

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung
Universität Hohenheim
Fachgebiet: Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Prof. Dr. R. Claus

**Erhöhung der Butyratbildung durch Fütterung von Resistenter Stärke beim Schwein:
Konsequenzen für die Mitose und Apoptoseregulation der Colomucosa**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Joachim Mentschel
aus Landshut
2004

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzuchtung
Universität Hohenheim
Fachgebiet: Tierhaltung und Leistungsphysiologie
Prof. Dr. R. Claus

**Erhöhung der Butyratbildung durch Fütterung von Resistenter Stärke beim Schwein:
Konsequenzen für die Mitose und Apoptoseregulation der Colonmucosa**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

vorgelegt

der Fakultät Agrarwissenschaften

von
Joachim Mentschel
aus Landshut
2004

Die vorliegende Arbeit wurde am 12.03.2004 von der Fakultät Agrarwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	25. März 2004
1. Prodekan:	Prof. Dr. K. Stahr
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. R. Claus
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. H. Schenkel
3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Mosenthin

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	Übersicht über den Verdauungsapparat des Schweines	2
2.1.1	Morphologische Grundlagen des Gastrointestinaltraktes und deren Besonderheiten	3
2.1.2	Morphologische Besonderheiten des Colons	4
2.1.2.1	Allgemeiner Wandbau des Colons	4
2.2	Aufgaben des Gastrointestinaltraktes	7
2.3	Verdauungsphysiologie des Dickdarms	9
2.3.1	Die Flora des Dickdarmes	9
2.3.2	Fermentationsprozesse im Dickdarm	9
2.3.2.1	Charakterisierung von Resistenter Stärke	9
2.3.3	Hauptprodukte der Fermentation im Colon	10
2.3.4	Definition von Praebiotika	12
2.3.5	Definition von Probiotika	12
2.3.6	Energetische Verwertung der SCFA	12
2.4	Funktionalität der Darmmucosa	13
2.4.1	Zellteilung: Mitose	14
2.4.1.1	Definition der Stammzellen	16
2.4.2	Differenzierung der Zellen	17
2.4.3	Reifung der Zellen	18
2.4.4	Apoptose	18
2.4.4.1	Morphologische Besonderheiten der Apoptose	19
2.4.4.2	Ablauf der Apoptose	21
2.4.4.3	Identifizierung apoptotischer Zellen	23
2.4.5	Rolle der Suppressorgene	24
2.4.5.1	Apoptoseregulierende Proteine: Bcl-2 Familie	25
2.4.5.2	Lokalisation von Mitgliedern der Bcl-2 Familie in der Zelle	28
2.4.5.3	Regulation und Rolle der Cytochrom c- Ausschüttung	28
2.4.5.4	Caspasen: Ausführer der Apoptose	29
2.5	Nutritive Beeinflussung	30
2.6	Butyrat und Apoptose	31
2.7	Zielsetzung	32
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Tierversuch	33
3.1.1	Versuchstiere	35
3.1.2	Verlegen des Venenverweilkatheters	35
3.1.3	Haltung der Tiere	36
3.1.4	Fütterung	36
3.1.4.1	Berechnung der Futterrationsration	37
3.1.5	Ablauf der Fütterung	39
3.1.6	Probenentnahme	40
3.1.6.1	Blutentnahme	40
3.1.6.2	Erfassung von Kotproben	40
3.1.6.3	Einschlafen der Tiere und Entnahme der Gewebeproben	41
3.2	Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben	42
3.2.1	Aufarbeitung für analytische Nachweismethoden	42

3.2.2	Fixation des Gewebes für Immunocytochemie	42
3.2.3	Fixation des Gewebes für Elektronenmikroskopie	42
3.2.4	Einbetten des Gewebes	43
3.3	Immunocytochemie	43
3.3.1	Durchführung der Immunocytochemie	43
3.3.2	Verwendete Reagenzien für die Immunocytochemie	43
3.3.3	Verwendete Antikörper	45
3.3.4	Apoptose- Nachweis	46
3.4	Auswertung der Gewebsschnitte	48
3.5	Analytische Methoden	50
3.5.1	Messung des pH- Wertes im Kot	50
3.5.2	Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA)	50
3.6	Statistik	50
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) im Kot	52
4.2	pH- Wert im Kot	55
4.3	Gewichtsentwicklung	56
4.4	Ergebnisse der histologischen Parameter	56
4.4.1	Kryptentiefe	57
4.5	Ergebnisse der Immunocytochemie mit Kryptenachse als Bezugsbasis	58
4.5.1	Ergebnisse der Mitoseauswertung in den verschiedenen Fütterungsgruppen	58
4.5.2	Darstellung der Apoptosedaten	59
4.5.3	Mitglieder der Bcl-2 Familie	59
4.5.3.1	bak	60
4.5.3.2	bcl-2	61
4.5.4	EGF (epidermal growth factor)	62
4.5.5	Verteilung in den einzelnen Kompartimenten entlang der Kryptenachse	63
4.5.5.1	Mitose	64
4.5.5.2	Verteilung der Apoptose entlang der Kryptenachse	66
4.5.5.3	Verteilung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie	69
4.5.5.4	Verteilung von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	74
4.6	Photographische Darstellung der immunocytochemisch nachgewiesenen Parameter	76
4.6.1	TUNEL- Färbung	76
4.6.2	Mitose (KI-67)- Färbung	78
4.6.3	EGF- Färbung	79
4.6.4	Bak- Färbung	81
4.6.5	Bcl-2- Färbung	83
5	DISKUSSION	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	95
7	SUMMARY	98
8	LITERATURVERZEICHNIS	101

1 Einleitung

Noch bis ins letzte Jahrhundert diente die Nahrungsaufnahme bei Nutztieren als auch beim Menschen hauptsächlich zur Bedarfsdeckung und Aufrechterhaltung der körperlichen Funktionen und Leistungsfähigkeit. Mittlerweile steht nicht mehr nur die Sättigung der Tiere im Vordergrund, sondern Inhaltsstoffe mit spezifischen Wirkungen gewinnen zunehmend an Bedeutung. Von hohem Interesse sind in diesem Zusammenhang Komponenten natürlich vorkommender Nahrungsmittel, welche aufgrund ihrer Eigenschaften förderlich auf den Gesundheitszustand des Organismus wirken. Die positiven Effekte prae- als auch probiotischer Inhaltsstoffe sollen über eine Beeinflussung der Darmfunktion vermittelt werden. Aufgrund ihrer prophylaktischen Wirkung wird auch über den Einsatz dieser Substanzen anstelle von Fütterungsantibiotika diskutiert. Aber nicht nur für die Tierernährung sondern auch für die Humanernährung wurde ein Zusammenhang zwischen Nahrungsinhaltsstoffen und Gesundheitszustand erkannt. Das Angebot aus der Werbung reicht von Säften, welche mit Vitaminen angereichert sind, bis hin zu verschiedenen Milchprodukten mit probiotischen Kulturen, dessen Verzehr dem Verbraucher eine allgemeine gesundheitsfördernde Wirkung verspricht.

Der Einsatz bestimmter Stoffgruppen wie zum Beispiel der Praebiotika wird oftmals diskutiert, ohne daß Detailmechanismen über deren Wirkung aus experimentellen Versuchen bekannt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, experimentell die Wirkung eines bestimmten praecaecal nicht verdaulichen Nahrungsmittels auf Proliferationsprozesse des Colons zu untersuchen. Verwendet wurde in diesem Zusammenhang als Vertreter von resistenter Stärke rohe Kartoffelstärke, welche im Vergleich zu anderen Nahrungsbestandteilen speziell die Bildung von Butyrat fördert.

Resistente Stärken sind nicht nur ein Bestandteil verschiedener natürlich vorkommender Nahrungsmittel, sondern können auch bei der thermischen Behandlung in der Futter- Nahrungsmittelindustrie entstehen. Weiterhin sind sie auch in Produkten des Convenience Food- Bereiches zu finden, so enthalten zum Beispiel Fertigsuppen sog. modifizierte Stärken. Da diese Nahrungsmittel nicht nur in der Tierernährung verstärkt zum Einsatz kommen, ist die Erforschung ihrer Effekte von großer Bedeutung.

