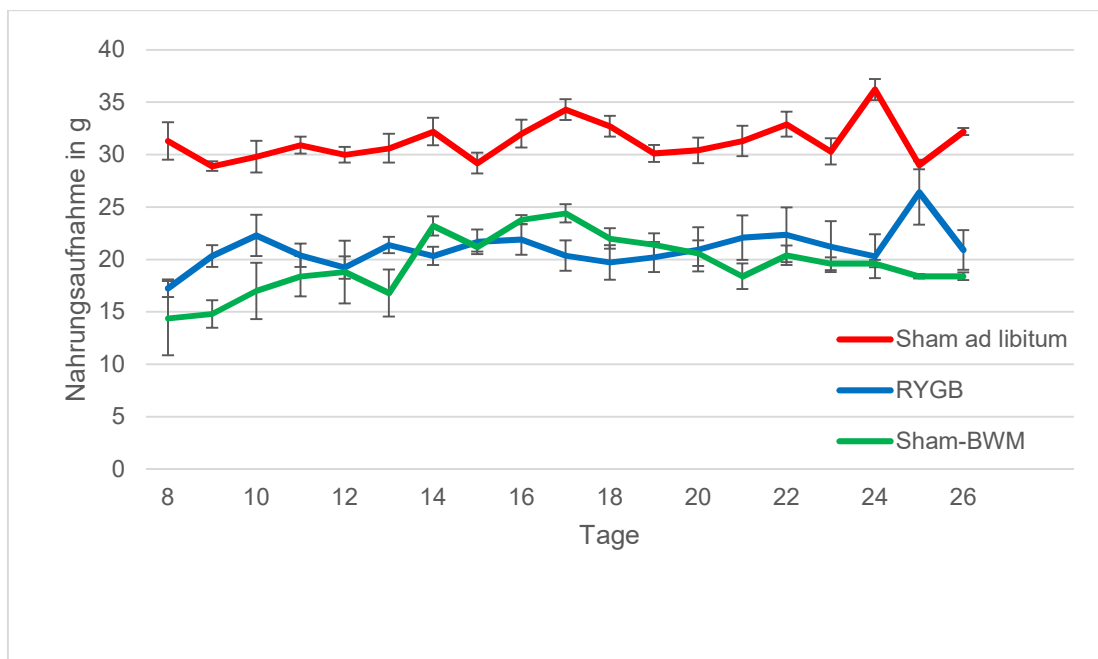


Abbildung 7: Durchschnittliche Nahrungsaufnahme der Gruppen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).

3.3 Energiegehalt der Faeces (Kalorimetrie)

Der Energiegehalt der Faeces wurde mit Hilfe der Bombenkalorimetrie bestimmt. In der RYGB Gruppe ergab sich ein Energiegehalt von 4,26 kcal/g, in der Sham ad libitum Gruppe von 4,34 kcal/g und in der Sham BWM Gruppe von 4,15 kcal/g (Abb. 8). Zwischen den drei verschiedenen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p=0,16$).

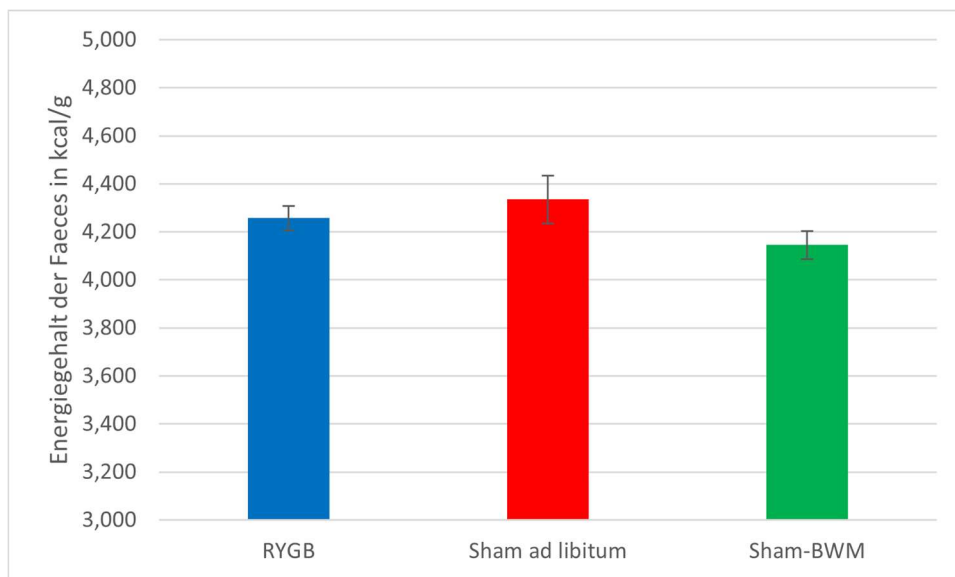


Abbildung 8: Energiegehalt der Faeces. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).

3.4 Orale Glukosetoleranztest (Glukose, Insulin)

Die RYGB Gruppe zeigte im Vergleich zu beiden Sham Gruppen bei dem oralen Glukosetoleranztest (oGTT) 60 min nach der Glukosegabe signifikant niedrigere venöse Plasmaglukosekonzentrationen. Die Sham-BWM Gruppe wiederum hatte einen signifikant niedrigeren Glukosewert bei t=60 min im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe (Abb. 9).

Der Verlauf der Glukosekurve der RYGB Gruppe war charakterisiert durch einen schnellen Anstieg auf einen Gipfel bei t=15 min und anschließendem, starken Abfall des Wertes bis zu t=60 min. Beide Sham Gruppen zeigten einen plateauartigen Verlauf der Kurve von t=15 - t=60 min mit einem Abfall zu t=120 min (Abb. 9).

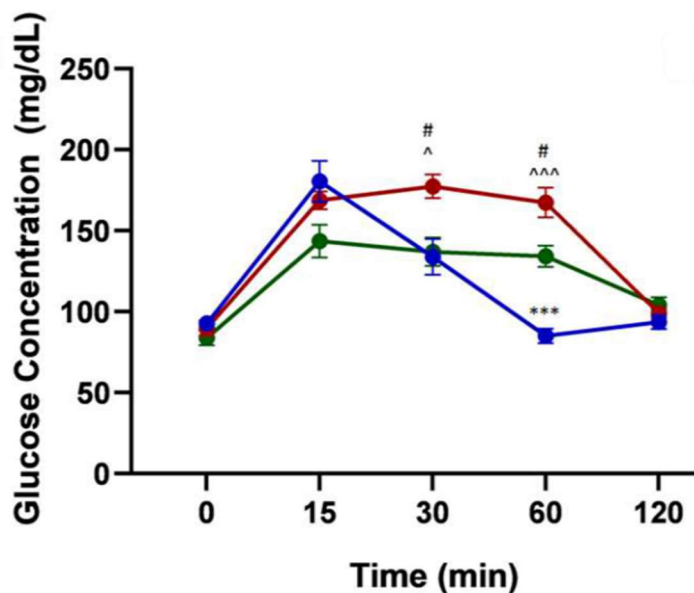


Abbildung 9: Glukosekonzentrationen während des oGTT. RYGB (blau), Sham ad lib. (rot) und Sham-BWM (grün) Gruppen werden unterschieden. * zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham-BWM (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$). ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^[^] $p < .001$). # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM und Sham (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Die Glukosekontrolle während des gesamten oGTTs, repräsentiert durch die Area under the curve (AUC) der Glukosekonzentration, war in der RYGB Gruppe signifikant besser als in der Sham ad libitum Gruppe (Abb. 10). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der RYGB und der Sham-BWM Gruppe.

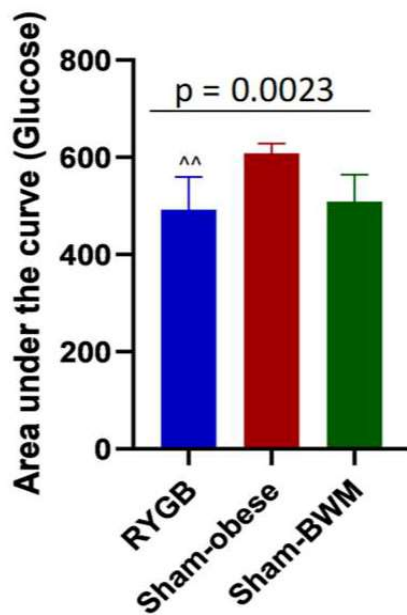


Abbildung 10: Area under the curve (AUC) von Glukose während des oGTT, ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham ad lib. (rot) (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^^ $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Bezüglich der Insulinwerte während des oGTTs zeigte die Sham ad libitum Gruppe einen mehr als doppelt so hohen Insulin Wert bei t=0 min als die Sham-BWM Gruppe. Die RYGB Gruppe hatte einen fast so hohen Insulin Wert bei t=0 min wie die Sham ad libitum Gruppe (Abb. 11).

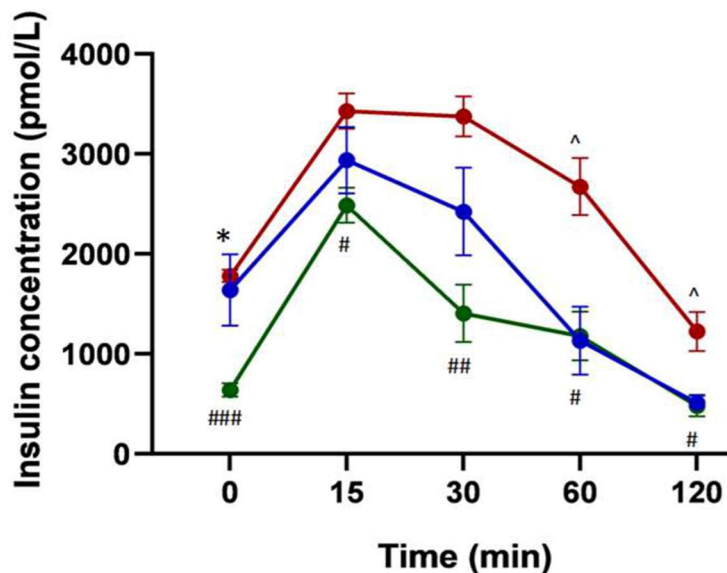


Abbildung 11: Insulinkonzentrationen während des oGTTs. RYGB (blau), Sham ad lib. (rot) und Sham-BWM (grün) Gruppen werden unterschieden. * zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham-BWM (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$). ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham ad lib. (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^ $p < .001$). # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM und Sham ad lib. (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Die Sham ad libitum Tiere hatten, passend zu ihrem Phänotyp mit einer Insulinresistenz, die höchste Insulinausschüttung während des oGTT (Abb. 12), ohne dabei bei den Glukosespiegeln davon zu profitieren (Vergleiche Abb. 9-10).

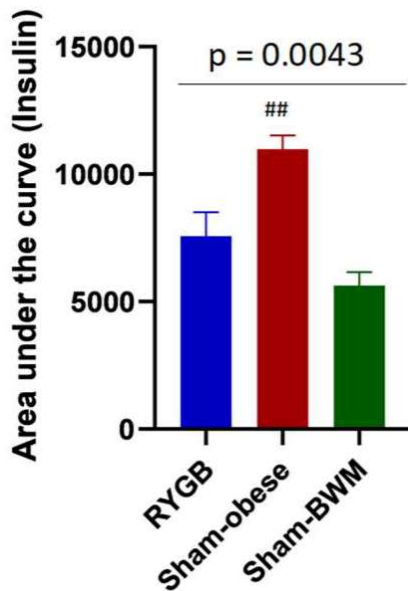


Abbildung 12: AUC von Insulin während des oGTT. # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM (grün) und Sham ad lib. (rot) Gruppe (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

3.5 Globale Metabolite in den Faeces

Mittels ^1H NMR Spektroskopie, wie unter 2.11 & 2.12 beschrieben, wurden die Interventionsgruppen auf Unterschiede der fäkalen Metabolite zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten untersucht. PCA und O-PLS-DA Analysen wurden durchgeführt, um die Gruppen untereinander zu vergleichen. Erstens wurde der Effekt einer kalorischen Restriktion untersucht, indem Sham-BWM und Sham ad libitum miteinander verglichen wurden. Zweitens wurde der metabolische Effekt des RYGB untersucht, indem man die RYGB mit der Sham ad libitum Gruppe verglich. Drittens wurde der gewichtsverlustunabhängige Effekt des RYGB untersucht, indem man die RYGB Gruppe mit der Sham-BWM Gruppe verglich.

Die vier Messzeitpunkte waren wie folgt festgelegt: Präoperativ, 1. postoperative Woche, 2. postoperative Wochen sowie 4. postoperative Woche. Der PCA trajectory Plots (Abb. 13A) zeigt, dass es bei den fäkalen Metaboliten präoperativ keine signifikant messbaren Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Ab der 1. postoperativen Woche zeigte die RYGB Gruppe sowohl in der 1. als auch in der 2. Hauptkomponentengruppe (PC1 und PC2) starke metabolische Veränderungen, wohingegen die Sham ad libitum und Sham-BWM Gruppe vor allem in PC1 Veränderungen zeigten (Abb. 13A). Obwohl die kalorische Restriktion in der Sham-BWM Gruppe zu einem signifikanten Gewichtsverlust führte, fanden sich postoperativ zwischen der Sham-BWM und der Sham ad libitum Gruppe keine signifikanten metabolischen Veränderungen in den Faeces. Allerdings wurden postoperativ signifikante metabolische Veränderungen der RYGB Gruppe sowohl im Vergleich zur Sham-BWM als auch im Vergleich zu der Sham ad libitum Gruppe gemessen. Eine Heatmap visualisiert die spezifischen Veränderungen zwischen den Gruppen (Abb. 13B). Rot markiert eine höhere, blau eine niedrigere Konzentration der jeweiligen Substanz in der RYGB Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen.

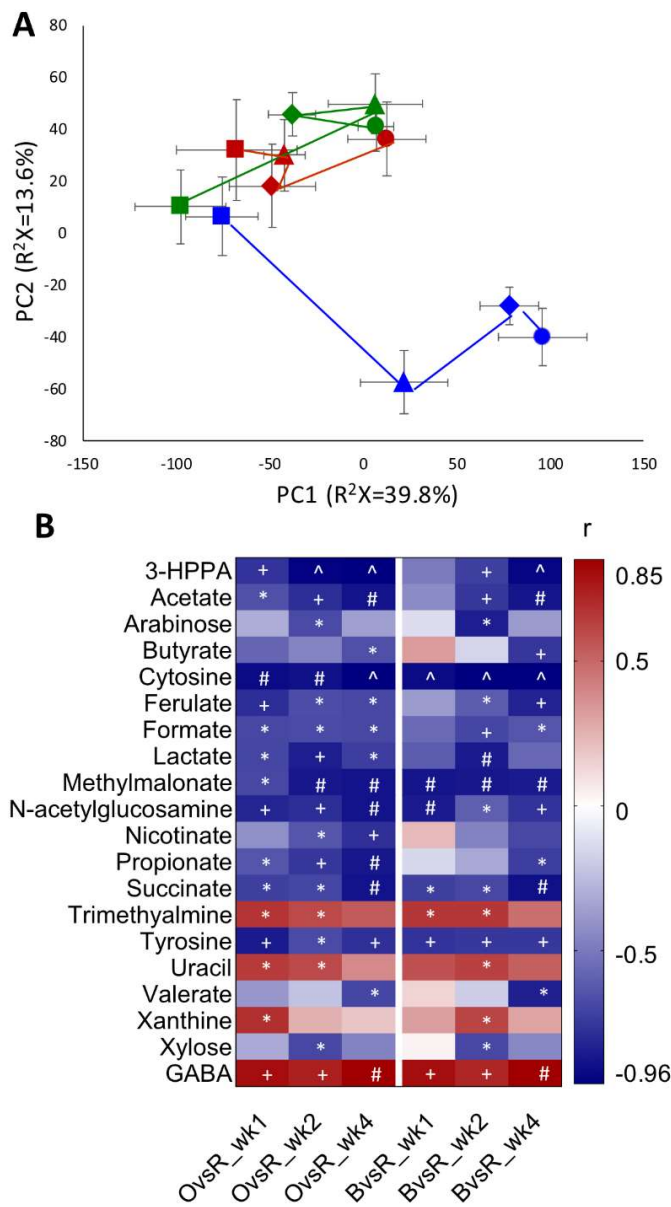


Abbildung 13: PCA trajectory scores Plot von Faeces (A). Es werden RYGB Gruppe (blau), Sham-BWM Gruppe (grün) und Sham ad libitum (rot) Gruppe unterschieden. Die Zeitpunkte werden wie folgt unterschieden: Präoperativ (Viereck), 1. (Dreieck), 2. (Raute) und 4. (Kreis) postoperative Woche. Jeder Punkt zeigt den Durchschnitt der ersten bzw. zweiten Hauptkomponente (PC1 und PC2) an. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Eine Heatmap von veränderten Metaboliten in den Faeces (B) zeigt die Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und der Sham (linke Spalte; OvsR) bzw. Sham-BWM (rechte Spalte; BvsR) Gruppe. Der Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, +, # und ^ stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$ zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, welche durch einen zweiseitigen t-test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Im Ergebnis zeigte die RYGB Gruppe im Vergleich zu beiden Sham Gruppen eine signifikant höhere Konzentration von γ -Aminobuttersäure (GABA) und signifikant niedrigere Konzentrationen von Succinat, *N*-Acetylglucosamin, Cytosin, Methylmalonat und Tyrosin über die gesamten vier postoperativen Wochen hinweg (Abb. 13B). Bei Formiat, Acetat, Propionat, Laktat und 3-Hydroxyphenylpropionat waren zu allen drei postoperativen Messzeitpunkten signifikant niedrigere Spiegel in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe messbar, wohingegen im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe diese Signifikanz nur zu ein oder zwei postoperativen Zeitpunkten erreicht wurde. Der Trimethylaminspiegel war in der RYGB Gruppe in der ersten und zweiten postoperativen Woche höher als in den beiden Sham Gruppen. Hingegen konnten in der RYGB Gruppe bei den kurzkettigen Fettsäuren Valerat und Butyrat zu späteren Zeitpunkten deutlich niedrigere Konzentrationen im Vergleich zu den Sham Gruppen gemessen werden (Abb. 13B). Auffallend war, dass in der 1. postoperativen Woche deutlich weniger Unterschiede zwischen der RYGB und der Sham-BWM Gruppe bestanden als im weiteren Verlauf. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Versuch der RYGB zu gewichtsverlustunabhängigen, globalen metabolischen Veränderungen in den Faeces geführt hat.