2 Literaturübersicht

2.1 Übersicht über den Verdauungsapparat des Schweines

Das Verdauungssystem des Schweines wird in Kopfdarm und Rumpfdarm unterteilt. Der Kopfdarm besteht aus Nasen-, Mund- und Schlundkopfhöhle. Der Rumpfdarm läßt sich gliedern in den Vorderdarm (Speiseröhre und Magen), den Mitteldarm bzw. Dünndarm (Duodenum, Jejunum und Ileum), den Enddarm bzw. Dickdarm (Caecum, Colon und Rectum) und den After (Liebich, 1998). Der Aufbau des Rumpfdarms ist in Abb. 1 schematisch wiedergegeben.

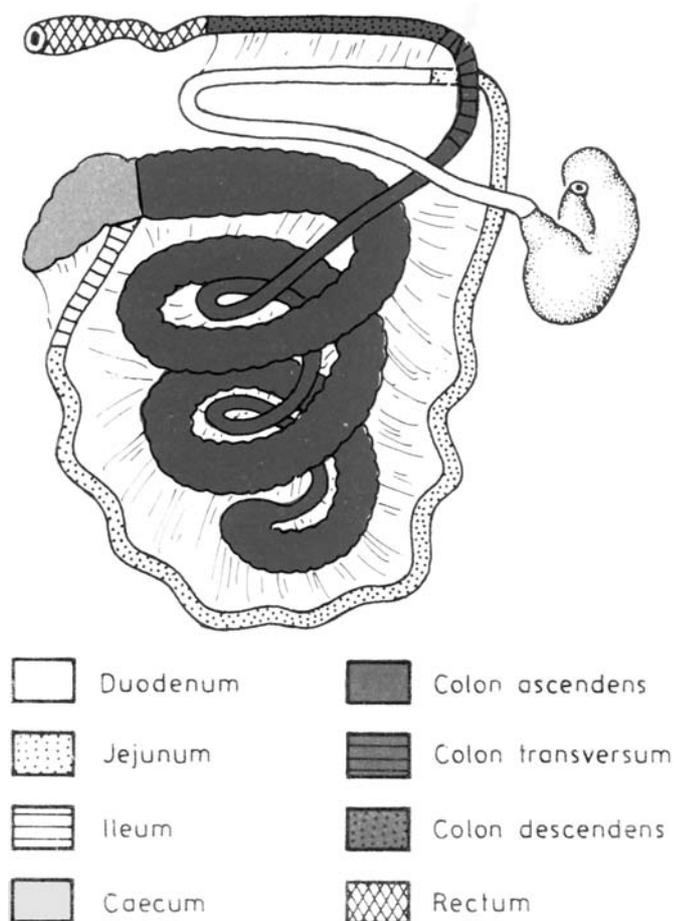


Abb. 1: Schematische Darstellung des Rumpfdarmes beim Schwein (nach Koch und Berg, 1990)

Die Länge des gesamten Darmes beträgt beim Schwein 20-27m, etwa das 15-fache der Körperlänge. Das Duodenum mißt ca. 0,95m und der gesamte Dünndarm mit Jejunum und Ileum ca. 15-20m. Die Länge des Dickdarmes liegt bei etwa 6m, die des Colons bei ca. 5m (Loeffler, 1991; Bucher & Wartenberg, 1991).

2.1.1 Morphologische Grundlagen des Gastrointestinaltraktes und deren Besonderheiten

Sämtliche Abschnitte des Rumpfdarms weisen einen ähnlichen Grundbauplan auf (Liebich, 1998), jedoch bestehen erhebliche Unterschiede bezüglich ihres Wandaufbaues (Abb. 2). Der Dünndarm besteht aus zahlreichen Krypten und Zotten. Die Krypten sind kürzer als die des Dickdarmes. Im Gegensatz dazu fehlen im Dickdarm die Darmzotten. Charakteristisch ist die Ausbildung von Krypten (glandulae intestinales), sie sind unverzweigt und liegen eng nebeneinander. Eigene Verdauungsfermente werden von der Dickdarmschleimhaut nicht ausgeschieden. Ferner hat der Dickdarm die Fähigkeit der Exkretion von schwerlöslichen Stoffen wie zum Beispiel Metallen. Außerdem sind im Gegensatz zum Dünndarm im Dickdarm nicht nur peristaltische sondern auch antiperistaltische Bewegungen physiologisch (Bucher & Wartenberg, 1991).

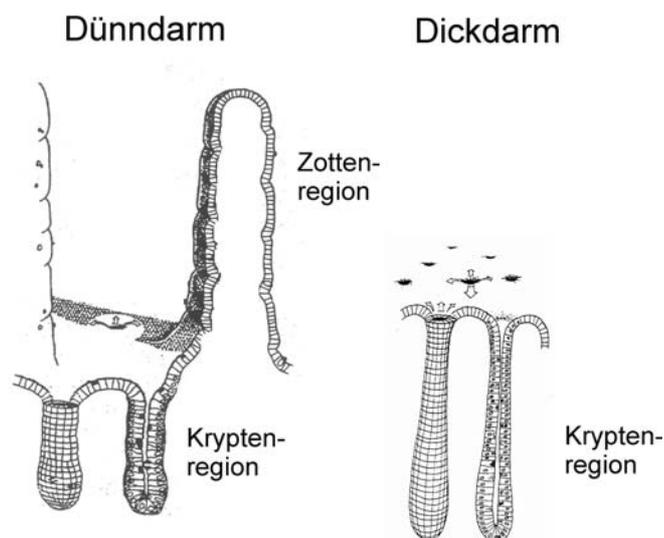


Abb. 2: Unterschiedlicher Wandbau von Dünndarm und Dickdarm (nach Potten, 1992)

2.1.2 Morphologische Besonderheiten des Colons

Das Colon entwickelt sich in der Embryogenese aus Mittel- und Enddarm. Aus dem Mitteldarm entstehen das Colon ascendens und das proximale Colon transversum und aus dem Enddarm das distale Colon transversum und Colon descendens. Neben dieser unterschiedlichen Entwicklung bestehen auch verdauungsphysiologische Unterschiede, so ist der Hauptort der Fermentation im proximalen Bereich gelegen, kann jedoch auch abhängig vom aufgenommenen Substrat distal verschoben sein. Weiterhin wird der Verdauungsbrei verstärkt im distalen Bereich eingedickt. Aus diesen Gründen wird das Colon in der vorliegenden Arbeit als proximales und distales Colon bezeichnet. Der proximale Teil besteht aus Colon ascendens und proximalem Bereich des Colon transversum, der distale Bereich aus distalem Colon transversum und Colon descendens.

2.1.2.1 Allgemeiner Wandbau des Colons

Der Grundbauplan des Colons besteht aus verschiedenen geschichteten Geweben (Abb. 3), sie werden vom Lumen nach außen als Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa bezeichnet.