3.6 Globale Metabolite im Urin

In der Sham-BWM Gruppe kam es im postoperativen Verlauf (Wochen 1, 2 und 4) zu keiner Veränderung des präoperativen metabolischen Phänotyps. Hingegen zeigten sowohl die RYGB als auch die Sham ad libitum Gruppe signifikante Veränderungen, sodass beide Gruppen ein eigenes charakteristisches Muster im PCA trajectory scores Plot aufwiesen (Abb. 14A). Die Zusammensetzung der Urinmetabolite der RYGB Gruppe war zu jedem postoperativen Messzeitpunkt signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Sham-BWM und Sham ad libitum Gruppe. Zwischenprodukte des Citratzyklus (z.B. Zitrat, 2-Oxoglutarat, Succinat, Fumarat und Malat) waren niedriger in der RYGB Gruppe als in den Sham Gruppen, wohingegen Metabolite wie Indoxylsulfat (IS), 4-Hydroxyphenylacetat, 4-Cresylglucoronid und Phenylacetylglycin (PAG), die mit Hilfe des intestinalen Mikrobioms synthetisiert werden (mikrobiomische Co-Metabolite), erhöht waren (Abb. 14B). Urinkonzentrationen von 2-Oxoisovalerat, einem Abbauprodukt der verzweigt-kettigen Aminosäure (branched chain amino acid, BCAA) Valin waren in der RYGB Gruppe deutlich höher als in den beiden Sham Gruppen. 3-Methyl-2-Oxovalerat, ein Abbauprodukt von Isoleucin war dagegen in der RYGB Gruppe

deutlich verringert im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe. Des Weiteren waren N_{ϵ} -Acetyllysine, N -Acetylalanin und N_{α} -Acetyllysine in der RYGB Gruppe erniedrigt (Abb. 14B). Insgesamt konnte ein gewichtsverlustunabhängiger Effekt des RYGB auch auf die globalen Metabolite im Urin der Zucker Ratten (fa/fa) nachgewiesen werden.

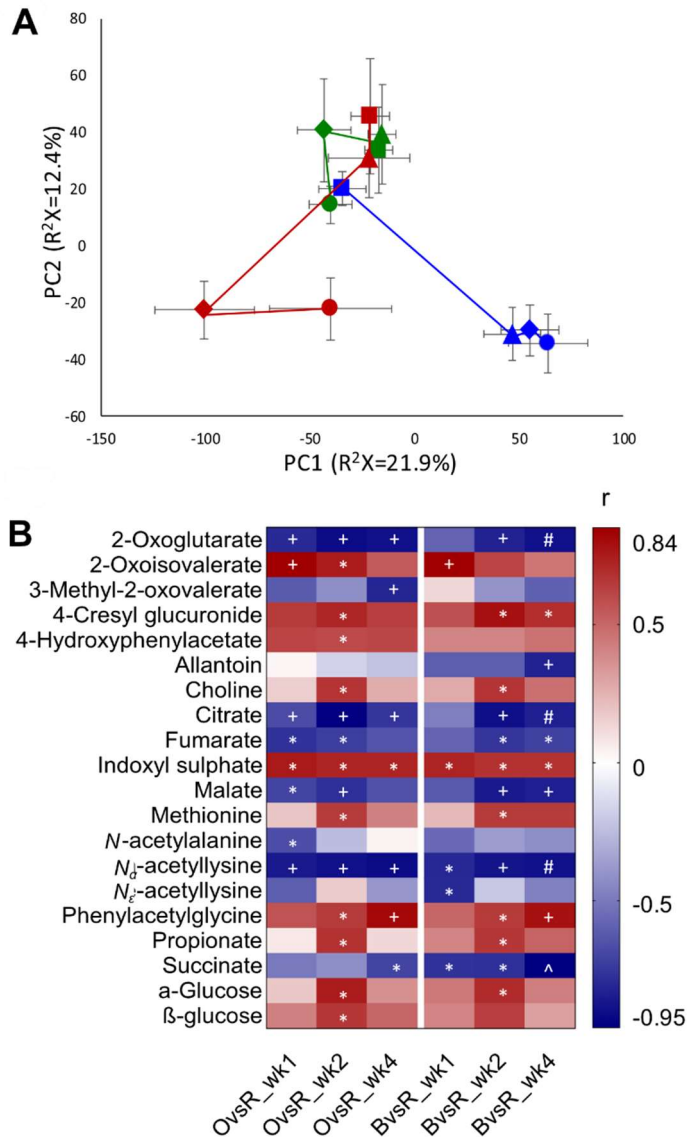


Abbildung 14: PCA trajectory scores Plot von Urin (A). Es werden RYGB Gruppe (blau), Sham-BWM Gruppe (grün) und Sham ad libitum (rot) Gruppe unterschieden. Die Zeitpunkte werden wie folgt unterschieden: Präoperativ (Viereck), 1. (Dreieck), 2. (Raute) und 4. (Kreis) postoperative Woche. Jeder Punkt zeigt den Durchschnitt der ersten bzw. zweiten Hauptkomponente (PC1 und PC2) an. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Eine Heatmap von veränderten Metaboliten im Urin (B) zeigt die Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und der Sham (linke Spalte; OvsR) bzw. Sham-BWM (rechte Spalte; BvsR) Gruppe. Der

Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, +, # und ^ stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$ zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, welche durch einen zweiseitigen t -test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

3.7 Biochemische Plasmazusammensetzung

Portalvenöses vs. systemisches Plasma: Spezifische Muster der jeweiligen Gruppen kann man in den PCA score Plots vom systemischen sowie portalvenösen Blut beobachten (Abb. 15A-C). Hierbei unterschied sich die RYGB Gruppe deutlich von den beiden Sham Gruppen (PC2); wohingegen sich die beiden Sham Gruppen bei PC2 bündelten. Weder in der Sham-BWM noch in der Sham ad libitum Gruppe zeigten sich Unterschiede zwischen der systemischen und portalvenösen Plasmazusammensetzung. Dagegen ergaben sich in der RYGB Gruppe signifikant erhöhte Konzentrationen von N,N,N -Trimethyllysin, Propionat, Format und Succinat im portalvenösen Plasma im Vergleich zum systemischen Plasma (Abb. 15D). Die Acetat Konzentration portalvenös war ebenso leicht erhöht, dies aber ohne statistische Signifikanz nach Benjamini-Hochberg (BH) Korrektur ($p=0,06$) zu erreichen.

RYGB Gruppe vs. Sham Gruppen: Beim Vergleich der Sham Gruppen zeigten sich weder im portalvenösen noch im systemischen Plasma signifikant messbare Unterschiede. Im Gegensatz hierzu ergab der Vergleich zwischen RYGB Gruppe und den zwei Sham Gruppen signifikante Unterschiede. Die RYGB Gruppe wies signifikant niedrigere Level von BCAAs (Leucin, Isoleucin und Valin) und höhere Level von Pyruvat auf (Abb. 15D). Weiterhin waren die portalvenösen Konzentrationen von Cholin, Phenylalanin, Glycerol, Glycerophosphorylcholin und Propionat signifikant niedriger in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe. Die Tyrosinkonzentration im portalvenösen Blut der RYGB Gruppe war ebenso erniedrigt im Vergleich zur Sham Gruppe, aber ohne statistische Signifikanz nach BH-Korrektur ($p=0,06$). Somit zeigten sich auch in der biochemischen Zusammensetzung des portalvenösen und systemischen Blutplasmas gewichtsverlustunabhängige, Bypass-spezifische Effekte.

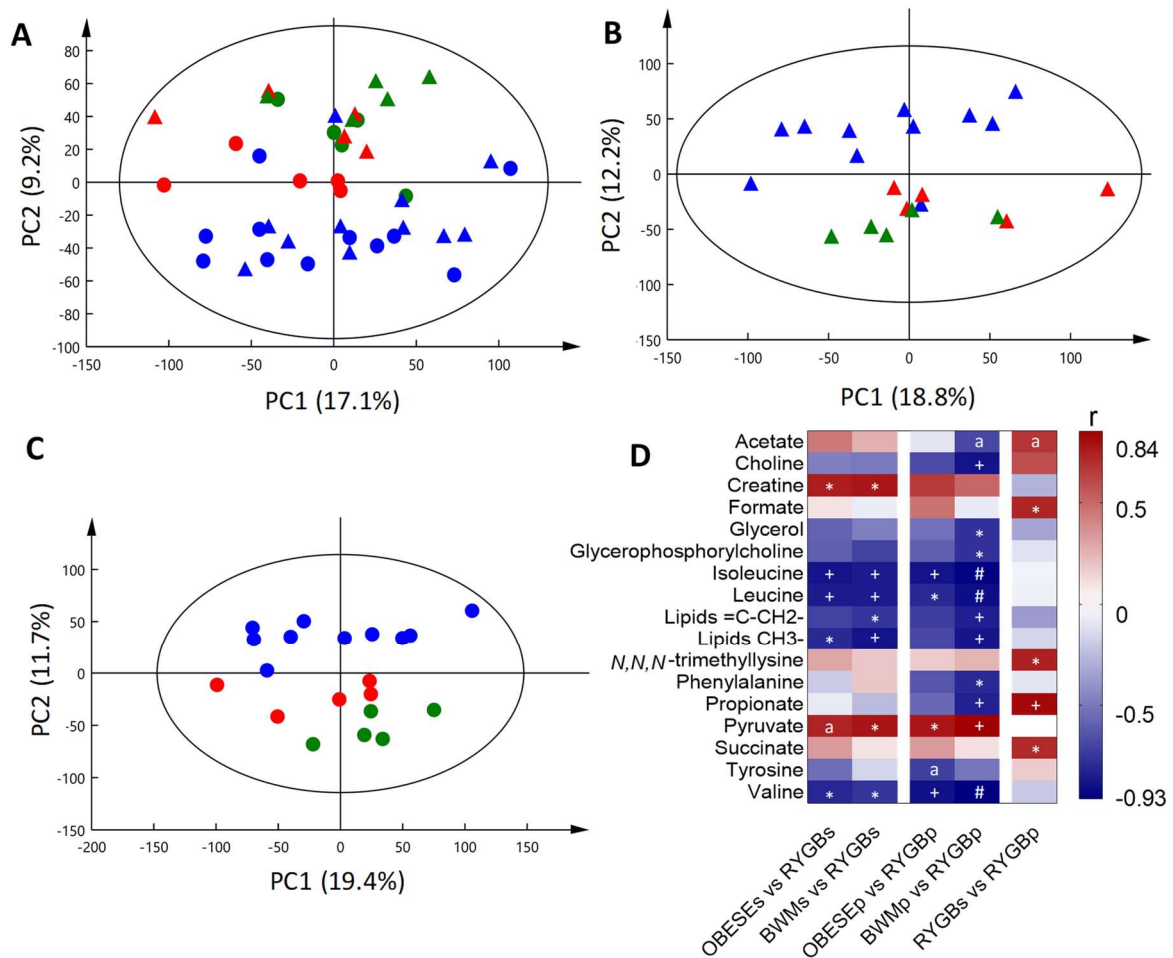


Abbildung 15: A-C zeigen PCA score Plots der ^1H NMR Spektroskopie von systemischem (Kreis) sowie portalvenösem (Dreieck) Blut 4 Wochen nach OP. Es werden RYGB (blau), Sham-BWM (grün) und Sham (rot) Gruppe unterschieden. D zeigt eine Heatmap der veränderten Metabolite systemisch (s) sowie portalvenös (p) in den jeweiligen Vergleichen der Gruppen bzw. in dem Vergleich zwischen portalvenösem und systemischem Blut der RYGB Gruppe. Der Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe bzw. im portalvenösen Blut der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, + und # stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$, welche durch einen zweiseitigen t-test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

3.8 Gallensäuren im Plasma (portalvenös und systemisch) und im Urin

Insgesamt wurden 32 verschiedene Gallensäuren mit Hilfe der UPLC-Massenspektroskopie identifiziert.

RYGB Gruppe vs. Sham Gruppen: Bei den RYGB Tieren waren die plasmatischen Gallensäurekonzentrationen insgesamt niedriger als in den beiden Sham Gruppen. Die RYGB Gruppe zeigte niedrigere Konzentrationen von primären (z.B. Cholsäure, Chenodeoxycholsäure und α -Muricholsäure) und sekundären Gallensäuren (z.B. Hyodeoxycholsäure und 3α -Hydroxy-7 Ketolithocholsäure) im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe im portalvenösen Plasma (Abb. 16). Taurohyodeoxycholsäure und Taurochenodeoxycholsäure waren bei der RYGB Gruppe im portalvenösen Plasma niedriger als in der Sham-BWM Gruppe (Abb. 16).

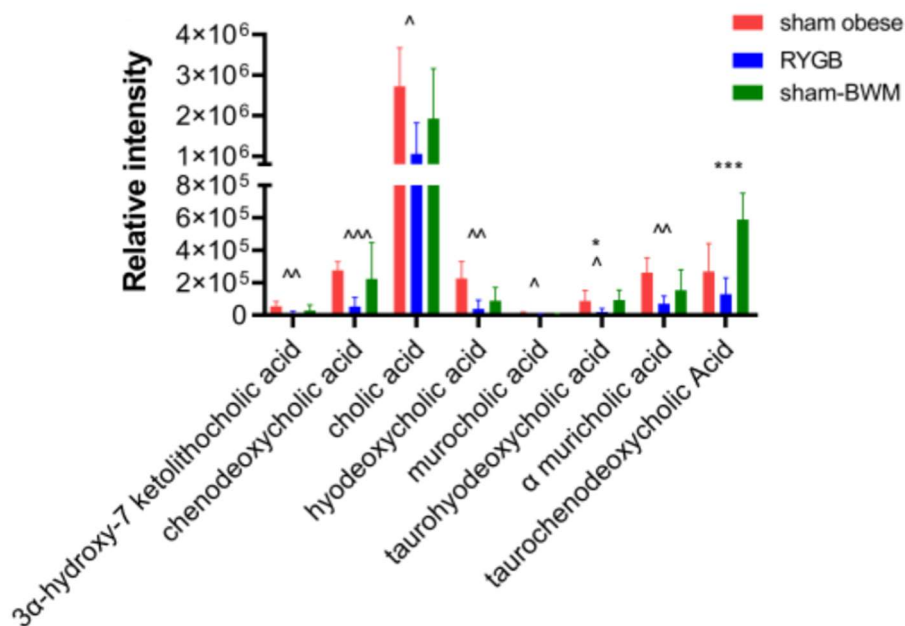


Abbildung 16: Signifikante Unterschiede der Gallensäuren in portalvenösem Blut zwischen den einzelnen Gruppen (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t-test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Durch * wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham-BWM Gruppe angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$); durch ^ wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham Gruppe angezeigt (^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,001$; ^^[^] $p < 0,0001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Im systemischen Plasma unterschieden sich die RYGB Gruppe und Sham ad libitum Gruppe in nur vier Gallensäuren. Die Taurin-konjugierten Gallensäuren Taurochenodeoxycholsäure und Taurohyodeoxycholsäure sowie Chenodesoxycholsäure und Hyodeoxycholsäure waren in der RYGB Gruppe jeweils weniger nachweisbar (Abb. 17). Ähnliche Trends zeigten sich im Vergleich der RYGB Gruppe mit der Sham-BWM Gruppe, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

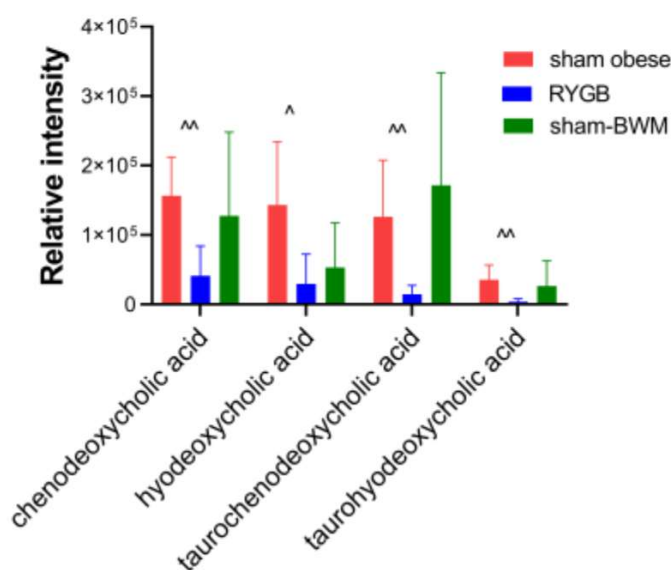


Abbildung 17: Signifikante Unterschiede der Gallensäuren in systemischem Blut zwischen den einzelnen Gruppen (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t-test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Durch * wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham-BWM Gruppe angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$); durch ^ wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham Gruppe angezeigt (^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,001$; ^^[^] $p < 0,0001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Bei der Untersuchung von Gallensäuren im Urin fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und den beiden Sham Gruppen.