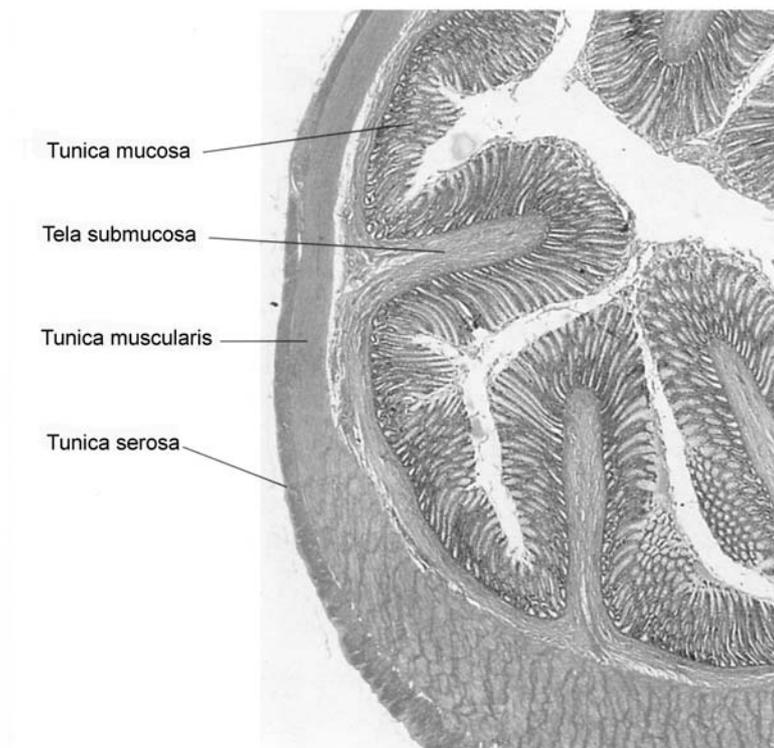


Abb. 3: Querschnitt durch das Colon (Liebich, 1998)

Die Tunica mucosa (Schleimhautschicht) wiederum besteht aus dem Epithelium mucosae (Epithel), der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae (Abb. 4).

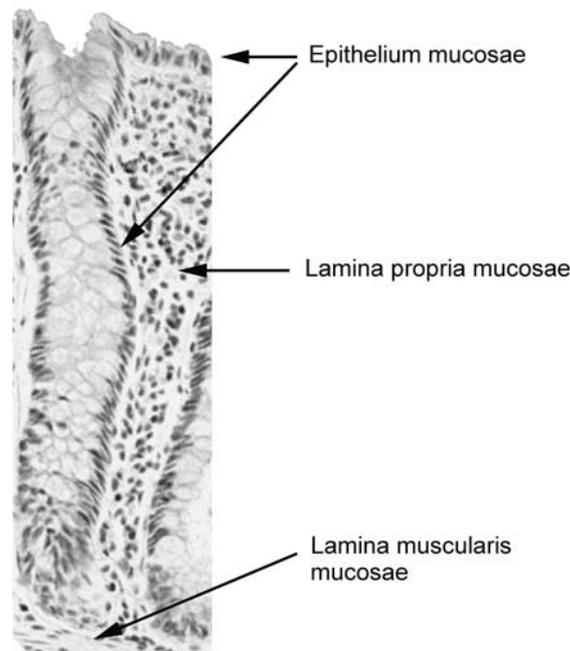


Abb. 4: Aufbau der Schleimhautschicht des Colons

Die Krypten können als Einstülpungen in die Lamina propria mucosae verstanden werden. Die innere Darmoberfläche stellt die Grenzfläche zum Darmlumen dar. Sie besteht aus einem einschichtigen, hochprismatischen Epithel.

Im Allgemeinen bestehen epitheliale Gewebe aus flächenhaften Zellverbänden, die mit wenigen Ausnahmen innere und äußere Körperoberflächen gegenüber den Bindegewebsräumen abgrenzen. Epithelien bilden damit vorrangig Grenzschichten zwischen biologisch unterschiedlichen Kompartimenten. Unterschieden werden Epithelien hinsichtlich ihrer embryonalen Herkunft, sie entwickeln sich aus den drei verschiedenen Keimblättern: Ektoderm, Entoderm und Mesoderm (Liebich, 1998).

Einschichtige Epithelien weisen gegenüber den mehrschichtigen eine geringere mechanische Belastbarkeit auf. Sie haben vorwiegend resorbierende und sezernierende Eigenschaften. Das einschichtige hochprismatische Epithel ist ein Resorptionsepithel und ist beim Monogastrier im Gastrointestinaltrakt vom Mageneingang bis zum Anus zu finden. Die Oberfläche der Enterocyten bzw. Colonocyten im Falle des Colons wird von einem dicken Besatz von Mikrovilli bedeckt. Darüber hinaus beinhalten diese Epithelien Zellen mit exokriner Sekretion (z.B.: Becherzellen) und Zellen mit endokriner Stoffabgabe (Ruckebusch et al., 1991).

Die Lamina propria mucosae ist eine subepitheliale Schicht aus lockerem Bindegewebe. Sie ist die Trägerschicht der Schleimhaut und enthält Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern und Fibroblasten. Weiterhin finden sich auch in großer Zahl Immunzellen und lymphoretikuläres Gewebe. Die Lamina muscularis mucosae besteht aus glatten Muskelzellen und grenzt die Schleimhaut von der Tela submucosa ab.

Die Tela submucosa (Unterschleimhautgewebe) besteht aus lockerem Bindegewebe, welches Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenzellen enthält. Diese Nervenfasern versorgen die epithelialen Drüsenzellen. Die Struktur der kollagenen Faserbündel ermöglicht die Anpassung an Volumen- und Gewichtsveränderungen des Darmes. Weiterhin ist eine große Anzahl von Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten, sowie Lymphfollikel vorhanden. Da Bakterien und Keime des Darminhaltes ständig auf die Schleimhaut wirken, übernimmt die Lamina propria mucosae und die Tela submucosa wichtige Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr des Organismus.

Die Tunica muscularis besteht aus glatter Muskulatur, welche sich in eine innere Zirkulärschicht (Stratum circulare) und äußere Längsschicht (Stratum longitudinale) gliedert. Sie sind für den Transport der Nahrung verantwortlich. Weiterhin begünstigen die peristaltischen Bewegungen die Durchmischung der Nahrung.

Die Tunica serosa besteht aus einer dünnen, feinfaserigen Bindegewebsunterlage, der Lamina propria serosae, und einem einschichtigen Plattenepithel (Mesothelium serosae) (Bucher & Wartenberg, 1991). Sie ist mit der bindegewebsartigen Tela subserosa mit der Tunica muscularis verbunden (Liebich, 1998).

2.2 Aufgaben des Gastrointestinaltraktes

Die vorrangige Aufgabe des gastrointestinalen Traktes besteht darin, die aufgenommene Nahrung soweit in ihre Bestandteile aufzuschließen, daß eine Aufnahme in das Körperinnere erfolgen kann. Der Verdauungsprozeß beginnt mit einer mechanischen Zerkleinerung der Nahrungsbestandteile in der Mundhöhle. Nach Abschlucken der Nahrung werden Kohlenhydrate, Proteine und Fette verdaut. Die Verdauung im Mitteldarm erfolgt über Enzyme. Ein Überblick über körpereigene Enzyme beim Abbau von Hauptnährstoffen ist in Abb. 5 gegeben.

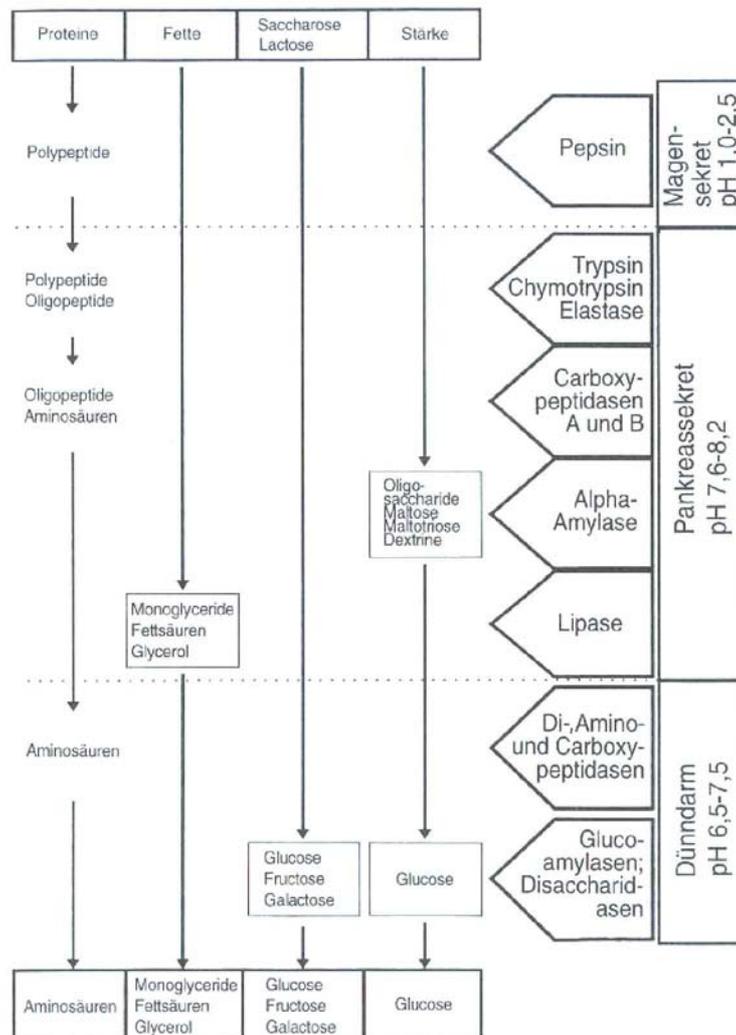


Abb. 5: Überblick über körpereigene Enzyme beim Abbau von Hauptnährstoffen (nach Simon, 1995)

Die Wirksamkeit von Dünndarmenzymen nimmt im Dickdarm kontinuierlich ab. Stattdessen übernehmen im Dickdarm kohlenhydrat- und proteinspaltende Darmbakterien und Protozoen die Verdauung restlicher Futterbestandteile. Die Aufgaben des Dickdarms bestehen neben der Resorption von Mineralien und Wasser, in der Synthese von Vitamin B und K und hauptsäch-

lich in der Fermentation von Kohlenhydraten, welche praecaecal durch Enzyme des Dünndarmes nicht verdaut werden können und im Dickdarm durch Mikroben in kurzkettige flüchtige Fettsäuren umgewandelt werden. Zu diesen Fettsäuren gehören Acetat, Propionat und Butyrat, sie stellen mit 85-95% den Hauptanteil der gebildeten Fettsäuren. Aus dem mikrobiellen Abbau von Aminosäuren können Valeriat, Isovaleriat und Isobutytrat resultieren, quantitativ sind sie jedoch von untergeordneter Bedeutung (Cummings et al. 1987). Eine Übersicht über die Anteile unterschiedlicher SCFA- Gehalte im Kot ist in Tab. 1 gegeben.

Tab. 1: Prozentuale Zusammensetzung und Bildung von SCFA aus verschiedenen Diäten (nach Phillips et al., 1995)

	Acetat	Propionat	Iso- butyrat	Butyrat	Iso- valeriat	Valeriat	Summe
SCFA (%)							
Diät mit wenig resistenter Stärke	61,6 ± 6,6	16,0 ± 1,7	2,1 ± 0,2	14,8 ± 2	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,4	100
Diät mit viel resistenter Stärke	64,7 ± 6,2	11,7 ± 1,1	2,1 ± 0,3	17,0 ± 2	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,2	100

Verbunden mit diesem Abbau treten Energieverluste in Form von Methan und Gärungswärme auf. Weiterhin sind die flüchtigen Fettsäuren mit einer geringeren energetischen Effizienz im Intermediärstoffwechsel im Vergleich zur Glukose zu bewerten. Die Energieverluste liegen beim Schwein bei ca. 40% (Kirchgessner, 1997). Durch die Resorption von Wasser wird der Darminhalt bis zu 75% eingedickt, der von den Becherzellen gebildete Schleim dient als Gleitmittel für den Kot.

Aufgrund seiner Lage und Funktion kommt der gastrointestinale Trakt mit einer Vielzahl körperfremder Stoffe in Kontakt, dazu gehören z.B. Nahrungsbestandteile, Mikroorganismen, Viren und Pilze. Neben einer unspezifischen bakteriziden Wirkung des Schleims und des sauren pH- Wertes im Magen beinhaltet der Darm ein spezifisches Immunsystem, welches vor einem unkontrollierten Übertreten von Antigen ins Körperinnere schützt. Dieses Immunsystem wird als GALT (Gut- associated lymphoid tissue) bezeichnet. Es enthält pro g Gewebe 10^6 Lymphozyten (Brandtzaeg et al., 1989). Schätzungen gehen davon aus, daß etwa 25% der intestinalen Mucosa aus Lymphgewebe besteht (Kagnoff, 1987). Es ist ein wichtiges Abwehrsystem, welches den Körper vor der Umwelt schützt. Prinzipiell besteht das GALT aus aggregierten Lymphgewebe in Form der Peyerschen Platten und einzelner Lymphfollikel, weiterhin

aus nichtaggregierten einzelnen Immunzellen in der lamina propria (Langkamp- Henken et al., 1992).

2.3 Verdauungsphysiologie des Dickdarms

2.3.1 Die Flora des Dickdarmes

Der Dickdarm ist ein intensiv besiedeltes mikrobiologisches Ökosystem mit einigen hundert Bakterienarten. Im Dickdarm des Menschen werden etwa $10^{11} - 10^{12}$ Bakterien pro Gramm Darminhalt gezählt. Die unterschiedlichen Bakterienarten unterscheiden sich hinsichtlich der für ihren Stoffwechsel präferierten Substrate und den daraus gebildeten Endprodukten. Im Colon befinden sich hauptsächlich anaerobe Vertreter der Arten Bakteroides, Bifidobakterium und Eubakterium. Weiterhin werden fakultativ anaerobe Clostridien gefunden. Die Bakterien Bakteroides und Bifidobakteria sind die wichtigsten Arten und machen etwa 30% der gesamten Anaerobier aus (Gibson & Macfarlane, 1995).

Nach der Geburt findet die Besiedelung der Mikroflora im Dickdarm statt. Die Spezieszusammensetzung entwickelt sich im Laufe der Zeit und hängt stark von der Art der Ernährung ab. Ist zum Beispiel der Proteingehalt in der Ernährung hoch, so führt dies zu einem Anstieg von Bakteroides und proteolytischen Bakterien, die Zahl von Clostridien hingegen nimmt ab (Ruckebusch et al. 1991).

2.3.2 Fermentationsprozesse im Dickdarm

Die Hauptaufgabe der intestinalen Mikroflora besteht in der Fermentation von Kohlenhydraten, welche im praecaecalen Verdauungstrakt nicht verdaut werden können. Zu dieser Stoffgruppe gehören die resistente Stärke sowie die Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) wie zum Beispiel Zellulose, Hemizellulose und Pektin. Weiterhin können unverdauliche Oligosaccharide wie verschiedene Zucker und Proteine als auch Aminosäuren als Substrat von den Bakterien des Colons genutzt werden (Cummings et al., 1997). Neben Sekreten der Verdauungsorgane kommen vor allem abgestorbene Zellen der Darmschleimhaut aus dem Dünndarm als endogene Quelle von Aminosäuren in Frage (Claus & Raab 1999).

2.3.2.1 Charakterisierung von Resistenter Stärke

Im Allgemeinen wird Stärke bereits im Dünndarm enzymatisch verdaut. Stärke, die den Dünndarm unverdaut passiert, kann im Dickdarm fermentativ umgesetzt werden. Da diese im Dünndarm nicht verdaut werden kann, wird sie Resistente Stärke genannt. Resistente Stärke kann wiederum in vier Untergruppen aufgeteilt werden: RS1, RS2, RS3 und RS4 (Tab. 2). Die Gruppe RS1 beinhaltet vor allem Samenkörner. Sie können im unzerkleinerten oder grob

gemahlene Zustand von den Enzymen nicht ausreichend gespalten werden. Sie sind aufgrund ihrer Struktur enzymatisch nicht spaltbar. RS2 kann aufgrund ihrer kristallinen Struktur schlecht von α - Amylase gespalten werden. Man findet sie zum Beispiel in grünen Bananen. RS3 entsteht durch Retrogradierung. Dies ist ein Prozeß, bei welchen die Stärkekörner in Anwesenheit von Wasser und Wärme aufquellen und somit ein Gel bilden. Beim Abkühlen dieses Gels verändert sich die Kristallstruktur so, daß der enzymatische Abbau erschwert wird. Die Gruppe RS4 beinhaltet chemisch modifizierte Stärken wie zum Beispiel Ester, welche in der Ernährungsindustrie aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften verwendet werden (Topping & Clifton, 2001).