Portalvenöses vs. systemisches Plasma: Im portalvenösen Plasma waren im Vergleich zum systemischen Plasma 7 (Sham ad libitum Gruppe), 11 (Sham-BWM Gruppe) bzw.

3 (RYGB Gruppe) Gallensäuren signifikant erhöht messbar (Abb. 18A-C). Somit waren durch die Nahrungsrestriktion (Sham-BWM Gruppe) mehr Unterschiede zwischen dem portalvenösen und systemischen Plasma messbar als durch den RYGB. Durch den RYGB schien sich der Gallensäuremetabolismus dahingehend zu verändern, dass es zu einer Angleichung der portalvenösen und systemischen Gallensäurekompositionen kam.

Sowohl in der RYGB als auch in der Sham-BWM Gruppe waren die portalvenösen Plasmaspiegel der 3α -hydroxy-12 Ketolithocholsäure, der Taurochenodeoxycholsäure und der Tauro- β -Muricholsäure im Vergleich zu den systemischen Spiegeln erhöht. In der Sham ad libitum Gruppe bestanden keine signifikanten Veränderungen bezüglich dieser Gallensäuren. Des Weiteren konnte in beiden Sham Gruppen Desoxycholsäure, Tauro- ω -Muricholsäure, Tauro-Ursocholsäure und Tauro-Ursodeoxycholsäure im portalvenösen Plasma im Vergleich zum systemischen Plasma erhöht nachgewiesen werden (Abb. 18A-C).

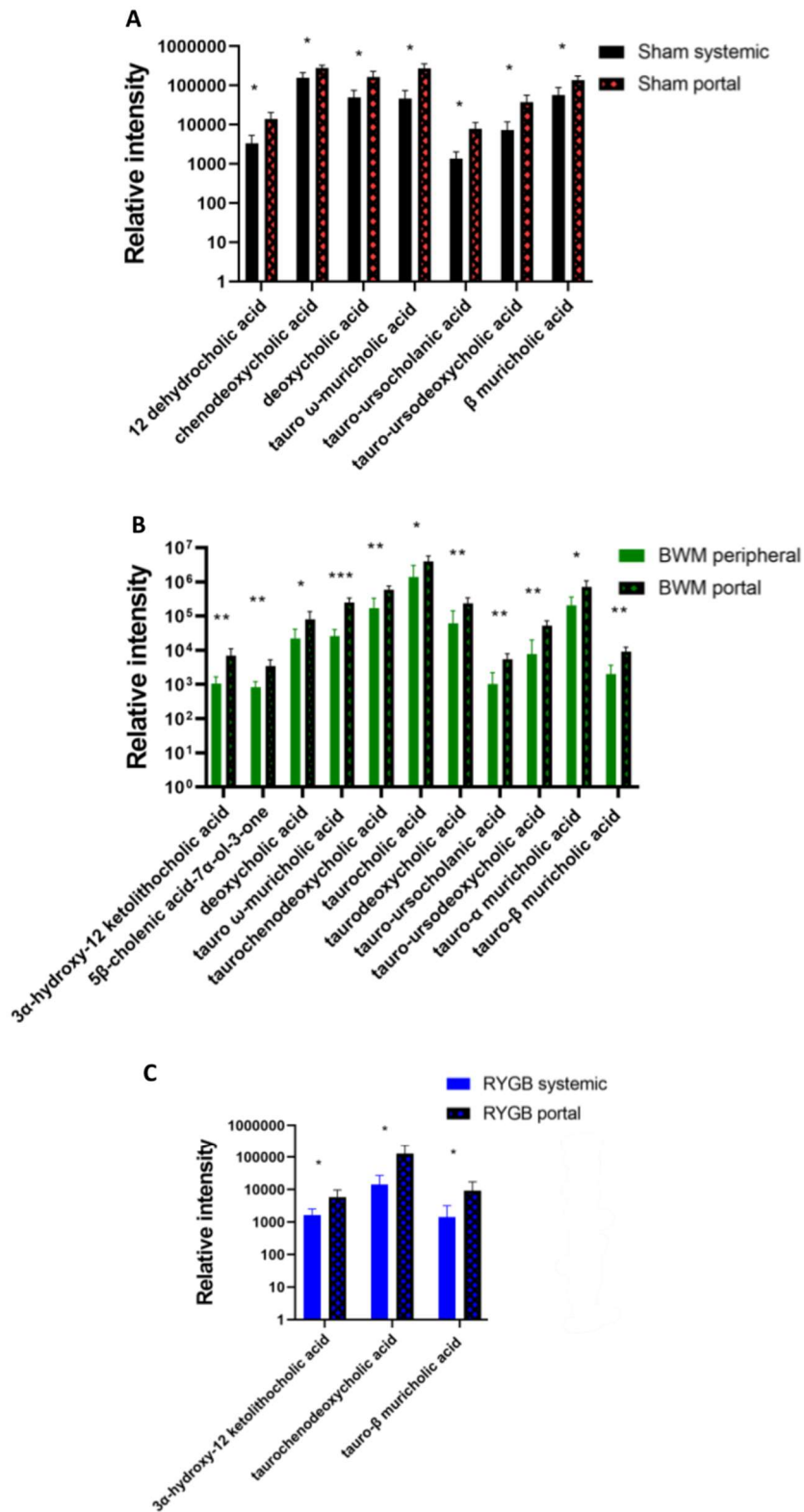


Abbildung 18: A-C zeigen die signifikant unterschiedlichen Gallensäurenspiegel der Sham (A), Sham-BWM (B) und RYGB Gruppe (C), wenn systemisches mit portalvenösem Blut verglichen

wurde (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t -test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

3.9 Fäkale bakterielle Komposition

Die Alpha-Diversität stellt ein Maß für die Artenvielfalt des intestinalen Mikrobioms dar und wurde mit Hilfe der R Software überprüft. Die drei Parameter Shannon-Index, „richness“ und Chao1 zeigten im Vergleich der Gruppen RYGB, Sham-BWM und Sham ad libitum keine signifikanten Unterschiede. Ausnahme war lediglich ein signifikant erhöhter Shannon-Index der Sham-BWM Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen in der vierten Woche (Abb. 19). Es gab keine signifikante Veränderung der Alpha-Diversität innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen, wenn die verschiedenen Zeitpunkte verglichen wurden (Abb. 19).

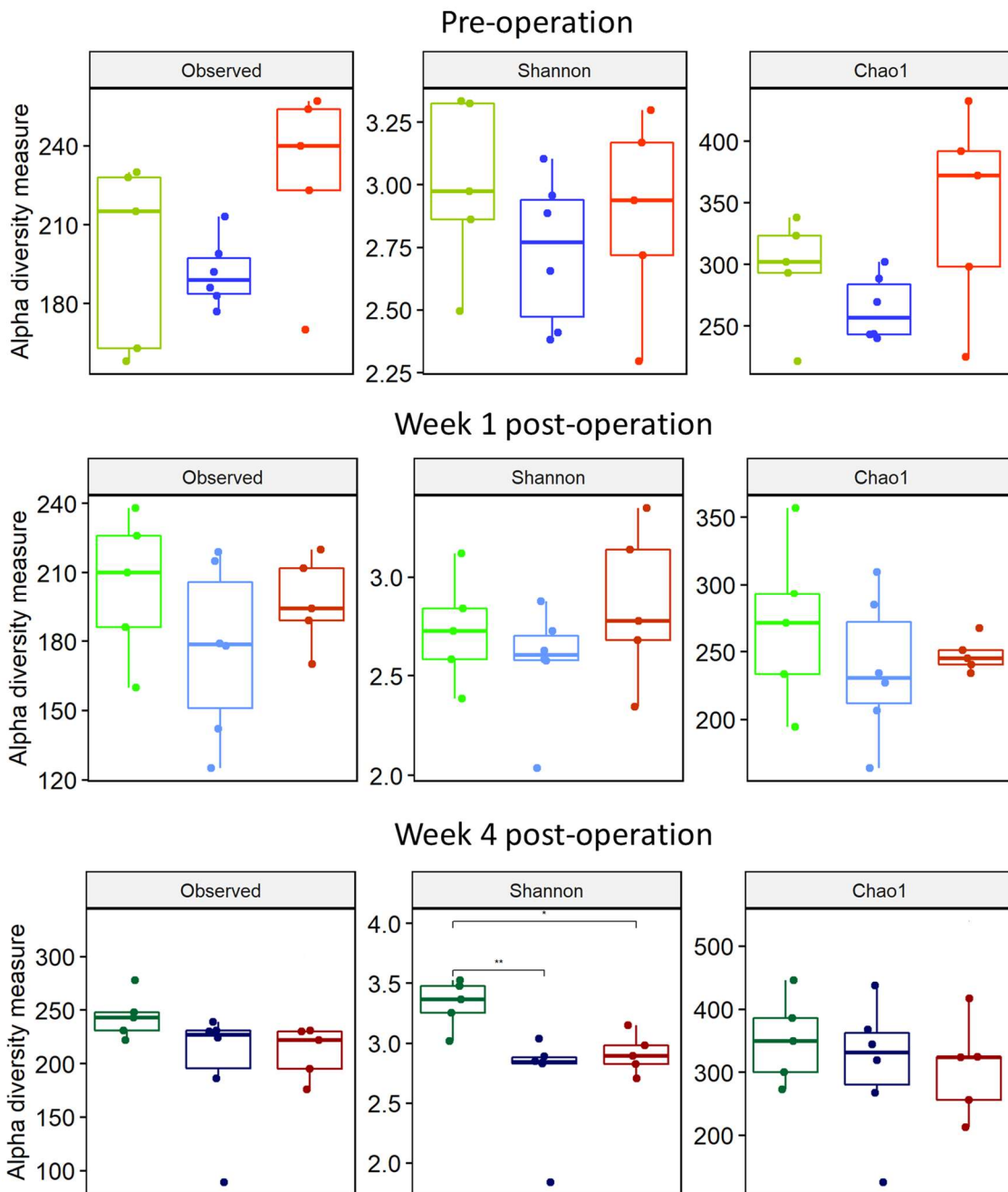


Abbildung 19: Alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms der Sham-BWM (grün), RYGB (blau) und Sham ad lib (rot) Gruppe zu drei verschiedenen Zeitpunkten (präoperativ, 1. Woche postoperativ und 4. Woche postoperativ). Der Wilcoxon Test wurde angewendet. Die Mittellinien repräsentieren den Medianwert. Das obere bzw. untere Ende der Boxen repräsentiert die 25. bzw. 75. Perzentile. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Betrachtete man die einzelnen Bakterienfamilien, wiesen die RYGB Ratten postoperativ über die gesamte Beobachtungszeit Veränderungen auf, während Tiere der Sham-BWM Gruppe nur in der 1. postoperativen Messung eine Veränderung zeigten und dann wieder auf das präoperative Spektrum zurückfielen. Die Sham ad libitum Tiere behielten die gesamte Zeit über eine ähnliche bakterielle Komposition (Abb. 20).

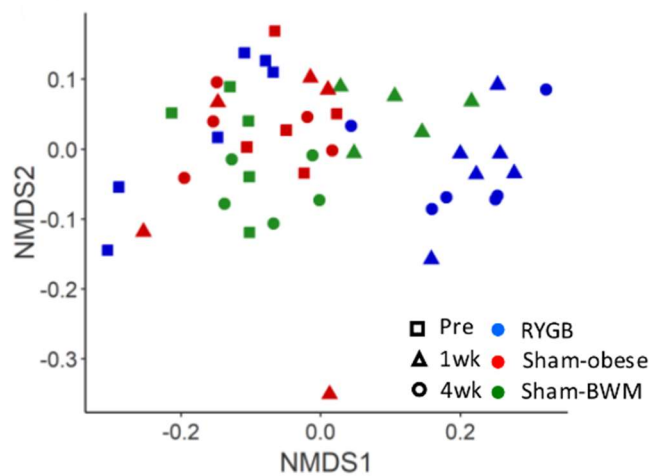


Abbildung 20: NMDS Plot bezüglich der Nachweise der Bakterien in den Faeces der einzelnen Gruppen (RYGB, Sham ad lib. und Sham-BWM) und bezogen auf die Zeit (präoperativ, 1. und 4. Woche postoperativ). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Die signifikanten Veränderungen in der 1. postoperativen Woche von den *Coriobacteriaceae* und *Lachnospiraceae* in der Sham-BWM Gruppe waren in der 4. postoperativen Woche nicht mehr nachweisbar (Abb. 21A-B). In der RYGB Gruppe waren *Coriobacteriaceae* und *Enterococcaceae* konstant erhöht, dahingegen waren *Lactobacillaceae*, *Peptostreptococcaceae* und *Ruminococcaceae* konstant erniedrigt (Abb. 21C-G). *Streptococcaceae* waren in der 1. postoperativen Woche nach RYGB erhöht, fielen dann aber wieder auf das präoperative Level zurück (Abb. 21H).

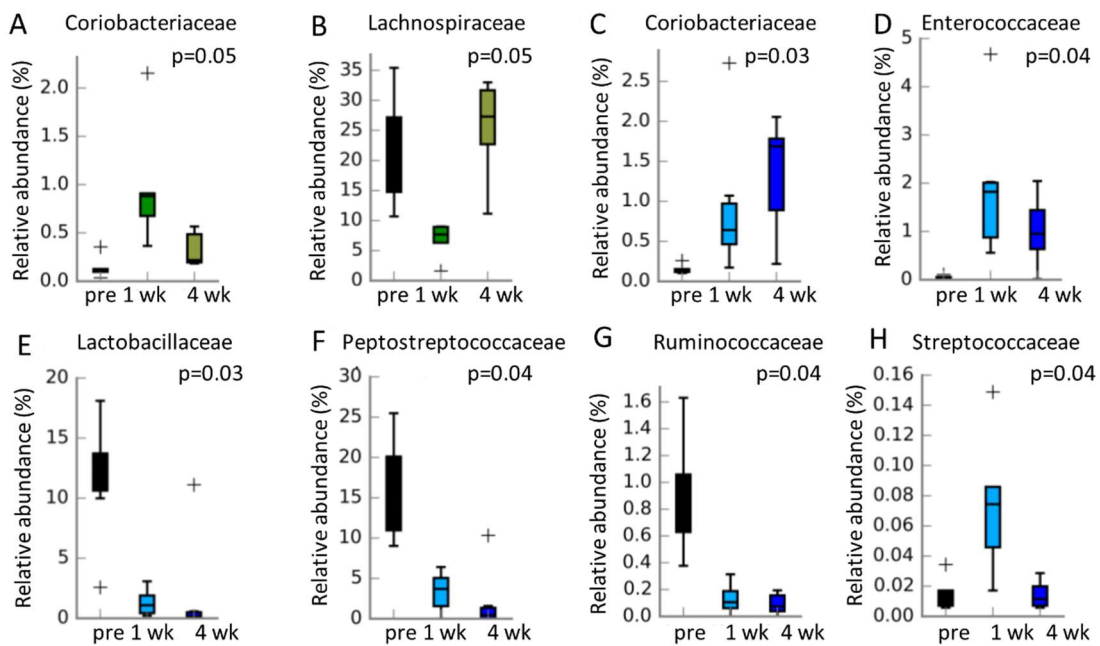


Abbildung 21 A-H: Box Plots mit signifikanten Veränderungen über die drei Zeitpunkte präoperativ, 1. und 4. Woche postoperativ. *Coriobacteriaceae* (A) und *Lachnospiraceae* (B) in der Sham-BWM Gruppe. *Coriobacteriaceae* (C), *Enterococcaceae* (D), *Lactobacillaceae* (E), *Peptostreptococcaceae* (F), *Ruminococcaceae* (G) und *Streptococcaceae* (H) in der RYGB Gruppe. Es wurden der Kruskal-Wallis H-Test sowie der Tukey-Kramer post-hoc verwendet und die Benjamin-Hochberg FDR zur Testkorrektur angewandt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Präoperativ bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Bakterienfamilien. Der Vergleich zwischen der Sham-BWM Gruppe und der Sham ad libitum Gruppe ergab auch zu keinem späteren, postoperativen Zeitpunkt signifikante Unterschiede. In der 1. postoperativen Woche war in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe der Nachweis von *Peptostreptococcaceae* deutlich verringert, ebenso waren unspezifische Clostridien, *Ruminococcaceae* und *Lachnospiraceae* in der 4. postoperativen Woche verringert. Zudem waren in der 1. postoperativen Woche *Enterococcaceae* in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe deutlich erhöht (Abb. 22).