Tab. 2: Arten von resistenter Stärke (nach Topping & Clifton, 2001)

Art der resistenten Stärke	Vorkommen/ Erläuterung
RS 1	unzerkleinerte oder nur grob gemahlene Körner und Samen, aufgrund ihrer Struktur vor enzymatischer Verdauung geschützt
RS 2	rohe Kartoffeln, grüne Bananen, einige Hülsenfrüchte, natürlich vorkommende resistente Stärke
RS 3, retrogradiert	gekochte und wiedererkaltete Kartoffeln, Brot, Corn Flakes
RS 4, chemisch modifiziert	Ester aus Stärke, industriell verarbeitete Stärke

2.3.3 Hauptprodukte der Fermentation im Colon

Die Hauptprodukte der bakteriellen Fermentation im Colon sind die SCFA (short chain fatty acids), zu denen vor allem Azetat (C2), Propionat (C3) und Butyrat (C4) gehören (vgl.: 2.2). Weiterhin entstehen Succinat, Valerat und Laktat aus der Kohlenhydratfermentation. Zu den entstehenden verzweigten Fettsäuren gehören Isobutytrat, 2- Methylbutyrat und Isovalerat, welche aus Aminosäuren gebildet werden dürften. Außerdem entstehen aus Proteinen NH_3 , Phenole, Indole und Amine (Macfarlane & Macfarlane, 1995). Weitere Nebenprodukte sind die Gase H_2 , CO_2 und CH_4 . Die Menge der gebildeten SCFA als auch die molaren Verhältnisse zwischen diesen SCFA hängen von dem zur Verfügung stehenden Substrat ab (Tab. 3/ Tab. 4).

Tab. 3: Molare Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat nach 24- stündiger Inkubation von menschlichem Kot mit verschiedenen Kohlenhydraten (nach Cummings & Macfarlane, 1997)

Substrat	Ausbeute an SCFA (%)	Molare Verhältnisse (%)		
		Acetat	Propionat	Butyrat
Stärke	49	62	15	23
Kleie (Weizen, Hafer)	40	64	16	20
Fruktooligosaccharide	-	78	14	8
Pektine	39	80	12	8
andere NSP	38	63	22	8
darunter:				
Guargummi	62	59	27	11
Arabinogalactan	43	57	31	11

Nahrungsbestandteile wie Zellulose, Hemizellulosen, Pentosane (Berggren et al., 1993; Bourquin et al., 1993; Knudsen et al., 1993) führen zu geringfügiger Butyratfermentation, während vor allem von resistenten Stärken erhöhte Butyratkonzentrationen erreicht werden.

Tab. 4: Molare Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat nach 24- stündiger Inkubation von Schweinekot mit verschiedenen Stärken (nach Martin et al., 1998)

Substrat	Molare Verhältnisse (%)		
	Acetat	Propionat	Butyrat
rohe Weizenstärke	56	25	17
rohe Maisstärke	62	21	16
rohe Erbsenstärke	62	21	15
rohe Amylomaissstärke	47	28	23
retrogradierte Amylomaissstärke	54	28	14
rohe Kartoffelstärke	55	19	25

Neben der Art des Substrates scheint auch die Dauer der Verfütterung die Butyratbildung zu beeinflussen. So wurde gezeigt, daß die Verfütterung von Resistenter Stärke über einen längeren Zeitraum zu einem allmählichen Anstieg der Butyratkonzentration führt (Le Blay et al., 1999). Das mikrobielle System des Colons scheint sich demnach an die Umsetzung von Resistenter Stärke zu adaptieren.

2.3.4 Definition von Praebiotika

Praebiotika können als Nahrungs- bzw. Futterbestandteile definiert werden, welche durch die Fermentation im Dickdarm das Wachstum und die Aktivität bestimmter Bakterien fördern und aufgrund dieser Fähigkeit positiv auf den Gesamtorganismus wirken können. Sie fördern das Wachstum solcher Bakterien, welche eine positive Wirkung auf den Gastrointestinaltrakt ausüben, indem z.B. das Wachstum von Pathogenen unterdrückt wird (Gibson & Roberfroid, 1995). Die gesundheitsfördernde Wirkung von Praebiotika beinhaltet auch die erhöhte Entleerungsrate des Darmes (Roberfroid et al., 1993). Die Fermentation von Praebiotika führt zur Bildung von Azetat, Propionat und Butyrat (Roland et al., 1995).

Die bei der Fermentation entstehenden SCFA senken den pH- Wert des Coloninhaltes. So wird durch die Verfütterung von resistenter Stärke eine Senkung des pH- Wertes beobachtet (Topping et al., 1993). Die Absenkung des pH- Wertes wird als günstig beurteilt, denn das Wachstum von pH sensitiven pathogenen Bakterien kann dadurch unterdrückt werden (Cherington et al., 1991). Weiterhin zeigen Studien an Schweinen, daß eine erhöhte Bildung von SCFA die Zahl der pathogenen Erreger vermindert (Prohaszka et al., 1990).

2.3.5 Definition von Probiotika

Unter Probiotika sind Lebensmittel- bzw. Futterzusatzstoffe zu verstehen, welche lebende Mikroben enthalten und sich günstig auf die Gesundheit auswirken. In der Tierernährung finden vor allem bestimmte Milchsäurebakterienstämme (*Bacillus cereus* var. *Toyoi*) Verwendung. Positive Effekte wie eine Verbesserung der Laktoseintoleranz, eine Verbesserung der Immunabwehr und eine Verminderung schädlicher Stoffe im Darminhalt werden diskutiert.

2.3.6 Energetische Verwertung der SCFA

Im Dickdarm ist Acetat die quantitativ vorherrschende SCFA. Acetat wird vom intestinalen Epithel aufgenommen, gelangt über die Pfortader in die Leber und wird in verschiedenen Geweben zur Energiegewinnung herangezogen (Cummings & Macfarlane, 1997). Propionat spielt vor allem für die Energiebereitstellung beim Wiederkäuer eine zentrale Rolle. Es wird in der Leber über die Glukoneogenese zu Glukose umgesetzt. Beim Monogastrier ist dieser Syntheseweg von geringerer Bedeutung. Butyrat ist die für das Colonepithel funktionell wich-

tigste kurzkettige flüchtige Fettsäure. Es dient den Colonocyten als wichtigste Energiequelle, da bis zu 70% des Gesamtenergiebedarfes über Butyrat abgedeckt werden kann (Roediger, 1995). Über die β -Oxidation in den Mitochondrien entstehen aus einem C4- Molekül zwei C2- Bruchstücke, welche letztendlich in Acetyl- CoA umgewandelt werden. Eine wichtige Eigenschaft der SCFA ist der trophische Effekt auf das intestinale Epithel (Kirchgessner, 1997; Topping & Clifton, 2001; Sakata, 1987).

2.4 Funktionalität der Darmmucosa

Die intestinale Mucosa ist ein Gewebe mit hoher Turnover- Rate der Epithelzellen. Die Turnover- Rate der Dickdarmmucosa beträgt 3-8 Tage (Lipkin et al., 1963; Cole & McKalen, 1961; Strater et al., 1995). Dem Turnover liegt zunächst eine kontinuierliche Zellteilung in den unteren Zellschichten der Krypte zugrunde (Abb. 6).

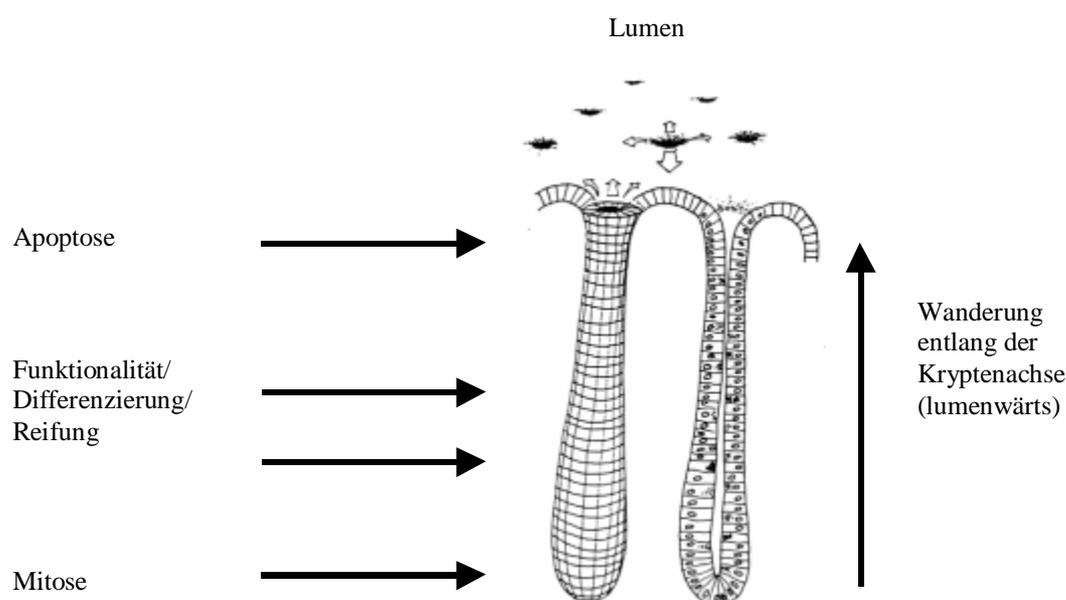


Abb. 6: Darstellung von Krypten der Colonmucosa (modifiziert nach Potten, 1992)

Die neu gebildeten Zellen differenzieren, reifen und wandern lumenwärts entlang der Kryptenachse. Im luminalen Bereich werden sie schließlich durch Zelltod eliminiert (Eastwood, 1977; Strater et al., 1995). Die Wanderung der Zellen von der Kryptenbasis bis zur Spitze erfolgt in 3-7 Tagen (Moss et al., 1996a). Die Dauer des Zellzyklus dürfte 1-2 Tage betragen (Lipkin et al., 1963). Die Apoptose ist ein wichtiger physiologischer Prozeß zur Aufrechter-

haltung der Gewebshomeostase. Sie steht im engen Zusammenhang zur Mitose, da bei gleichbleibender Zellzahl eines Gewebes ebensoviele Zellen gebildet werden wie auch durch Zelltod verloren gehen (Kerr et al., 1972). Dementsprechend müssen in Geweben mit ständiger Zellproduktion gut definierte Mechanismen für die Regulation des Zellverlustes bestehen (Ansari & Hall, 1992). Ihre Aufgaben liegen in der Beseitigung überflüssiger, geschädigter oder infizierter Zellen (Thompson, 1995).

Fehler in der Apoptose können zu verschiedenen Krankheitsbildern führen. Ein Anstieg führt bei gleichbleibender Mitoserate zu GewebSATrophien. So kann einerseits eine Aktivierung proapoptotischer Regelmechanismen zur Degeneration des Gewebes führen (Que & Gores, 1997), andererseits erleichtern Fehler in der Apoptose die Transformation normalen Gewebes in neoplastisches Gewebe.

Aus diesen Gründen werden pharmakologische Strategien in Bezug auf die Beeinflussung der Apoptose diskutiert. Somit könnte eine Inhibierung der Epithelzellapoptose Gewebserneuerungen und Reparaturprozesse im Gastrointestinaltrakt verbessern, wohingegen eine Induktion der Apoptose in malignen Geweben von hohem therapeutischen Nutzen sein könnte (Que & Gores, 1997).

2.4.1 Zellteilung: Mitose

Den Vorgang der Zellteilung, durch den eine neue Zelle mit derselben Chromosomenzahl wie in der Ausgangszelle entsteht, nennt man Mitose. Bei der Mitose spaltet sich jedes Chromosom in zwei gleiche Teile, die zu entgegengesetzten Enden der Zelle wandern. Nach der Zellteilung hat dann jede der beiden Tochterzellen dieselbe Zahl von Chromosomen und Genen wie die ursprüngliche Zelle. Durch Mitose vermehren sich die einfach gebauten Einzeller und manche vielzelligen Arten; außerdem wachsen Lebewesen durch diesen Vorgang (Hyperplasie) und verbrauchte Zellen werden ersetzt. Dies steht im Gegensatz zum Zellwachstum (Hypertrophie), welches lediglich als Zunahme an Zellmasse bzw. Zellgröße zu verstehen ist. In der Mucosa des Gastrointestinaltraktes gehen die Enterocyten stets aus Stammzellen, welche in den unteren Bereichen der Krypte lokalisiert sind, hervor (Bach et al., 2000).

Um eine proliferierende Zelle zu identifizieren, müssen spezifische Veränderungen detektiert werden, wie zum Beispiel Genprodukte, welche mit der Proliferation einhergehen. Als Vertreter dieser proliferations-bezogenen Gene werden u. a. die Onkogene diskutiert.

Der chronologisch ablaufende Zellzyklus (Abb. 7) ist für die Identifizierung der Mitose von großer Bedeutung. Dieser ist in vier Phasen unterteilt (G1, S, G2 und M). Während der S Pha-

se erfolgt die DNA Synthese, während der M Phase die Mitose mit der Aufteilung der Chromosomen. In den Phasen G1 und G2 (gap Phasen) werden die Vorbereitungen für die Abläufe in den jeweils nachfolgenden Phasen S und M getroffen. Zellen, die den Zellzyklus nicht durchlaufen, befinden sich in der G0 Phase.

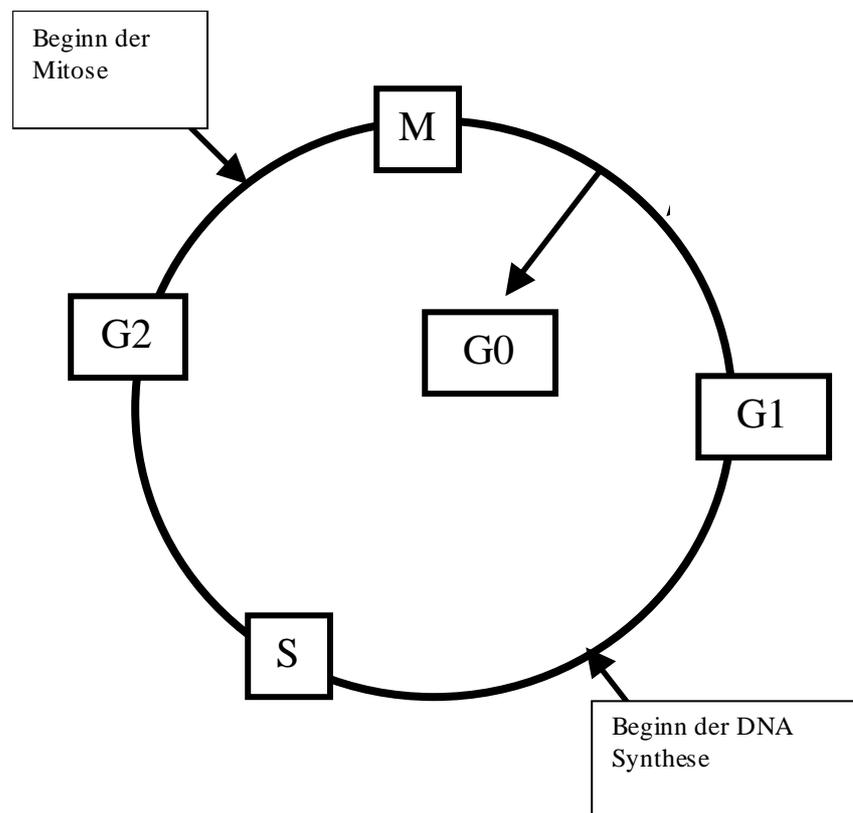


Abb. 7: Schematische Darstellung des Zellzyklus

Der Nachweis der Mitose kann über bestimmte Marker wie PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) und über die Detektion von nukleärem Antigen (Ki67) bestimmt werden (Potten & Loeffler, 1990). Das Protein PCNA wird in teilenden Zellen synthetisiert. Die gegen dieses Protein gerichteten Antikörper reagieren mit teilenden Zellen einschließlich Tumorzellen, jedoch nicht mit Zellen in der Ruhephase (Mathews et al. 1984). Der Antikörper Ki67 detektiert ein nukleäres Antigen, welches in proliferierenden Zellen aber nicht in Zellen der Ruhephase vorhanden ist. Zellen in zyklischen Phasen einschließlich G1 sind Ki67 positiv, dagegen exprimieren Zellen in der G0 Phase das Antigen nicht (Baisch & Gerdes 1990).