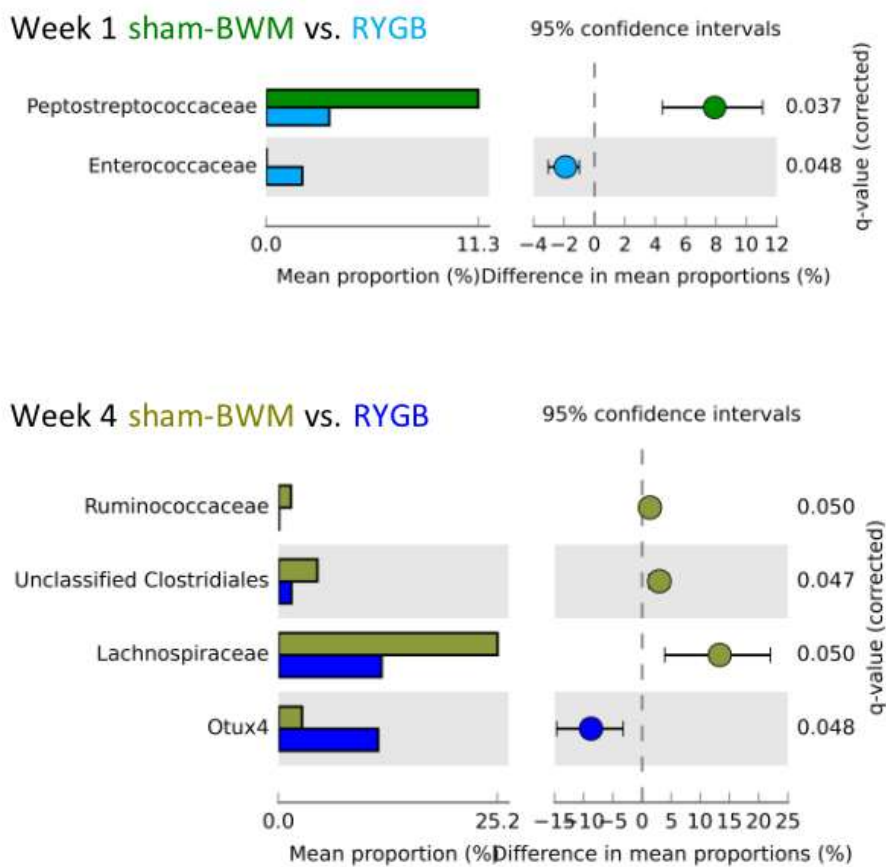


Abbildung 22: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen in spezifischen Bakterienfamilien zwischen der Sham-BWM und der RYGB Gruppe in der 1. und 4. postoperativen Woche. Die Statistik wurde mittels White's nichtparametrischem T-Test und nachfolgender zweiseitiger, multipler Benjamin-Hochberg FDR Korrektur durchgeführt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Es fielen höhere Level von *Erysipelotrichaceae* und niedrigere Levels von *Lactobacillaceae* sowohl in der 1. als auch in der 4. postoperativen Woche bei den RYGB Tieren im Vergleich zu den Sham ad libitum Tieren auf. Weiterhin waren *Peptostreptococcaceae*, *Clostridiaceae* und unspezifische Clostridien in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe vermindert nachweisbar, demgegenüber waren *Coriobacteriaceae* vermehrt nachweisbar (Abb. 23).

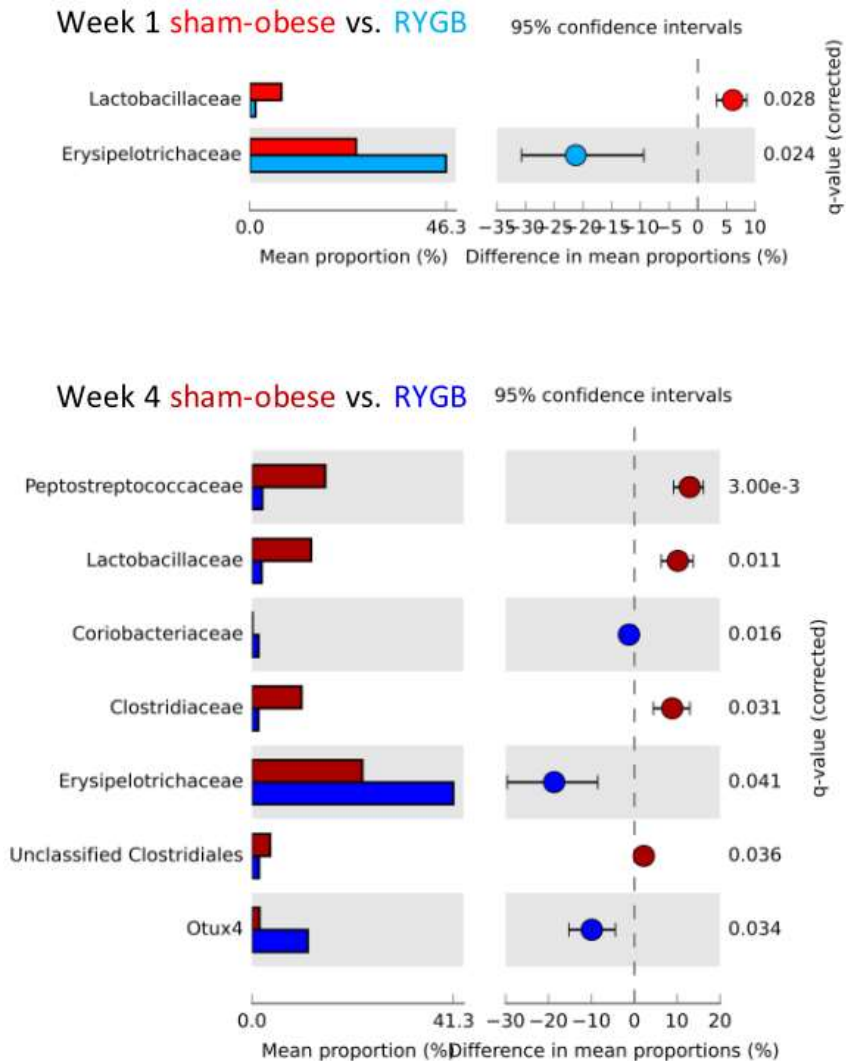


Abbildung 23: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen in spezifischen Bakterienfamilien zwischen der Sham ad libitum und der RYGB Gruppe in der 1. und 4. postoperativen Woche. Die Statistik wurde mittels White's nichtparametrischem T-Test und nachfolgender zweiseitiger, multipler Benjamin-Hochberg FDR Korrektur durchgeführt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass bei Zucker Ratten (fa/fa) nach RYGB einige Bakterienfamilien verringert, andere Bakterienfamilien vermehrt auftraten. Dieser Effekt war zum Teil gewichtsverlustunabhängig, da signifikante Unterschiede zu der Sham-BWM Gruppe bestanden.

4 Diskussion

Die metabolisch-bariatrische Chirurgie hat sich in den letzten Jahrzehnten von einer hoch risikoreichen experimentellen Therapie evidenzbasiert zu der aktuell effektivsten Therapie der Adipositas und deren Begleiterkrankungen für Betroffene entwickelt. Mittlerweile ist sie zu einem etablierten Bereich der High-End Medizin geworden [35-37]. Hochrechnungen zufolge sollen bis zum Jahr 2030 etwa 50% der Europäer und US-Amerikaner adipös sein [5, 105]. Ein Viertel der US-Amerikaner sollen bis dahin sogar eine schwere Adipositas (Grad II) entwickelt haben [105]. Die Chirurgie allein kann dieses Problem nicht lösen, sodass ein größeres Verständnis der Wirkungsweise von bariatrischen Operationen notwendig ist, um andere wirksame Therapien zu entwickeln.

Der Magenbypass (RYGB) stellt weltweit eines der häufigsten bariatrischen Verfahren dar [53]. Durch die Operation wird eine komplexe Umstrukturierung der anatomischen Verhältnisse vorgenommen, die direkt den Nahrungs- und Gallefluss beeinflusst [97]. Die Wirkungsweise geht weit über die historischen Konzepte der Malabsorption und Nahrungsrestriktion hinaus [95]. Um die Mechanismen dieser Therapie zu untersuchen, wurden zahlreiche klinische Studien durchgeführt und verschiedene Tiermodelle entwickelt [97, 106, 107]. Dabei konnte der humane Phänotyp nach RYGB in Bezug auf Gewichtsverlust, Nahrungsaufnahme und Änderung der Nahrungspräferenz erfolgreich im Tiermodell reproduziert werden [97, 108]. Als postoperative Folge sind Veränderungen bezüglich des Sättigungsempfindens, des Mikrobioms, des Energiestoffwechsels, des Gallensäuremetabolismus, sowie des neuroendokrinen Systems beschrieben [107]. Das Metabolom wird nachhaltig verändert, und der Darm kann somit als eine Art physiologische Schaltzentrale verstanden werden, die nach RYGB veränderte neuronale und endokrine Signale an verschiedene Organsysteme sendet [66]. Die genaue Wirkungsweise ist jedoch bis heute nur unzureichend verstanden [107].

Bei einem solch komplexen in vivo System gibt es viele Abhängigkeiten und Wechselwirkungen in den Prozessen. Ein starker Zusammenhang sowie eine gegenseitige Beeinflussung zwischen dem intestinalen Mikrobiom und dem Gallensäuremetabolismus gilt als gesichert und wird auch als möglicher Mediator für die positiven Effekte der metabolisch-bariatrischen Chirurgie angesehen [65]. Das intestinale Mikrobiom verändert sich nach einem bariatrischem Eingriff nachhaltig, und

es wird postuliert, dass dadurch eine anti-diabetogene Wirkung vermittelt werden kann [109, 110]. In einer Studie von Liou et. al. führte eine fäkale Mikrobiom-Transplantation (FMT) an keimfreie Mäuse von Mäusen, welche zuvor einen RYGB erhalten hatten, zu einem signifikanten Gewichtsverlust im Vergleich zur FMT an keimfreie Mäuse von zuvor scheinoperierten Tieren [46]. Bei Patienten mit Clostridium difficile Infektion ist die FMT schon eine etablierte sowie effektive Methode, weitere Indikationen werden kritisch geprüft [111, 112]. Fallberichte zeigen, dass sich auch das Körpergewicht von Patienten nach einer FMT ändern kann [113, 114]. Nach erfolgreicher FMT änderte sich in einer Studie von Weingarden et. al. nicht nur die Darmflora der Patienten, sondern auch die fäkale Gallensäurezusammensetzung. Zuvor kaum nachweisbare sekundäre Gallensäuren konnten postinterventionell deutlich erhöht gemessen werden, wohingegen die zwei primären Gallensäuren (Cholsäure und Chenodesoxycholsäure) nahezu verschwunden waren [115]. Umgekehrt konnten Islam et. al. den Einfluss der Gallensäuren (genauer: Cholsäure) auf das Mikrobiom nachweisen [116]. Gesichert scheint eine zentrale Rolle, die die intestinale Flora auf den Gallensäuremetabolismus ausübt [60, 117]. Das Mikrobiom verstoffwechselt die primären, in der Leber synthetisierten Gallensäuren und sorgt damit für die Produktion von sekundären Gallensäuren. Die Gallensäuren können in ihren hormonähnlichen Eigenschaften (Aktivierung des TGR-5 und FXR-Rezeptors) somit durch das Mikrobiom nachhaltig verändert werden, da die verschiedenen Gallensäuren unterschiedliche Affinitäten zu den Rezeptoren besitzen [117, 118]. Das vorhandene Potential in der weiteren wissenschaftlichen Verknüpfung und Untersuchung dieses sogenannten „Cross-talks“ zwischen den Gallensäuren und dem intestinale Mikrobiom ist immens, und der postinterventionelle Phänotyp nach RYGB ist dabei eine Möglichkeit zu neuen Erkenntnissen zu gelangen [70, 109, 119].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Tiermodell des RYGB bei Ratten ist gut charakterisiert und entspricht sowohl in der anatomischen Konfiguration, als auch vom metabolischen Phänotyp weitgehend der humanen Situation [120]. Da sich die metabolischen Veränderungen nach RYGB bei den Menschen und den Tieren stark ähneln, sind die im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse gut vergleichbar. Ein Tiermodell bietet einige Vorteile. Durch den Versuchsaufbau, die gleichen Haltungsbedingungen, die gleiche Diät und den gleichen circadianen Rhythmus ist die Standardisierbarkeit gegeben. Die Abnahme von portalvenösem Blut mittels invasiver

Techniken ist möglich. Außerdem können chirurgiespezifische, gewichtsverlust-unabhängige Effekte gemessen werden, indem durch Nahrungsrestriktion körperrgewichtsanpassende Kontrollgruppen gebildet werden [95-97]. Das verwendete Versuchsprotokoll mit Bildung einer gewichtsangepassten Kontrollgruppe (Sham-BWM) und Untersuchung des portalvenösen Kompartiments bei einem stabilen prädiabetischen Phänotyp ist ein Alleinstellungsmerkmal des Tierversuchs, und ermöglicht die spezifische Charakterisierung des Metaboloms nach RYGB.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der RYGB zu einer signifikanten und anhaltenden Gewichtsreduktion, einer reduzierten Nahrungsaufnahme ohne Malabsorption, einer verbesserten Glukosekontrolle sowie zu einer veränderten Insulinantwort im Rahmen des oGTT führt [70, 97].

Gewicht, Nahrungsaufnahme, fäkaler Energiegehalt: Nach RYGB verloren die Tiere signifikant an Gewicht und wogen im gesamten Versuchszeitraum weniger im Vergleich zu der Sham ad libitum Gruppe. Dies stimmt mit den Ergebnissen vergleichbarer Studien überein [92, 97]. In dieser Hinsicht entsprach der Phänotyp den Erwartungen. Die Nahrungsaufnahme der RYGB Gruppe und der Sham-BWM Gruppe war praktisch identisch. Auch beim fäkalen Energiegehalt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, sodass Malabsorption als Hauptfaktor für die positive Wirkung des RYGBs ausgeschlossen erscheint [121].

Glukosetoleranz: Die RYGB Gruppe zeigte im Vergleich zur Sham ad libitum Gruppe während des oGTTs sowohl eine deutlich verbesserte Glukosetoleranz als auch ein abweichendes Blutzuckerprofil mit einem schnellen, steilen Anstieg des Blutzuckers und anschließender Hypoglykämie. Es ist zu vermuten, dass der rasche Anstieg des Blutzuckers auf den frühen Kontakt der zuckerreichen Lösung mit dem Jejunum und auf die Umgehung des Magens als Reservoir zurückzuführen ist. Der anschließende starke Abfall kann zumindest teilweise durch eine anschließend erhöhte Inkretin-bedingte Insulinausschüttung erklärt werden. Die oGTT Daten konnten keinen signifikanten Benefit der RYGB-Gruppe im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe in Bezug auf die Glukosetoleranz zeigen, d.h. hier kam es zu keinem gewichtsverlustunabhängigen Effekt. Ein Grund hierfür könnte der prädiabetische Phänotyp der Zucker Ratten (fa/fa) sein.

Insulinsekretion: Die kumulative Insulinsekretion der RYGB Tiere zeigte sich bei gleichzeitig besserer Glukosetoleranz im Vergleich zu den Sham ad libitum Tieren signifikant niedriger. Eine Erklärung dafür ist die nach RYGB verbesserte Insulinsensitivität. Dies bestätigen auch Ergebnisse von Chambers et. al. In ihrer Studie verbesserte sich die (intraperitoneale) Insulinsensitivität sowie die Glukosetoleranz proportional zum Gewichtsverlust. Die hepatische Insulinsensitivität war nach RYGB sogar gewichtsverlustunabhängig erhöht. Zusätzlich konnte in den bariatrisch operierten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine verbesserte postprandiale GLP-1- und Insulinantwort gemessen werden [94]. Dass GLP-1 allein für die langfristig verbesserte Glukosehomöostase zuständig ist, erscheint unwahrscheinlich, da in einer klinischen Studie von Jimenez et. al. ein GLP-1 Antagonist (Exendin 9-39) die positiven Effekte einer bariatrischen Operation auf die diabetische Stoffwechsellage nicht aufheben konnte [92, 122].

Neben der Erfassung des Gewichts, der Nahrungsaufnahme sowie des oGTTs konzentriert sich diese Arbeit auf die Beobachtung metabolomischer Veränderungen nach RYGB. Die Untersuchung von systemischem sowie portalvenösem Plasma, Faeces und Urin konnte zahlreiche signifikante, gewichtsverlustunabhängige Effekte nach RYGB messen. Bereits ab der 1. postoperativen Woche konnten in der RYGB Gruppe im Vergleich zu beiden Sham Gruppen signifikant veränderte bakterielle Metabolite wie Indoxylsulfat im Urin oder Succinat, Tyrosin und GABA in den Faeces nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren bis zum Versuchsende nach 4 Wochen nachweisbar. Signifikant erhöhte Konzentrationen von PAG und 4-Cresyl Glucuronid im Urin konnten erst ab der 2. postoperativen Woche gemessen werden.