2.4.1.1 Definition der Stammzellen

Stammzellen werden aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften definiert. Um eine Zelle als Stammzelle zu identifizieren, muß ihre Funktion getestet werden, denn sie kann nur schwer anhand morphologischer Kriterien bestimmt werden. Sie wird als undifferenzierte Zelle beschrieben, welche verschiedene Eigenschaften aufweisen kann. Dazu gehören die Proliferation, Selbsterhaltung und die Produktion einer großen Anzahl von Nachkommen (Lajtha, 1979a; Steel, 1977; Wright & Allison, 1984; Hall & Watt, 1989).

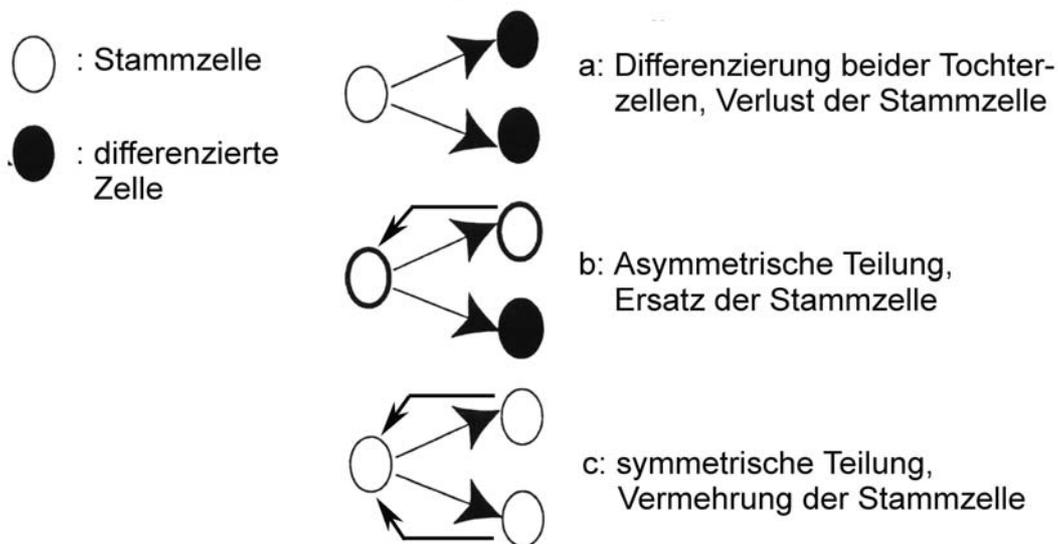


Abb. 8: Modell der Stammzellteilung (nach Ro & Rannala, 2001)

Die Versorgung der Colorkrypten mit Enterocyten wird von Progenitor (Vorläufer)-zellen in den unteren Bereichen der Krypte sichergestellt. Die Neubildungsrate von Zellen muß mit dem Zellverlust in dynamischer Weise übereinstimmen. Die Selbsterhaltung der Stammzellpopulation ist von fundamentaler Bedeutung (Bach et al., 2000). Teilt sich eine Stammzelle durch Mitose, muß wiederum eine weitere Stammzelle entstehen. Entstehen durch symmetrische Teilung aus beiden Tochterzellen wiederum Stammzellen, führt dies zu einem Anstieg der Stammzellpopulation (Abb. 8c). Geht aus der Teilung eine Stammzelle und eine Tochterzelle hervor, welche sich differenziert, spricht man von einer asymmetrischen Teilung, die Anzahl der Stammzellen bleibt unter diesen Umständen konstant (Abb. 8b). Die asymmetrische Teilung wird unter normalen Bedingungen vollzogen, sie sichert eine gleichbleibende Stammzellpopulation. Findet eine Differenzierung beider Tochterzellen statt, so wird die ursprüngliche Stammzelle verloren gehen (Abb. 8a). In Abhängigkeit von den bestehenden Be-

dingungen scheinen für eine Stammzelle alle drei Optionen möglich zu sein, wodurch sie ihre eigene Anzahl regulieren als auch die Zellzahl der gesamten Krypte mitsteuern kann (Ro & Rannala, 2001)

Aus den Stammzellen gehen die Transitzellen hervor, sie sind als Zwischenstufe von Stammzelle und funktionstüchtigen Zellen zu sehen (Abb. 9). Sie unterscheiden sich von den Stammzellen durch den teilweise vorhandenen Differenzierungs- und Reifungsgrad. Sie sind zwischen dem Stammzellkompartiment und den funktionalen Zellen lokalisiert. Dementsprechend besitzen sie sowohl Eigenschaften der Stammzellen als auch der bereits differenzierten Zellen, sie können sich 4-6 mal teilen (Bach et al., 2000). Sie sind jedoch auf den Input der Stammzellen angewiesen. Werden z.B. die Stammzellen eliminiert, so gehen auch die Transitzellen verloren und das Gewebe verliert die Fähigkeit der Selbsterhaltung.

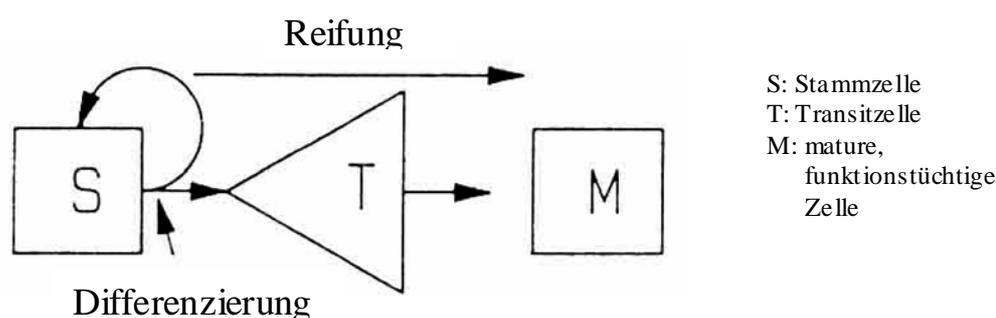


Abb. 9: Entwicklung von Stammzellen zu muren Zellen (modifiziert nach Potten & Loeffler, 1990)

2.4.2 Differenzierung der Zellen

Die Differenzierung einer Zelle wird als qualitative Veränderung des zellulären Phenotyps der Zelle gesehen, als Konsequenz der Synthese neuer Genprodukte (Laytha, 1979b). Bei diesem Vorgang wird eine morphologische Veränderung der Zelle oder auch eine veränderte Enzymaktivität oder Proteinzusammensetzung beobachtet. Es ist eine qualitative Veränderung, weswegen der Differenzierungsgrad nur im Vergleich zu einer anderen Zelle gesehen werden kann. Während ihres Lebens ist die Zelle fähig, verschiedene Differenzierungsgrade zu erreichen. Dieser Zustand kann durch die Identifizierung neuer Proteinexpression erkannt werden (Potten & Loeffler, 1990).