Alle signifikant messbaren postoperativen metabolomischen Veränderungen, die sich in der RYGB Gruppe im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe ergaben, sind in Abbildung 24 zusammengefasst und veranschaulichen den gewichtsverlustunabhängigen Effekt des RYGB, der in dem Versuch nachgewiesen werden konnte. Nachfolgend werden diese Ergebnisse genauer anhand der aktuellen Datenlage interpretiert und diskutiert.

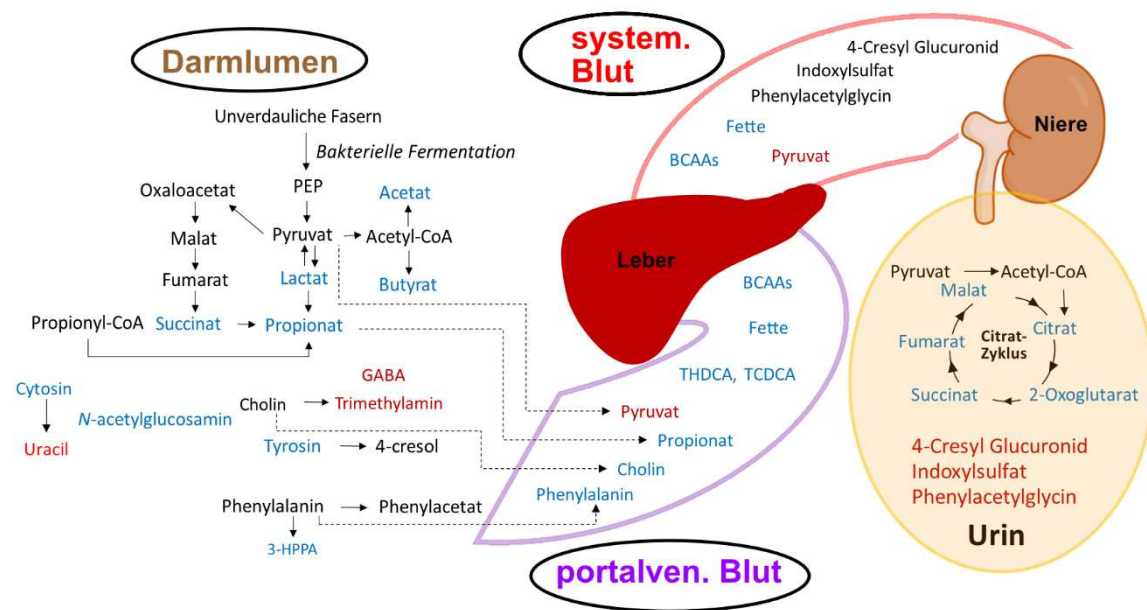


Abbildung 24: Schematische Darstellung der metabolomischen Veränderungen in der RYGB im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe. Rot zeigt erhöhte Konzentrationen und blau zeigt erniedrigte Konzentrationen in den jeweiligen Kompartimenten (Darmlumen, systemisches und portalvenöses Blut, Urin) der RYGB Tiere an. Abb. modifiziert nach: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20.

Kurzkettige Fettsäuren: Im Vergleich zu der Sham ad libitum Gruppe waren in der RYGB Gruppe postoperativ durchgehend signifikant niedrigere fäkale Konzentrationen kurzkettiger Fettsäuren (Short chain fatty acids/SCFA), wie z.B. Formiat, Acetat und Propionat messbar. Entsprechende Signifikanzen konnten auch im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe, dort in der 2. oder 4. postoperativen Woche, gemessen werden. Dies legt nahe, dass die kalorische Restriktion zu den reduzierten SCFAs beiträgt und somit kein rein RYGB-spezifischer Effekt vorliegt. Erniedrigte fäkale Konzentrationen von SCFAs durch Kalorienrestriktion sind bereits vorbeschrieben [123]. In einer Studie von Liou et. al. wurden im Mausmodell auch erniedrigte fäkale Acetatkonzentrationen nach RYGB gemessen, auch wenn es bei Butyrat keinen Unterschied gab und Propionat in erhöhter Konzentration gemessen wurde [46]. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt eine reduzierte Fermentierung von Nährstoffen nach RYGB vermuten, die z.B. durch eine Veränderung des intestinalen Mikrobioms ausgelöst sein könnte. Für diese These fanden sich mittels der durchgeführten 16s-rRNA genbasierten Sequenzierungsanalyse

weitere Belege. So wurden signifikant weniger *Ruminococcaceae* und *Lactobacillaceae* in der RYGB Gruppe nachgewiesen, zusammen mit einem nicht signifikanten aber dennoch deutlich niedrigerem Vorkommen von *Lachnospiraceae*. Es ist bekannt, dass Bakterien dieser Familien (*Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* und *Lactobacillaceae*) SCFAs produzieren, z.B. *Faecalibacterium prausnitzii* und *Subdoligranulum variabile* (Familie *Ruminococcaceae*), *Roseburia inulinivorans* und *Eubacterium rectale* (Familie *Lachnospiraceae*) und *Lactobacillus reuteri* (Familie *Lactobacillaceae*) [124].

Butyrat: Die Messungen dieser Arbeit ergaben in der RYGB Gruppe eine signifikant niedrigere fäkale Butyratkonzentration als in beiden Sham Gruppen. Butyrat stellt die primäre Energiequelle für Kolonozyten dar [125], und die verminderte Verfügbarkeit könnte zu einer Intensivierung des energieliefernden Stoffwechsels, wie z.B. der Glykolyse führen, um so das entstandene Energiedefizit der Kolonozyten auszugleichen. Eine Studie von Zarrinpar et. al. konnte nach Antibiotika-induzierter Reduktion des intestinalen Mikrobioms eine veränderte Energiegenerierung in Enterozyten belegen. So erfolgte nach antibiotischer Behandlung ein verringerter Abbau von kurzkettigen Fettsäuren, und stattdessen eine vermehrte Glykolyse, wodurch die Glukosehomöostase beeinflusst wurde [125]. Eine hohe Butyratkonzentration in den Faeces konnte im Tierversuch den Verlauf einer Kolitis positiv beeinflussen, sodass man lokal von einer protektiven, antiinflammatorischen Wirkung dieser kurzkettigen Fettsäure für den Magen-Darm Trakt ausgeht [126]. In dieser Arbeit können somit die niedrigeren fäkalen Butyratkonzentrationen nach RYGB auf eine Verringerung dieses positiven Effekts hinweisen. Allerdings beschreiben Publikationen bislang vor allem die Reduktion inflammatorischer Prozesse nach einer bariatrischen Operation [119, 127].

Propionat: Im portalvenösen Blut der Sham-BWM Gruppe wurden deutlich erhöhte Konzentrationen von Propionat im Vergleich zur RYGB Gruppe gemessen. Dieser Unterschied bestand nicht zwischen der Sham ad libitum und der RYGB Gruppe. Zugleich war das fäkal gemessene Propionat in der 4. postoperativen Woche höher in der Sham ad libitum Gruppe als in der RYGB Gruppe. Die Sham-BWM Gruppe zeigte keine erhöhte fäkale Propionat Konzentration zu diesem Zeitpunkt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Kalorienrestriktion zu einer höheren Resorption von Propionat im Darm führt, welches über die V. porta vermehrt anflutet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Kalorienrestriktion im Rattenmodell eine vermehrte Expression

mikrobieller Enzyme zur Synthese von Propionat induziert wird [128]. Durch Propionat können hepatische und plasmatische Fettsäuren, die inflammatorisch wirken können, gesenkt werden [129]. Somit könnte Propionat indirekt zur verbesserten Glukosetoleranz beitragen, da sowohl erhöhte freie Fettsäuren als auch Inflammation zu Insulinresistenz führen können [129]. Dies passt zu dem beobachteten Phänotyp der Sham-BWM Tiere, die während des oGTTs ähnliche Insulin- und Glukosekonzentrationen wie die RYGB Tiere zeigten. Über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann Propionat auch die Freisetzung von GLP-1 und PYY induzieren und damit die Sättigung beeinflussen [130]; über den GPR41-Rezeptor kann Propionat den Energieverbrauch steuern [131]. Die Datenanalyse im Versuch zeigt eine gesteigerte enterale Absorption von Propionat durch Kalorienrestriktion im Vergleich zum RYGB. Propionat stellt somit in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Studien einen möglichen Mediator zur verbesserten metabolischen Kontrolle nach Gewichtsverlust durch kalorische Reduktion dar.

γ-Amino-Buttersäure: Die fäkale Konzentration der neuroaktiven Substanz γ -Amino-Buttersäure (GABA) war postoperativ in der RYGB Gruppe jederzeit höher im Vergleich zu beiden Sham Gruppen. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Untersuchungen im Tiermodell [70]. Es gibt Hinweise darauf, dass *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Escherichia* und *Klebsiella* an der GABA Biosynthese beteiligt sind [132]. Passend dazu konnten in dem Versuch signifikant erhöhte *Enterococcus* Nachweise nach RYGB gemessen werden. Studien zufolge hat GABA einen Einfluss auf die Darmmotilität [133] und könnte so die Nahrungspassage im Darm nach RYGB beeinflussen. GABA stimuliert über $GABA_A$ und $GABA_C$ Rezeptoren von entero-endokrinen L-Zellen ebenso die Freisetzung von GLP-1, welches verstärkend auf die Insulinsekretion wirkt und somit die Glukosekontrolle verbessert [134]. Erhöhte GLP-1 Spiegel nach RYGB sind sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten nachgewiesen worden [135] und können wiederum die endogene GABA Produktion von pankreatischen β -Zellen vermitteln, wodurch sich erhöhte fäkale und plasmatische GABA Spiegel erklären [70]. In dieser Arbeit zeigten RYGB Tiere erniedrigte Insulinlevel und eine verbesserte Glukosekontrolle im Vergleich zu Sham ad libitum Tieren. Diese Ergebnisse könnten unter anderem durch eine vermehrte GABA Produktion des intestinalen Mikrobioms vermittelt worden sein.

Aromatische Aminosäuren: In den untersuchten Biofluiden waren aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin mit deren Metaboliten nach RYGB Operation stark verändert. So zeigten sich niedrigere fäkale Konzentrationen von Tyrosin und 3-Hydroxyphenylpropionat (3-HPPA); hingegen waren im Urin 4-Cresyl Glucuronid, 4-Hydroxyphenylacetat, Indoxylsulfat und Phenylacetyl-glycin (PAG) im Vergleich zu den beiden Sham Gruppen erhöht. Im portalvenösen Plasma der RYGB Gruppe zeigten sich die Phenylalanin- und Tyrosinspiegel im Vergleich zu den Sham Gruppen niedriger. Daraus lässt sich ableiten, dass die Absorption von aromatischen Aminosäuren nach RYGB erniedrigt ist, und ihre Bioverfügbarkeit im Kolon ansteigt, sodass intestinale Bakterien aus diesen Aminosäuren p-Cresol und Phenylacetat herstellen. Die bakteriellen Metabolite werden absorbiert, zur Leber transportiert und hier mit Glucuronid oder Glycin konjugiert, sodass vermehrt 4-Cresyl Glucuronid sowie PAG entstehen und über den Urin ausgeschieden werden. 3-HPPA ist ein bakterieller Metabolit von Phenylalanin. Die Ergebnisse zeigen, dass durch RYGB eine vermehrte Konversion von Phenylalanin zu Phenylacetat stattfindet als zu 3-HPPA. Die in der RYGB Gruppe gemessene höhere Indoxylsulfatkonzentration im Urin könnte negative Effekte auf Niere und Herz bewirken, da Indoxylsulfat ein urämisches Toxin ist, welches mit Arteriosklerose assoziiert ist [136]. Bisherige klinische Studien beschreiben divergent dazu eine Reduktion des kardiovaskulären Risikos sowie eine Verbesserung der ventrikulären Funktion nach RYGB [137, 138].

Der nach RYGB beobachtete gesteigerte Metabolismus aromatischer Aminosäuren im Intestinum könnte auch auf potenzielle negative Langzeitfolgen des RYGB hinweisen. So zeigte eine Metaanalyse fäkaler Metagenome eine Intensivierung von Stoffwechselwegen, die aromatische Aminosäuren abbauen und spezifisch für das kolorektale Karzinom sind [139]. Auch in vorliegender Untersuchung wurden in der RYGB Gruppe im Vergleich zu den Sham Gruppen fäkal erhöhte Trimethylaminwerte und portalvenös niedrigere Cholinwerte gemessen, was auf einen verstärkten Cholin-Metabolismus nach RYGB hinweist. Metagenomische Analysen zeigen einen Überschuss an Genen in Patienten mit kolorektalem Karzinom, die die Cholin-Trimethylamin-Lyase kodieren [140]. Auch die niedrigeren Butyratkonzentrationen in der RYGB Gruppe können eine Darmkrebserkrankung begünstigen, da Butyrat die Apoptose von Tumorzellen im Darm unterstützt [141]. Tatsächlich gibt es bereits Publikationen, die ein erhöhtes Langzeitrisiko einer Darmkrebserkrankung für Patienten

nach bariatrischer Operation zeigen [142, 143]. Insgesamt scheint die bariatrische Chirurgie jedoch das Risiko an Karzinomen zu erkranken, zu senken [144]. Insbesondere hormonassoziierte Krebserkrankungen sind laut einer retrospektiven Analyse mit über 15.000 eingeschlossenen Patienten signifikant seltener [145].

Citratzyklus und Glukosestoffwechsel: Aus der Erniedrigung von Urinkonzentrationen der Zwischenprodukte vom Citratzyklus wie Succinat, Citrat, 2-oxoglutarat, Fumarat und Malat sowie der Erhöhung der plasmatischen Konzentration von Pyruvat in der RYGB Gruppe kann eine verstärkte Aktivität des Citratzyklus nach RYGB abgeleitet werden. Vorige Studien bestätigen diese Beobachtung [70, 146]. Zwischen der RYGB Gruppe und der Sham-BWM Gruppe fand sich bei diesen Zwischenprodukten bis auf Succinat erst ab der 2. postoperativen Wochen ein signifikanter Unterschied, woraus man ableiten kann, dass kalorische Restriktion ebenso kurzzeitig die Aktivität des Citratzyklus erhöht, die RYGB Operation jedoch einen langfristigeren spezifischen Effekt erzielen kann. Die hohen Pyruvatspiegel in portalvenösem sowie systemischem Plasma nach RYGB in diesem Versuch zeigen eine verstärkte Glykolyse sowie eine Inhibierung der Glukoneogenese an. Unterstützt wird dieses Ergebnis von einer Studie von Saeidi et. al. mit RYGB operierten Ratten. Auch dort zeigte sich eine vermehrte Glukoseaufnahme und -verwertung aus dem alimentären Schenkel des Darmes [147]. Die Hochregulierung der Glykolyse und der konsekutiv intensiviert ablaufende Citratzyklus könnten zu dem vorgeschriebenen erhöhten Energiegrundumsatz nach RYGB beitragen.

Verzweigtkettige Aminosäuren: Die gemessenen Konzentrationen von verzweigtkettigen Aminosäuren waren in der RYGB Gruppe sowohl im portalvenösen als auch im systemischen Plasma im Vergleich zu den Sham Gruppen niedriger. Ebenso konnte im Urin der RYGB Tiere eine verstärkte Exkretion von 2-Oxoisovalerat und eine verminderte Exkretion von 3-Methyl-2-Oxovalerat nachgewiesen werden, beides Abbauprodukte des Valin bzw. Isoleucin. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass der RYGB katabole Enzyme von verzweigtkettigen Aminosäuren im Fettgewebe begünstigt [148]. Konklusiv dazu konnten erhöhte Konzentrationen von verzweigtkettigen Aminosäuren im Plasma zur Ausbildung der Insulinresistenz führen [149]. Zusammengefasst könnten also erniedrigte Spiegel verzweigtkettiger Aminosäuren nach RYGB mit einer verbesserten Insulinsensitivität assoziiert sein, wohingegen die kalorische Restriktion über andere Mechanismen, am ehesten durch Propionat, die Insulinresistenz zu vermindern scheint.

Gallensäuren: Es wird angenommen, dass unter anderem Gallensäuren die metabolischen Verbesserungen nach RYGB verursachen. In den durchgeführten Gallensäurebestimmungen mittels UPLC Massenspektrometrie konnten einzelne Gallensäuren systemisch und portalvenös gemessen werden. In der Diskriminationsanalyse ergab sich ein heterogenes und hochkomplexes Bild. Die Messungen sind dabei rein deskriptiv und zeigen lediglich einen veränderten Phänotyp nach RYGB im Vergleich zur Sham Gruppe sowie der Sham-BWM Gruppe.

Während die meisten vorliegenden klinischen und experimentellen Studien eine Erhöhung der plasmatischen Gallensäurespiegel nach RYGB zeigen [74-76, 150], gibt es andere Analysen ohne signifikante Unterschiede [151] oder sogar Untersuchungen, bei denen es zu einer Verminderung plasmatischer Gallensäurespiegel kam [152]. Gleichzeitig zeigten Studien niedrigere fäkale Gallensäurespiegel nach RYGB [70, 153], sodass man sich fragt, wie intestinale Gallensäuren die metabolische Funktion beeinflussen könnten.

In allen drei Versuchsgruppen wurden wider Erwarten im portalvenösen Blut insgesamt höhere Gallensäurespiegel als im systemischen Blut gefunden. Die meisten Veränderungen gab es in der Sham-BWM Gruppe. Drei Gallensäuren (3 α -hydroxy-12-Ketolithocholsäure, Taurochenodeoxycholsäure und Tauro- β -Muricholsäure) waren im portalvenösen Blut der RYGB Tiere signifikant höher als im systemischen Blut. Da diese Veränderungen auch die Sham-BWM Gruppe zeigte, kann dieser Effekt durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme verursacht worden sein. Des Weiteren waren primäre Gallensäuren wie Cholsäure und Chenodesoxycholsäure sowie sekundäre, hauptsächlich Taurin-konjugierte Gallensäuren, wie Taurohyodeoxycholsäure und Taurochenodeoxycholsäure in der RYGB Gruppe im Vergleich zu den Sham Gruppen erniedrigt. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, die an Minischweinen durchgeführt wurde [154]. Duboc et. al. konnten zeigen, dass konjugierte Gallensäuren im Ileum nach RYGB im Vergleich zu Sham Tieren erniedrigt sind [155]. Das könnte darauf hinweisen, dass eine vermehrte Spaltung konjugierter Gallensäuren durch das intestinale Mikrobiom eine verringerte Reabsorption in den entero-hepatischen Kreislauf bewirkt. Simonen et. al. zeigten, dass trotz insgesamt erhöhter Serumkonzentrationen von Gallensäuren nach RYGB insbesondere Taurin-konjugierte Gallensäuren nach RYGB erniedrigt waren [74]. Dieser Effekt war assoziiert mit einer erhöhten

Lipidoxidation und erniedrigten Glukoseoxidation [74]. Diese Daten stimmen mit den vorliegend in der RYGB Gruppe gemessenen, niedrigeren Spiegel in plasmatischer Fettsäuren sowie Glycerylphosphorylcholin überein.

Es gibt mehr und mehr Hinweise dafür, dass die positive Wirkung der Gallensäuren auf die verbesserte Glukosetoleranz bei erhöhter Insulinsensitivität vor allem über nukleäre (FXR) und membrangebundene (TGR5) Gallensäurerezeptoren in unterschiedlichen Geweben vermittelt wird [87]. Die Glykogensynthese und -speicherung in der Leber erfolgt FXR-abhängig [83, 84]. Der Energieumsatz kann im Fett- und Muskelgewebe über eine TGR5-Aktivierung erhöht werden und die Insulinsekretion in beta-Zellen des Pankreas kann ebenso TGR-abhängig gesteigert werden [51, 85, 86]. Die Ergebnisse vorliegender Arbeit weisen aber eher darauf hin, dass die metabolischen Verbesserungen bei den Zucker Ratten (*fa/fa*) nicht hauptsächlich auf diese Achse zurückzuführen sind, da die plasmatischen Spiegel der Gallensäuren nach RYGB im Vergleich zu den Sham Gruppen unerwartet erniedrigt waren. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Arbeitsgruppe, die mit TGR5 Knockout Mäusen arbeitete. Die TGR5 Knockout Mäuse hatten einen vergleichbaren metabolischen Benefit durch RYGB wie die Wildtyp Mäuse. Andere Mechanismen schienen somit die RYGB-spezifischen Effekte auszulösen [156]. Weiterhin zeigten Studien mit Gallensäure-Komplexbildnern sowie Hemmern von Gallensäuretransportern niedrigere plasmatische Gallensäurespiegel aber trotzdem eine Verbesserung des Glukosemetabolismus, sodass insgesamt die Rolle der systemisch zirkulierenden Gallensäuren bisher womöglich überschätzt wurde [157, 158]. Steinert et. al. postulieren in ihrer prospektiven, randomisierten Studie ebenso, dass systemisch erhöhte Gallensäurespiegel nicht für die kurzfristige, postoperative Besserung des Diabetes entscheidend sein können, da eine Erhöhung der Spiegel erst im Verlauf auftrat [76]. Allerdings könnten schon intestinal erhöhte Konzentrationen den TGR5 Rezeptor aktivieren; gleichzeitig aber zu einem Gallensäureverlust führen. Ebenso können nur portalvenös messbare Unterschiede für einen positiven Effekt verantwortlich sein. Portalvenöse und intestinale Messwerte sind in klinischen Studien methodisch nur schwer zugewinnen, sodass dadurch die entero-hepatische Zirkulation selten ausreichend repräsentiert ist. Der Einfluss von TGR5 auf die Gallensäurehomöostase scheint gesichert, da TGR5 knock-out Mäuse insgesamt einen hydrophoberen Gallensäurepool besaßen [159]. Außerdem führt eine TGR5 Aktivierung zu einer vermehrten GLP-1 Ausschüttung in den entero-endokrinen L-Zellen

des Darms [160]. Für die langfristige Diabetesremission bleibt der veränderte Gallensäuremetabolismus somit ein möglicher wichtiger Faktor. So haben Gerhard et. al. in ihrer klinischen Studie nach RYGB höhere Gallensäure Spiegel bei Patienten messen können, die eine Remission ihres Diabetes zeigten, als bei den Probanden, bei denen der Diabetes persistierte. Nur bei den Patienten, die durch den RYGB eine Diabetesremission hatten, konnten Cholsäure und Desoxycholsäure postoperativ systemisch erhöht nachgewiesen werden [161]. Die Identifikation und Spezifikation der biologischen Eigenschaften jeder einzelnen Gallensäure und ihr jeweiliger Einfluss auf mögliche Signalwege muss Gegenstand zukünftiger Forschung sein, um z.B. neue pharmakologische Substanzen entwickeln zu können. Aufgrund ihrer wechselseitigen Beeinflussung ist der Gallensäuremetabolismus dabei stets in Zusammenhang mit dem intestinalen Mikrobiom zu sehen.

Intestinales Mikrobiom: In dieser Arbeit wurde das intestinale Mikrobiom durch Kalorienrestriktion nur kurzzeitig beeinflusst. In der Sham-BWM Gruppe zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen von *Coriobacteriaceae* und ein verringertes Vorkommen von *Lachnospiraceae* in der 1. postoperativen Woche im Vergleich zu präoperativ. Dieser signifikante Unterschied war in der 4. postoperativen Woche nicht mehr messbar. Die erniedrigten Werte von *Lachnospiraceae* durch Kalorienrestriktion sind bereits von Zheng et. al. beschrieben worden, ebenso wie die durch Kalorienrestriktion signifikanten Veränderungen bezüglich der Konzentrationen von Aminosäuren, Ketonkörper oder Gallensäuren [162]. In der vorliegenden Arbeit gab es dahingehend keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sham ad libitum und Sham-BWM Gruppe. Erklärungen für die divergenten Ergebnisse wären eine zu kurze Phase der Kalorienrestriktion (4 Wochen) und/oder zu geringe Sham Gruppengrößen (jeweils n=5). Vorliegende Analysen des intestinalen Mikrobioms zeigen weiterhin ein deutlich erhöhtes Vorkommen an *Coriobacteriaceae* nach RYGB. Eine Publikation von Liu et. al. stellte bereits mittels eines diabetischen Tiermodells die These auf, dass diese Bakterienfamilie eine Vielzahl der positiven Effekte nach RYGB, insbesondere auf den Glukosemetabolismus, vermitteln könnte [163]. In dieser Arbeit konnten in der Sham-BWM Gruppe im Vergleich zur RYGB Gruppe insgesamt vermehrt *Peptostreptococcaceae*, *Ruminococcaceae* und *Lachnospiraceae* nachgewiesen werden. Da beide Gruppen einen ähnlichen Gewichtsverlust hatten, scheint die Methode, durch die der Gewichtsverlust hervorgerufen wurde (Kalorienrestriktion vs.

RYGB), ursächlich für die Unterschiede im Mikrobiom zu sein. Eine randomisierte, klinische Pilotstudie, die die unterschiedlichen Ausprägungen des Mikrobioms nach 10%igem Gewichtsverlust durch medikamentös-induziertem Gewichtsverlust (i), Gewichtsverlust durch RYGB (ii) und Gewichtsverlust durch verstellbares Magenband (iii) miteinander verglich, kam zu einem ähnlichen Ergebnis [164]. Auch im Tiermodell mit diabetischen Zucker diabetic fatty (ZDF) Ratten konnte bereits nachgewiesen werden, dass es Unterschiede in der mikrobiotischen Zusammensetzung gab, je nachdem ob ein RYGB oder eine Schlauchmagenoperation durchgeführt wurde, bei insgesamt ähnlichen Verbesserungen in Bezug auf die Glukosekontrolle [165]. Die Interpretation dieser Ergebnisse lässt die Hypothese zu, dass die Änderungen des Mikrobioms weitestgehend unabhängig vom Gewichtsverlust sind. Weitere translationale Forschung ist notwendig, um die Rolle des Mikrobioms auf den humanen Metabolismus weiter spezifizieren zu können.

Abschließend bleibt anzumerken, dass bei der Interpretation der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gewisse Limitationen und Besonderheiten zu berücksichtigen sind. Der RYGB bei der Ratte ist sehr gut etabliert und ergibt einen äußerst robusten Phänotyp. Auch wenn die in diesem Versuch verwendeten Zucker Ratten (fa/fa) als äußerst geeignet gelten für Untersuchungen des metabolischen Syndroms im Allgemeinen und Insulinresistenz im Speziellen, entwickeln die Tiere keinen progressiven Diabetes. Hierdurch könnten etwaige antidiabetische Effekte maskiert worden sein [98, 166]. Zudem könnte eine Verlängerung des postoperativen Versuchszeitraums weitere signifikante Ergebnisse herbeiführen, und möglicherweise wurden einige Effekte wegen einer zu niedrigen Power (sprich einer zu geringen Gruppengröße) nicht detektiert. Zuletzt müssen noch speziesspezifische Unterschiede genannt werden, die eine Vergleichbarkeit zur humanen Situation möglicherweise einschränken.

Die vorliegende Arbeit bietet eine deskriptive Analyse der metabolischen Veränderungen nach RYGB bei Zucker Ratten (fa/fa). Durch die longitudinale Untersuchung von Faeces und Urin, sowie des systemischen und des portalvenösen Blutplasmas bei Versuchsende wurden eine große Anzahl von Daten gewonnen. Chirurgie-spezifische, köpergewichtungsverlustunabhängige Effekte zeigten sich durch den Vergleich mit einer Kontrollgruppe (Sham-BWM). So konnten Hypothesen generiert

werden, welche Metabolite oder welche Bakterienfamilien ursächlich sein könnten für die positiven Effekte der metabolisch-bariatrischen Chirurgie in Bezug auf Adipositas und glykämische Kontrolle. In Zukunft könnten Tiermodelle mit enteralen oder zerebralen Mikrokathetern dabei helfen, kausale Zusammenhänge zu identifizieren, um so sichere und effektive medikamentöse Behandlungsoptionen alternativ zur Chirurgie zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Die Adipositas ist durch ihre hohe Inzidenz und Assoziation mit Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2 eine bedeutende ökonomische sowie epidemiologische Herausforderung. Der Roux-en-Y Magenbypass (RYGB) ist der konservativen Therapie in den primären Endpunkten Gewichtsverlust, kardiovaskuläre Mortalität sowie Diabetesremission deutlich überlegen. Gewichtsreduktion, Malabsorption und Nahrungsrestriktion als Erklärungen werden zunehmend entkräftet, und es rücken komplexe, noch nicht ausreichend verstandene, physiologische Mechanismen in den wissenschaftlichen Fokus, die nach RYGB zur Genesung führen sollen. Vorliegend wurde ein etabliertes Tiermodell mit Zucker Ratten (fa/fa) verwendet, um postoperative, gewichtsverlustunabhängige metabolische Effekte des RYGB zu ermitteln und Hypothesen zu generieren. Die RYGB Gruppe zeigte einen typischen Phänotyp mit deutlichem Gewichtsverlust sowie einer verbesserten Glukosekontrolle im oralen Glukosetoleranztest. Nach RYGB konnten spezifische, gewichtsverlustunabhängige Veränderungen der globalen Metabolite in den Faeces sowie im Urin, eine verminderte bakterielle Fermentierung von Nährstoffen sowie eine Erhöhung des Cholin Metabolismus gemessen werden. Beim Vergleich von portalvenösem und systemischem Plasma zeigte sich eine verringerte enterale Absorption von Cholin, aromatischer Aminosäuren sowie kurzkettiger Fettsäuren als Folge des RYGB. Im intestinalen Mikrobiom wurden *Coriobacteriaceae* postoperativ in der RYGB Gruppe vermehrt nachgewiesen und könnten einen wichtigen Faktor für die verbesserte Glukosekontrolle nach metabolisch-bariatrischer Chirurgie darstellen. Die neuroaktive Substanz γ -Aminobuttersäure (GABA) war fäkal nach RYGB vermehrt nachweisbar und stellt einen weiteren potenziellen Mediator für einen Bypass-spezifischen Effekt dar. Die RYGB Gruppe zeigte im Vergleich zu den Sham Gruppen die niedrigsten Konzentrationen systemischer und portalvenöser Gallensäuren, sodass der Einfluss der zirkulierenden Gallensäuren auf die Verbesserung des Diabetes nach RYGB bislang womöglich überschätzt wurde. In der Sham-BWM Gruppe war Propionat im portalvenösen Plasma erhöht, sodass die verbesserte Glukosekontrolle durch Nahrungsrestriktion unter anderem durch diese kurzkettige Fettsäure induziert werden könnte. Vorliegende Ergebnisse zeigen, wie dynamisch und komplex die Effekte des RYGB und der Nahrungsrestriktion sind. Die genauen Mechanismen nach metabolisch-bariatrischer Operation, die zu dem therapeutischen Effekt führen, bleiben weiterhin unklar, sodass es weiterer Studien bedarf, um kausale Zusammenhänge nachzuweisen.

6 Angabe des Eigenanteils

Die Etablierung des Tiermodells am Standort Würzburg, d.h. die Versuchsplanung und Durchführung der in vivo Experimente, wurde eigenständig durchgeführt. Dazu gehörte unter anderem die Versorgung der Versuchstiere, die Durchführung der Scheinoperationen und des oralen Glukosetoleranztests sowie die Akquirierung des gesamten Probenmaterials (Faeces, Urin, Plasma). Die Proben wurden nach London, Imperial College, gesandt, wo sie von unseren Kooperationspartnern prozessiert, analysiert, sowie statistisch ausgewertet wurden (Abbildungen 13 bis 23). Die Datenauswertung zu den Abbildungen 6 bis 12 wurde selbst durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

1. Must, A., et al., *The disease burden associated with overweight and obesity*. JAMA, 1999. **282**(16): p. 1523-9.
2. Prentice, A.M., *The emerging epidemic of obesity in developing countries*. Int J Epidemiol, 2006. **35**(1): p. 93-9.
3. Mathers, C., G. Stevens, and M. Mascarenhas, *Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks*. 2009: World Health Organization.
4. WHO, *Fact sheet - Obesity and overweight*. 2020.
5. Webber, L., et al., *The future burden of obesity-related diseases in the 53 WHO European-Region countries and the impact of effective interventions: a modelling study*. BMJ open, 2014. **4**(7).
6. Swinburn, B.A., et al., *The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 804-14.
7. Malik, V.S., et al., *Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk*. Circulation, 2010. **121**(11): p. 1356-1364.
8. Flegal, K.M., et al., *Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis*. Jama, 2013. **309**(1): p. 71-82.
9. Ng, M., et al., *Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2014.
10. Wang, Y.C., et al., *Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK*. Lancet, 2011. **378**(9793): p. 815-25.
11. *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“*. 2014.
12. Gellner, R. and W. Domschke, *Epidemiologie der Adipositas*. Der Chirurg, 2008. **79**(9): p. 807-818.
13. Padwal, R.S., et al., *Using the Edmonton obesity staging system to predict mortality in a population-representative cohort of people with overweight and obesity*. Cmaj, 2011. **183**(14): p. E1059-E1066.
14. Sharma, A.M. and R.F. Kushner, *A proposed clinical staging system for obesity*. International journal of obesity, 2009. **33**(3): p. 289-295.

15. Chiappetta, S., et al., *Prävention weiter vorantreiben*. Deutsches Ärzteblatt, 2016. **113**: p. 975-978.
16. *S3-Leitlinie: Chirurgie der Adipositas und metabolischer Erkrankungen*. 2018.
17. Weyer, C., et al., *Energy metabolism after 2 y of energy restriction: the biosphere 2 experiment*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(4): p. 946-53.
18. Diabetes Prevention Program Research, G., *The Diabetes Prevention Program (DPP): description of lifestyle intervention*. Diabetes Care, 2002. **25**(12): p. 2165-71.
19. Look, A.R.G., *Eight-year weight losses with an intensive lifestyle intervention: the look AHEAD study*. Obesity (Silver Spring), 2014. **22**(1): p. 5-13.
20. Kushner, R.F., *Weight loss strategies for treatment of obesity*. Prog Cardiovasc Dis, 2014. **56**(4): p. 465-72.
21. Tchang, B.G., R.B. Kumar, and L.J. Aronne, *Pharmacologic Treatment of Overweight and Obesity in Adults*, in *Endotext [Internet]*. 2020, MDText. com, Inc.
22. Rucker, D., et al., *Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis*. BMJ, 2007. **335**(7631): p. 1194-9.
23. Bray, G.A. and D.H. Ryan, *Update on obesity pharmacotherapy*. Ann N Y Acad Sci, 2014. **1311**: p. 1-13.
24. Yanovski, S.Z. and J.A. Yanovski, *Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review*. JAMA, 2014. **311**(1): p. 74-86.
25. Pi-Sunyer, X., et al., *A randomized, controlled trial of 3.0 mg of liraglutide in weight management*. New England Journal of Medicine, 2015. **373**(1): p. 11-22.
26. Rose, F., S. Bloom, and T. Tan, *Novel approaches to anti-obesity drug discovery with gut hormones over the past 10 years*. Expert opinion on drug discovery, 2019. **14**(11): p. 1151-1159.
27. Farag, Y.M. and M.R. Gaballa, *Diabetes: an overview of a rising epidemic*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(1): p. 28-35.
28. Cho, N.H., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. Diabetes Res Clin Pract, 2018. **138**: p. 271-281.
29. Petersmann, A., et al., *Definition, klassifikation und diagnostik des diabetes mellitus*. Der Diabetologe, 2020. **16**(3): p. 247-253.
30. Bahrman, A., et al., *S2k-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Alter*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2018. **13**(05): p. 423-489.
31. Landgraf, R., et al., *Therapie des Typ-2-Diabetes*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2020. **15**(S 01): p. S65-S92.
32. Saber, A.A., M.H. Elgamal, and M.K. McLeod, *Bariatric surgery: the past, present, and future*. Obes Surg, 2008. **18**(1): p. 121-8.
33. Angrisani, L., et al., *Bariatric Surgery Worldwide 2013*. Obes Surg, 2015. **25**(10): p. 1822-32.
34. Phillips, B.T. and S.A. Shikora, *The history of metabolic and bariatric surgery: development of standards for patient safety and efficacy*. Metabolism, 2018. **79**: p. 97-107.
35. Schauer, P.R., et al., *Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes—5-year outcomes*. N Engl J Med, 2017. **376**: p. 641-651.
36. Adams, T.D., et al., *Weight and metabolic outcomes 12 years after gastric bypass*. N Engl J Med, 2017. **377**: p. 1143-1155.
37. Mingrone, G., et al., *Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial*. Lancet, 2015. **386**(9997): p. 964-73.

38. Maciejewski, M.L., et al., *Bariatric surgery and long-term durability of weight loss*. JAMA surgery, 2016. **151**(11): p. 1046-1055.
39. Rubino, F., et al., *The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism*. Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 236-42.
40. Thaler, J.P. and D.E. Cummings, *Minireview: Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2518-25.
41. Schauer, P.R., et al., *Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes*. N Engl J Med, 2012. **366**(17): p. 1567-76.
42. Fried, M., et al., *Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery*. Obes Surg, 2014. **24**(1): p. 42-55.
43. Rubino, F., et al., *Metabolic Surgery in the Treatment Algorithm for Type 2 Diabetes: A Joint Statement by International Diabetes Organizations*. Diabetes Care, 2016. **39**(6): p. 861-77.
44. Seeley, R.J., A.P. Chambers, and D.A. Sandoval, *The role of gut adaptation in the potent effects of multiple bariatric surgeries on obesity and diabetes*. Cell metabolism, 2015. **21**(3): p. 369-378.
45. Dixon, J.B., et al., *Bariatric surgery for type 2 diabetes*. Lancet, 2012. **379**(9833): p. 2300-11.
46. Liou, A.P., et al., *Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity*. Sci Transl Med, 2013. **5**(178): p. 178ra41.
47. Peterli, R., et al., *Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial*. Obes Surg, 2012. **22**(5): p. 740-8.
48. le Roux, C.W., et al., *Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters*. Annals of surgery, 2006. **243**(1): p. 108.
49. Pournaras, D.J., et al., *Remission of type 2 diabetes after gastric bypass and banding: mechanisms and 2 year outcomes*. Annals of surgery, 2010. **252**(6): p. 966-971.
50. Sonne, D.P., M. Hansen, and F.K. Knop, *Bile acid sequestrants in type 2 diabetes: potential effects on GLP-1 secretion*. Eur J Endocrinol, 2014.
51. Kumar, D.P., et al., *Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **427**(3): p. 600-5.
52. Ryan, K.K., et al., *FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy*. Nature, 2014. **509**(7499): p. 183-188.
53. Welbourn, R., et al., *Bariatric surgery worldwide: baseline demographic description and one-year outcomes from the fourth IFSO global registry report 2018*. Obesity surgery, 2019. **29**(3): p. 782-795.
54. Torres, J., C. Oca, and R. Garrison, *Gastric bypass: Roux-en-Y gastrojejunostomy from the lesser curvature*. Southern medical journal, 1983. **76**(10): p. 1217-1221.
55. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body*. PLoS biology, 2016. **14**(8): p. e1002533.
56. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS biol, 2007. **5**(7): p. e177.
57. Rodríguez, J.M., et al., *The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life*. Microbial ecology in health and disease, 2015. **26**(1): p. 26050.

58. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. Biochemical Journal, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.
59. Patterson, E., et al., *Gut microbiota, obesity and diabetes*. Postgraduate Medical Journal, 2016. **92**(1087): p. 286-300.
60. Nicholson, J.K., et al., *Host-gut microbiota metabolic interactions*. Science, 2012. **336**(6086): p. 1262-7.
61. Ley, R.E., et al., *Human gut microbes associated with obesity*. nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-1023.
62. Tan, H., Q. Zhai, and W. Chen, *Investigations of Bacteroides spp. towards next-generation probiotics*. Food Research International, 2019. **116**: p. 637-644.
63. Arora, T. and F. Bäckhed, *The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives*. Journal of internal medicine, 2016. **280**(4): p. 339-349.
64. Vrieze, A., et al., *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 913-916. e7.
65. Wahlstrom, A., et al., *Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism*. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 41-50.
66. Seyfried, F., I. Hering, and M. Hankir, *Mikrobiom und metabolische/bariatrische Chirurgie*. Adipositas-Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie, 2019. **13**(04): p. 214-221.
67. Guo, Y., et al., *Modulation of the gut microbiome: a systematic review of the effect of bariatric surgery*. European journal of endocrinology, 2018. **178**(1): p. 43-56.
68. Tremaroli, V., et al., *Roux-en-Y gastric bypass and vertical banded gastroplasty induce long-term changes on the human gut microbiome contributing to fat mass regulation*. Cell metabolism, 2015. **22**(2): p. 228-238.
69. West, K.A., et al., *Longitudinal metabolic and gut bacterial profiling of pregnant women with previous bariatric surgery*. Gut, 2020.
70. Li, J.V., et al., *Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk*. Gut, 2011. **60**(9): p. 1214-23.
71. Spinelli, V., et al., *Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans*. International journal of obesity, 2016. **40**(8): p. 1260-1267.
72. Wei, M., et al., *Bile acid profiles within the enterohepatic circulation in a diabetic rat model after bariatric surgeries*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2018. **314**(5): p. G537-G546.
73. Jordan, K.W., et al., *Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy*. Diseases of the colon and rectum, 2009. **52**(3): p. 520.
74. Simonen, M., et al., *Conjugated bile acids associate with altered rates of glucose and lipid oxidation after Roux-en-Y gastric bypass*. Obes Surg, 2012. **22**(9): p. 1473-80.
75. Patti, M.E., et al., *Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism*. Obesity (Silver Spring), 2009. **17**(9): p. 1671-7.
76. Steinert, R.E., et al., *Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery: A 1-year prospective randomized pilot trial*. Obesity, 2013. **21**(12): p. E660-E668.
77. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades*. J Lipid Res, 2014. **55**(8): p. 1553-95.

78. Neubauer, E., *Dehydrocholsäure, ein wirksames, praktisch ungiftiges Glied der Gallensäuregruppe*. Journal of Molecular Medicine, 1923. **2**(23): p. 1065-1067.
79. Stellaard, F., et al., *Simultaneous determination of cholic acid and chenodeoxycholic acid pool sizes and fractional turnover rates in human serum using ¹³C-labeled bile acids*. J Lipid Res, 1984. **25**(12): p. 1313-9.
80. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation*. Physiological reviews, 2009. **89**(1): p. 147-191.
81. Hofmann, A.F., *Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts*. Annals of hepatology, 2007. **6**(1): p. 15-27.
82. Makishima, M., et al., *Identification of a nuclear receptor for bile acids*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1362-5.
83. Zhang, Y., et al., *Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 1006-11.
84. Hylemon, P.B., et al., *Bile acids as regulatory molecules*. Journal of lipid research, 2009. **50**(8): p. 1509-1520.
85. Watanabe, M., et al., *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 484-9.
86. Pols, T.W., et al., *TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading*. Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 747-57.
87. Penney, N., et al., *The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: a systematic review*. International journal of obesity, 2015. **39**(11): p. 1565.
88. Ahlin, S., et al., *Bile acid changes after metabolic surgery are linked to improvement in insulin sensitivity*. British Journal of Surgery, 2019. **106**(9): p. 1178-1186.
89. Taoka, H., et al., *Role of bile acids in the regulation of the metabolic pathways*. World J Diabetes, 2016. **7**(13): p. 260-70.
90. Thomas, C., et al., *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. Cell Metab, 2009. **10**(3): p. 167-77.
91. Miras, A. and C. Le Roux, *Can medical therapy mimic the clinical efficacy or physiological effects of bariatric surgery?* International journal of obesity, 2014. **38**(3): p. 325-333.
92. Arble, D.M., D.A. Sandoval, and R.J. Seeley, *Mechanisms underlying weight loss and metabolic improvements in rodent models of bariatric surgery*. Diabetologia, 2015. **58**(2): p. 211-20.
93. Kohli, R., et al., *A surgical model in male obese rats uncovers protective effects of bile acids post-bariatric surgery*. Endocrinology, 2013. **154**(7): p. 2341-51.
94. Chambers, A.P., et al., *Weight-independent changes in blood glucose homeostasis after gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in rats*. Gastroenterology, 2011. **141**(3): p. 950-8.
95. Sandoval, D., *Bariatric surgeries: beyond restriction and malabsorption*. Int J Obes (Lond), 2011. **35 Suppl 3**: p. S45-9.
96. Kirchner, H., A. Guijarro, and M.M. Meguid, *Is a model useful in exploring the catabolic mechanisms of weight loss after gastric bypass in humans?* Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2007. **10**(4): p. 463-474.
97. Seyfried, F., C.W. le Roux, and M. Bueter, *Lessons learned from gastric bypass operations in rats*. Obes Facts, 2011. **4 Suppl 1**: p. 3-12.
98. Kasiske, B.L., M.P. O'Donnell, and W.F. Keane, *The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury*. Hypertension, 1992. **19**(1 Suppl): p. I110-5.

99. Seyfried, F., et al., *Urinary phenotyping indicates weight loss-independent metabolic effects of Roux-en-Y gastric bypass in mice*. J Proteome Res, 2013. **12**(3): p. 1245-53.
100. Wishart, D.S., et al., *HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018*. Nucleic acids research, 2018. **46**(D1): p. D608-D617.
101. Cloarec, O., et al., *Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic 1H NMR data sets*. Analytical chemistry, 2005. **77**(5): p. 1282-1289.
102. Sarafian, M.H., et al., *Bile acid profiling and quantification in biofluids using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Anal Chem, 2015. **87**(19): p. 9662-70.
103. Caporaso, J.G., et al., *Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms*. The ISME journal, 2012. **6**(8): p. 1621-1624.
104. Parks, D.H., et al., *STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles*. Bioinformatics, 2014. **30**(21): p. 3123-3124.
105. Ward, Z.J., et al., *Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity*. N Engl J Med, 2019. **381**(25): p. 2440-2450.
106. Rubino, F. and J. Marescaux, *Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease*. Ann Surg, 2004. **239**(1): p. 1-11.
107. Abdeen, G. and C. Le Roux, *Mechanism underlying the weight loss and complications of Roux-en-Y gastric bypass. Review*. Obesity surgery, 2016. **26**(2): p. 410-421.
108. le Roux, C.W., et al., *Gastric bypass reduces fat intake and preference*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(4): p. R1057-66.
109. Liu, H., et al., *Role of gut microbiota, bile acids and their cross-talk in the effects of bariatric surgery on obesity and type 2 diabetes*. Journal of diabetes investigation, 2018. **9**(1): p. 13-20.
110. Arora, T., et al., *Diabetes-associated microbiota in fa/fa rats is modified by Roux-en-Y gastric bypass*. The ISME journal, 2017. **11**(9): p. 2035-2046.
111. Bakken, J.S., et al., *Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(12): p. 1044-9.
112. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 946-53.
113. Alang, N. and C.R. Kelly, *Weight gain after fecal microbiota transplantation*. Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(1): p. ofv004.
114. de Clercq, N.C., et al., *Weight gain after fecal microbiota transplantation in a patient with recurrent underweight following clinical recovery from anorexia nervosa*. Psychotherapy and psychosomatics, 2019. **88**(1): p. 58-60.
115. Weingarden, A.R., et al., *Microbiota transplantation restores normal fecal bile acid composition in recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(4): p. G310-9.
116. Islam, K.B., et al., *Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats*. Gastroenterology, 2011. **141**(5): p. 1773-81.
117. Ridlon, J.M., et al., *Bile acids and the gut microbiome*. Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(3): p. 332-8.
118. Ridlon, J.M., D.J. Kang, and P.B. Hylemon, *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 241-59.

119. Graessler, J., et al., *Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters*. Pharmacogenomics J, 2013. **13**(6): p. 514-22.
120. Bueter, M., et al., *Roux-en-Y gastric bypass operation in rats*. J Vis Exp, 2012(64): p. e3940.
121. Seyfried, F., et al., *Gastric Bypass-Related Effects on Glucose Control, beta Cell Function and Morphology in the Obese Zucker Rat*. Obes Surg, 2016. **26**(6): p. 1228-36.
122. Jimenez, A., et al., *GLP-1 and glucose tolerance after sleeve gastrectomy in morbidly obese subjects with type 2 diabetes*. Diabetes, 2014. **63**(10): p. 3372-7.
123. Morishita, Y., *Effect of food restriction on caecal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in rats*. Microbial ecology in health and disease, 1995. **8**(2): p. 35-39.
124. Louis, P. and H.J. Flint, *Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota*. Environmental microbiology, 2017. **19**(1): p. 29-41.
125. Zarrinpar, A., et al., *Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism*. Nature communications, 2018. **9**(1): p. 1-13.
126. Furusawa, Y., et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 446-450.
127. Miller, G.D., B.J. Nicklas, and A. Fernandez, *Serial changes in inflammatory biomarkers after Roux-en-Y gastric bypass surgery*. Surgery for Obesity and Related Diseases, 2011. **7**(5): p. 618-624.
128. Tanca, A., et al., *Caloric restriction promotes functional changes involving short-chain fatty acid biosynthesis in the rat gut microbiota*. Scientific reports, 2018. **8**(1): p. 1-13.
129. Sa'ad, H., et al., *Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2010. **1801**(11): p. 1175-1183.
130. Chambers, E.S., et al., *Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults*. Gut, 2015. **64**(11): p. 1744-1754.
131. Kimura, I., et al., *Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41)*. Proceedings of the national academy of sciences, 2011. **108**(19): p. 8030-8035.
132. Minuk, G.Y., *Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by eight common bacterial pathogens*. Scandinavian journal of infectious diseases, 1986. **18**(5): p. 465-467.
133. Auteri, M., M.G. Zizzo, and R. Serio, *GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation*. Pharmacological research, 2015. **93**: p. 11-21.
134. Gameiro, A., et al., *The neurotransmitters glycine and GABA stimulate glucagon-like peptide-1 release from the GLUTag cell line*. The Journal of physiology, 2005. **569**(3): p. 761-772.
135. Jirapinyo, P., et al., *A meta-analysis of GLP-1 after Roux-en-Y gastric bypass: impact of surgical technique and measurement strategy*. Obesity surgery, 2018. **28**(3): p. 615-626.
136. Shimizu, H., et al., *Indoxyl sulfate enhances angiotensin II signaling through upregulation of epidermal growth factor receptor expression in vascular smooth muscle cells*. Life sciences, 2012. **91**(5-6): p. 172-177.
137. Owan, T., et al., *Favorable changes in cardiac geometry and function following gastric bypass surgery: 2-year follow-up in the Utah obesity study*. Journal of the American College of Cardiology, 2011. **57**(6): p. 732-739.

138. Benotti, P.N., et al., *Gastric bypass surgery produces a durable reduction in cardiovascular disease risk factors and reduces the long-term risks of congestive heart failure*. Journal of the American Heart Association, 2017. **6**(5): p. e005126.
139. Wirbel, J., et al., *Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer*. Nature medicine, 2019. **25**(4): p. 679-689.
140. Thomas, A.M., et al., *Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation*. Nature medicine, 2019. **25**(4): p. 667-678.
141. McNabney, S.M. and T.M. Henagan, *Short chain fatty acids in the colon and peripheral tissues: a focus on butyrate, colon cancer, obesity and insulin resistance*. Nutrients, 2017. **9**(12): p. 1348.
142. Tao, W., et al., *Colon and rectal cancer risk after bariatric surgery in a multicountry Nordic cohort study*. International Journal of Cancer, 2020. **147**(3): p. 728-735.
143. Derogar, M., et al., *Increased risk of colorectal cancer after obesity surgery*. Annals of surgery, 2013. **258**(6): p. 983-988.
144. Adams, T.D., et al., *Cancer incidence and mortality after gastric bypass surgery*. Obesity, 2009. **17**(4): p. 796-802.
145. Mackenzie, H., et al., *Obesity surgery and risk of cancer*. British Journal of Surgery, 2018. **105**(12): p. 1650-1657.
146. Wu, Q., et al., *Metabolic phenotype-microRNA data fusion analysis of the systemic consequences of Roux-en-Y gastric bypass surgery*. International Journal of Obesity, 2015. **39**(7): p. 1126-1134.
147. Saeidi, N., et al., *Reprogramming of intestinal glucose metabolism and glycemic control in rats after gastric bypass*. Science, 2013. **341**(6144): p. 406-410.
148. She, P., et al., *Obesity-related elevations in plasma leucine are associated with alterations in enzymes involved in branched-chain amino acid metabolism*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2007. **293**(6): p. E1552-E1563.
149. Newgard, C.B., et al., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*. Cell metabolism, 2009. **9**(4): p. 311-326.
150. Pournaras, D.J., et al., *The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control*. Endocrinology, 2012. **153**(8): p. 3613-9.
151. Flynn, C.R., et al., *Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7715.
152. Lindqvist, A., et al., *The impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on normal metabolism in a porcine model*. PloS one, 2017. **12**(3): p. e0173137.
153. de Siqueira Cardinelli, C., et al., *Fecal bile acid profile after Roux-en-Y gastric bypass and its association with the remission of type 2 diabetes in obese women: a preliminary study*. Clinical nutrition, 2019. **38**(6): p. 2906-2912.
154. Chavez-Talavera, O., et al., *Roux-en-Y gastric bypass increases systemic but not portal bile acid concentrations by decreasing hepatic bile acid uptake in minipigs*. Int J Obes (Lond), 2017. **41**(4): p. 664-668.
155. Duboc, H., et al., *Roux-en-Y Gastric-Bypass and sleeve gastrectomy induces specific shifts of the gut microbiota without altering the metabolism of bile acids in the intestinal lumen*. International Journal of Obesity, 2019. **43**(2): p. 428-431.
156. Hao, Z., et al., *Roux-en-Y gastric bypass surgery-induced weight loss and metabolic improvements are similar in TGR5-deficient and wildtype mice*. Obesity surgery, 2018. **28**(10): p. 3227-3236.

157. Chen, L., et al., *Inhibition of apical sodium-dependent bile acid transporter as a novel treatment for diabetes*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2012.
158. Smushkin, G., et al., *The effect of a bile acid sequestrant on glucose metabolism in subjects with type 2 diabetes*. Diabetes, 2013. **62**(4): p. 1094-1101.
159. Pean, N., et al., *The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice*. Hepatology, 2013. **58**(4): p. 1451-60.
160. Brighton, C.A., et al., *Bile Acids Trigger GLP-1 Release Predominantly by Accessing Basolaterally Located G Protein-Coupled Bile Acid Receptors*. Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3961-70.
161. Gerhard, G.S., et al., *A role for fibroblast growth factor 19 and bile acids in diabetes remission after Roux-en-Y gastric bypass*. Diabetes Care, 2013. **36**(7): p. 1859-64.
162. Zheng, X., S. Wang, and W. Jia, *Calorie restriction and its impact on gut microbial composition and global metabolism*. Frontiers of medicine, 2018. **12**(6): p. 634-644.
163. Liu, H., et al., *The family Coriobacteriaceae is a potential contributor to the beneficial effects of Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes*. Surgery for Obesity and Related Diseases, 2018. **14**(5): p. 584-593.
164. Lee, C.J., et al., *Changes in gut microbiome after bariatric surgery versus medical weight loss in a pilot randomized trial*. Obesity Surgery, 2019. **29**(10): p. 3239-3245.
165. Guo, Y., et al., *Gut microbiota after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy in a diabetic rat model: Increased diversity and associations of discriminant genera with metabolic changes*. Diabetes/metabolism research and reviews, 2017. **33**(3): p. e2857.
166. Meirelles, K., et al., *Mechanisms of glucose homeostasis after Roux-en-Y gastric bypass surgery in the obese, insulin-resistant Zucker rat*. Ann Surg, 2009. **249**(2): p. 277-85.

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

AUC: Area under the curve

BCAA: Branched chain amino acids (verzweigt-kettige Aminosäuren)

BMI: body-mass-index, Körpermasseindex

BWM: body-weight-matched (hier: körperrgewichtsangepasst an RYGB Gruppe)

FXR: farnesoid X Rezeptor

GABA: γ -Aminobuttersäure

GLP-1: Glucagon-like Peptide-1

ILI: Intensive Life-Style Intervention

NMR: Nukleare Magnetresonanz

oGTT: oraler Glukosetoleranztest

O-PLS-DA: orthogonal signal correction-projection to latent structures-discriminant analysis

PCA: principal component analysis (Hauptkomponentenanalyse)

PYY: Peptid YY

RYGB: Roux-en-Y gastric bypass (Roux-en-Y Magenbypass)

SCFA: short-chain fatty acids (kurzkettige Fettsäuren)

T2DM: Typ 2 Diabetes mellitus

TGR-5: G-protein gekoppelter Gallensäurerezeptor

TSP: 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d₄-säure-Natriumsalz

UPLC-MS: Ultra-Performance Liquid Chromatography-mass spectrometry

WHO: World Health Organization

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. L. Rotzinger): a) Magen-Darm-Anatomie physiologisch b) Magen-Darm-Anatomie nach RYGB.....	8
Abbildung 2: Experimentelles Design der Arbeit. Die durchgeführten Messungen bzw. Abnahmen sind jeweils mit einem Punkt markiert.....	13
Abbildung 3: Stoffwechselfähig zur Asservierung von Faeces und Urin.	17
Abbildung 4 (mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. L. Rotzinger): Situs während der terminalen Anästhesie mit Punktion der V. cava inferior und V. portae	19
Abbildung 5: Beispielhafter O-PLS-DA Plot. Die Urinspektren von Mäusen (C57BL/6 (H-2b)) wurden paarweise verglichen. In der oberen Zeile RYGB und Sham ad. lib. Gruppe; in der unteren Zeile RYGB und Sham-BWM Gruppe. Nachdruck mit Erlaubnis von Seyfried et al. "Urinary Phenotyping Indicates Weight Loss-Independent Metabolic Effects of Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice"; Journal of Proteome Research 2013 [100]. Copyright 2013 American Chemical Society.....	22
Abbildung 6: Durchschnittliches Körpergewicht der Gruppen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).....	26
Abbildung 7: Durchschnittliche Nahrungsaufnahme der Gruppen. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).....	27
Abbildung 8: Energiegehalt der Faeces. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM).....	28
Abbildung 9: Glukosekonzentrationen während des oGTT. RYGB (blau), Sham ad lib. (rot) und Sham-BWM (grün) Gruppen werden unterschieden. * zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham-BWM (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$). ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^ $p < .001$). # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM und Sham (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." Gut microbes 13.1 (2021): 1-20.	29
Abbildung 10: Area under the curve (AUC) von Glukose während des oGTT, ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham ad lib. (rot) (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^ $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." Gut microbes 13.1 (2021): 1-20.	30

- Abbildung 11: Insulinkonzentrationen während des oGTTs. RYGB (blau), Sham ad lib. (rot) und Sham-BWM (grün) Gruppen werden unterschieden. * zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham-BWM (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$). ^ zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen RYGB und Sham ad lib. (^ $p < .05$; ^^ $p < .01$; ^^^ $p < .001$). # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM und Sham ad lib. (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 31
- Abbildung 12: AUC von Insulin während des oGTT. # zeigt die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Sham-BWM (grün) und Sham ad lib. (rot) Gruppe (# $p < .05$; ## $p < .01$; ### $p < .001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 32
- Abbildung 13: PCA trajectory scores Plot von Faeces (A). Es werden RYGB Gruppe (blau), Sham-BWM Gruppe (grün) und Sham ad libitum (rot) Gruppe unterschieden. Die Zeitpunkte werden wie folgt unterschieden: Präoperativ (Viereck), 1. (Dreieck), 2. (Raute) und 4. (Kreis) postoperative Woche. Jeder Punkt zeigt den Durchschnitt der ersten bzw. zweiten Hauptkomponente (PC1 und PC2) an. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Eine Heatmap von veränderten Metaboliten in den Faeces (B) zeigt die Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und der Sham (linke Spalte; OvsR) bzw. Sham-BWM (rechte Spalte; BvsR) Gruppe. Der Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, +, # und ^ stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$ zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, welche durch einen zweiseitigen t-test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 34

Abbildung 14: PCA trajectory scores Plot von Urin (A). Es werden RYGB Gruppe (blau), Sham-BWM Gruppe (grün) und Sham ad libitum (rot) Gruppe unterschieden. Die Zeitpunkte werden wie folgt unterschieden: Präoperativ (Viereck), 1. (Dreieck), 2. (Raute) und 4. (Kreis) postoperative Woche. Jeder Punkt zeigt den Durchschnitt der ersten bzw. zweiten Hauptkomponente (PC1 und PC2) an. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. Eine Heatmap von veränderten Metaboliten im Urin (B) zeigt die Unterschiede zwischen der RYGB Gruppe und der Sham (linke Spalte; OvsR) bzw. Sham-BWM (rechte Spalte; BvsR) Gruppe. Der Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, +, # und ^ stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ und $p < 0,0001$ zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, welche durch einen zweiseitigen t-test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 36

Abbildung 15: A-C zeigen PCA score Plots der ^1H NMR Spektroskopie von systemischem (Kreis) sowie portalvenösem (Dreieck) Blut 4 Wochen nach OP. Es werden RYGB (blau), Sham-BWM (grün) und Sham (rot) Gruppe unterschieden. D zeigt eine Heatmap der veränderten Metabolite systemisch (s) sowie portalvenös (p) in den jeweiligen Vergleichen der Gruppen bzw. in dem Vergleich zwischen portalvenösem und systemischem Blut der RYGB Gruppe. Der Korrelationskoeffizient r wurde durch OPLS-DA ermittelt. Rot und blau zeigen höhere bzw. niedrigere Konzentrationen in der RYGB Gruppe bzw. im portalvenösen Blut der RYGB Gruppe an. Die Zeichen *, + und # stehen für die Signifikanzniveaus $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$, welche durch einen zweiseitigen t-test mit Benjamin-Hochberg Korrektur ermittelt wurden. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 38

Abbildung 16: Signifikante Unterschiede der Gallensäuren in portalvenösem Blut zwischen den einzelnen Gruppen (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t-test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Durch * wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham-BWM Gruppe angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$); durch ^ wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham Gruppe angezeigt (^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,001$; ^^ ^ $p < 0,0001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 39

- Abbildung 17: Signifikante Unterschiede der Gallensäuren in systemischem Blut zwischen den einzelnen Gruppen (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t-test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Durch * wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham-BWM Gruppe angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$); durch ^ wird die statistische Signifikanz zwischen RYGB und Sham Gruppe angezeigt (^ $p < 0,05$; ^^ $p < 0,001$; ^^[^] $p < 0,0001$). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 40
- Abbildung 18: A-C zeigen die signifikant unterschiedlichen Gallensäurenspiegel der Sham (A), Sham-BWM (B) und RYGB Gruppe (C), wenn systemisches mit portalvenösem Blut verglichen wurde (Signifikanz bei $p < 0,05$ durch multiplen t-test mit FDR Korrektur). Die Balken zeigen den Mittelwert mit Standardabweichung. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 42
- Abbildung 19: Alpha-Diversität des intestinalen Mikrobioms der Sham-BWM (grün), RYGB (blau) und Sham ad lib (rot) Gruppe zu drei verschiedenen Zeitpunkten (präoperativ, 1. Woche postoperativ und 4. Woche postoperativ). Der Wilcoxon Test wurde angewendet. Die Mittellinien repräsentieren den Medianwert. Das obere bzw. untere Ende der Boxen repräsentiert die 25. bzw 75. Perzentile. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 44
- Abbildung 20: NMDS Plot bezüglich der Nachweise der Bakterien in den Faeces der einzelnen Gruppen (RYGB, Sham ad lib. und Sham-BWM) und bezogen auf die Zeit (präoperativ, 1. und 4. Woche postoperativ). Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 45
- Abbildung 21 A-H: Box Plots mit signifikanten Veränderungen über die drei Zeitpunkte präoperativ, 1. und 4. Woche postoperativ. Coriobacteriaceae (A) und Lachnospiraceae (B) in der Sham-BWM Gruppe. Coriobacteriaceae (C), Enterococcaceae (D), Lactobacillaceae (E), Peptostreptococcaceae (F), Ruminocoaccaceae (G) und Streptococcaceae (H) in der RYGB Gruppe. Es wurden der Kruskal-Wallis H-Test sowie der Tukey-Kramer post-hoc verwendet und die Benjamin-Hochberg FDR zur Testkorrektur angewandt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 46

Abbildung 22: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen in spezifischen Bakterienfamilien zwischen der Sham-BWM und der RYGB Gruppe in der 1. und 4. postoperativen Woche. Die Statistik wurde mittels White's nichtparametrischem T-Test und nachfolgender zweiseitiger, multipler Benjamin-Hochberg FDR Korrektur durchgeführt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20..... 47

Abbildung 23: Balkendiagramme der signifikanten Veränderungen in spezifischen Bakterienfamilien zwischen der Sham ad libitum und der RYGB Gruppe in der 1. und 4. postoperativen Woche. Die Statistik wurde mittels White's nichtparametrischem T-Test und nachfolgender zweiseitiger, multipler Benjamin-Hochberg FDR Korrektur durchgeführt. Abb. aus: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20..... 48

Abbildung 24: Schematische Darstellung der metabolomischen Veränderungen in der RYGB im Vergleich zur Sham-BWM Gruppe. Rot zeigt erhöhte Konzentrationen und blau zeigt erniedrigte Konzentrationen in den jeweiligen Kompartimenten (Darmlumen, system. und portalven. Blut, Urin) der RYGB Tiere an. Abb. modifiziert nach: Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." *Gut microbes* 13.1 (2021): 1-20. 54

Abbildungen 9-24 sind aus der Publikation *Seyfried, F., et al. "Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss." Gut microbes 13.1 (2021): 1-20.* übernommen.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gewichtsklassifikation nach BMI beim Erwachsenen 2

Tabelle 2: EOSS Klassifizierung 3

Tabelle 3: Versuchsgruppen 14

Tabelle 4: Workflow der Kernspinresonanzspektroskopie 21

IV Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. med. Florian Seyfried ohne dessen wissenschaftliche Ambition diese Dissertation nie entstanden wäre.

Herzlichen bedanken möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Jia V. Li, Maria Glymenaki und Jutarop Phetcharaburanin vom Imperial College London, UK.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. C. Otto und den Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie möchte ich mich für die kompetente fachliche Unterstützung bedanken.

Ein ausdrücklicher Dank gilt auch meiner Mitdoktorandin Dr. med. Laura Rotzinger für die stets humorvolle und produktive Zeit.

Ich bedanke mich besonders herzlich bei meiner geliebten Lebensgefährtin und unseren beiden reizenden Töchtern für die fortwährende Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso bedanke ich mich bei meinen Eltern, Geschwistern und Schwiegereltern in spe, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Abschließend möchte ich mich noch bei meinem guten Freund Jonathan bedanken, der mir mit seinem technischen Wissen eine große Hilfe war.

V Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

1. Bankoglu, E. E., Seyfried, F., Rotzinger, L., **Nordbeck, A.**, Corteville, C., Jurowich, C., ... & Stopper, H. (2016). Impact of weight loss induced by gastric bypass or caloric restriction on oxidative stress and genomic damage in obese Zucker rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 94, 208-217.
2. Seyfried, F., Miras, A. D., Rotzinger, L., **Nordbeck, A.**, Corteville, C., Li, J. V., ... & Jurowich, C. (2016). Gastric bypass-related effects on glucose control, β cell function and morphology in the obese zucker rat. *Obesity surgery*, 26(6), 1228-1236.
3. Seyfried, F., Phetcharaburanin, J., Glymenaki, M., **Nordbeck, A.**, Hankir, M., Nicholson, J. K., ... & Li, J. V. (2021). Roux-en-Y gastric bypass surgery in Zucker rats induces bacterial and systemic metabolic changes independent of caloric restriction-induced weight loss. *Gut microbes*, 13(1), 1-20.
4. Hankir, M. K., Rotzinger, L., **Nordbeck, A.**, Corteville, C., Dischinger, U., Knop, J. L., ... & Seyfried, F. (2021). Leptin Receptors Are Not Required for Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery to Normalize Energy and Glucose Homeostasis in Rats. *Nutrients*, 13(5), 1544.