2.4.3 Reifung der Zellen

Die Reifung der Zelle (maturation) kann als quantitative Veränderung des zellulären Phänotyps oder der zellulären Proteine verstanden werden, welche die funktionellen Fähigkeiten verändert (Lajtha, 1979b). Aufgrund dieser Tatsache kann der Reifungsgrad einer Zelle z.B. durch den Nachweis spezifischer zellulärer Proteine bestimmt werden. Im Laufe der Zeit reift eine differenzierte Zelle in eine für das jeweilige Gewebe funktionstüchtige Zelle heran (Potten & Loeffler, 1990). Der Übergang von Stammzellen zu funktionstüchtigen Zellen bedingt aber auch, daß die funktionstüchtigen Zellen meist ihre Teilungsfähigkeit verlieren, von wenigen Ausnahmen wie z.B. Leberzellen abgesehen.

2.4.4 Apoptose

Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen (apo = weg, ptosis = herabfallend) und bedeutet soviel wie herabfallendes Laub. Apoptose ist eine Form von programmiertem Zelltod mit bestimmten morphologischen und biochemischen Eigenschaften. Die Zelle nutzt dabei aktiv ein genetisch kontrolliertes Programm, um ihr Absterben einzuleiten (Que & Gores, 1996).

Die Apoptose kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden. Dazu gehören virale Infektionen, Veränderungen im Stoffwechsel wie Änderung der Glukosekonzentration, Hitze, Bestrahlung, Toxine und Chemikalien. Von diesem durch Noxen ausgelösten Zelltod ist der „physiologische Zelltod“ abzugrenzen, der im Rahmen des Zellturnovers in die Mechanismen der Zellhomeostase eingebettet ist.

Weiterhin wird in Übersichtsarbeiten eine Beteiligung von Cytokinen, Steroiden und Peptidhormonen bzw. das Fehlen dieser Substanzen an Apoptosevorgängen beschrieben (Kiess & Gallaher, 1998). Jedoch sind diese Informationen lückenhaft, experimentelle wissenschaftliche Arbeiten, in welchen eindeutig die Wirkung dieser Substanzen auf die Apoptose behandelt wird, fehlen.

Es ist bekannt, daß die Wachstumsfaktoren EGF und IGF und ihre Rezeptoren vor Apoptose schützen können (Xia et al., 1995; Resnicoff et al., 1995; Kiess & Gallaher, 1998). Interleukine wie IL-2 und IL-4 inhibieren die von Dexamethason induzierte Apoptose von Thymocyten und T- Zellen, jedoch hohe Dosen von IL-2 fördern die Apoptose in diesen Zellen (Migliorati et al., 1994; Kiess & Gallaher, 1998). Es wird diskutiert, daß Wachstumsfaktoren die Beeinflussung der Apoptose über Mechanismen steuern, welche den Eintritt der Zellen in den Zell-

zyklus beinhaltet. So ist bekannt, daß sich in der Ruhephase (G_0) befindliche Tumorzellen die Apoptose nicht vollziehen (Kiess & Gallaher, 1998).

Weiterhin sind auch Steroide zusammen mit den Wachstumsfaktoren und anderen Hormonen an der Regulation der Apoptose beteiligt (Evans- Storms & Cidlowski, 1995; Wimalasena et al., 1991). Glukokortikoide induzieren die Apoptose von Thymocyten und maturen T Zellen. Die Wirkung unterschiedlicher Hormone auf die Apoptose ist vielfältig und kann in dieser Arbeit nur teilweise dargestellt werden. Außerdem wirken die einzelnen Hormone unterschiedlich auf verschiedene Gewebe. Glukokortikoide zum Beispiel schützen vor Apoptose in den Epithelzellen der Prostata, fördern sie hingegen in Osteoblasten (Nijweide et al., 1986). Eine Beteiligung von Glukokortikoiden an Apoptoseprozessen von Darmepithelzellen konnte jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden jedoch Effekte auf Proliferationsprozesse beschrieben, eine zweimonatige Gabe von Glukokortikoiden führte im Gegensatz zu 33 Tagen zu einem Anstieg von Proliferationsparametern in der Colonmucosa von Ratten (Gunin & Nikolaev, 2000). Eindeutig scheinen jedoch EGF bzw. der EGF- Rezeptor und Somatostatin an Apoptoseprozessen von Epithelzellen des Darmes beteiligt zu sein. So konnte nachgewiesen werden, daß der EGF- EGF- Rezeptor Komplex vor Apoptose bei Adaptationsprozessen nach Resektion von Darmabschnitten schützt (Helmrath et al., 1998). Somatostatin dagegen erhöhte die Apoptose von Enterocyten (Thompson, 1998).

2.4.4.1 Morphologische Besonderheiten der Apoptose

Der Apoptosevorgang (Abb. 10) ist durch charakteristische morphologische Kriterien gekennzeichnet. Diese morphologischen Veränderungen können in drei verschiedene Phasen unterteilt werden (Arends et al., 1990). In der ersten Phase kondensiert das Chromatin, der Nukleus löst sich auf und es entstehen DNA Bruchstücke. Besonders auffallend sind das Schrumpfen des Gesamzellvolumens, die Zunahme in der Zelldichte, das Zusammenpressen einiger Organellen und die Ausdehnung des Endoplasmatischen Retikulums. Zu diesem relativ frühen Zeitpunkt bleibt die morphologische Struktur der Mitochondrien erhalten. In der zweiten Phase (blebbig/budding) entstehen aus Nukleus und Zytoplasma viele kleine, membrangebundene apoptotische Körper (apoptotic bodies). Diese apoptotischen Körper werden von benachbarten Zellen z.B. Makrophagen phagozytiert oder im Falle der Kryptenspitze ins Darmlumen abgegeben. In der dritten Phase werden übrige nukleäre und zytoplasmatische Strukturen abgebaut. Das typische morphologische Kennzeichen der Apoptose ist die Kondensation des Nukleus, wohingegen andere Organellen relativ gut erhalten sind (Kerr et al., 1972).

Die Spaltung der DNA in Fragmente ist das biochemische Kennzeichen der Apoptose. Zu Beginn wird die DNA in 300–500 Kilobasenpaare (kbp) große Abschnitte unterteilt, schließlich erfolgt eine Aufspaltung in 180-200 Basenpaare große Fragmente (Walker et al., 1994; Oberhammer et al., 1993). Zusammen mit den charakteristischen morphologischen Veränderungen ist der Apoptoseprozeß in der Periode der 180 bp großen Fragmente kennzeichnend für den programmierten Zelltod. Jedoch wird die Aufspaltung der DNA auch in anderen Formen des Zelltodes wie der Nekrose beobachtet. Beide Formen ähneln sich zwar bezüglich der Spaltung der DNA in einzelne Fragmente, jedoch bestehen deutliche Unterschiede. Bei der Apoptose verdichtet sich das Chromatin, während bei der Nekrose unregelmäßig ausgebildete Chromatinklumpen entstehen. Im Gegensatz zur Nekrose werden bei der Apoptose die zytoplasmatischen Organellen erst im fortgeschrittenen Stadium abgebaut. Ein wesentlicher Unterschied besteht auch bezüglich des Zellvolumens, so schrumpfen die Zellen bei der Apoptose, dagegen schwellen sie bei der Nekrose an. Werden nun nicht nur einzelne Zellen, sondern ganze Gewebsschnitte untersucht, sind bei der Apoptose meist nur einzelne Zellen in den für den Zelltod charakteristischen Gewebsschichten zu finden, bei der Nekrose sind jedoch meist ganze Gruppen von Zellen betroffen. Da die Apoptose in die physiologischen Abläufe der Zelle miteingebunden ist, zeigen sich im Gegensatz zur Nekrose keine Entzündungsreaktionen (Columbano, 1995; Afanas'ev et al., 1986; Duvall & Wyllie, 1986; Kerr, 1993).

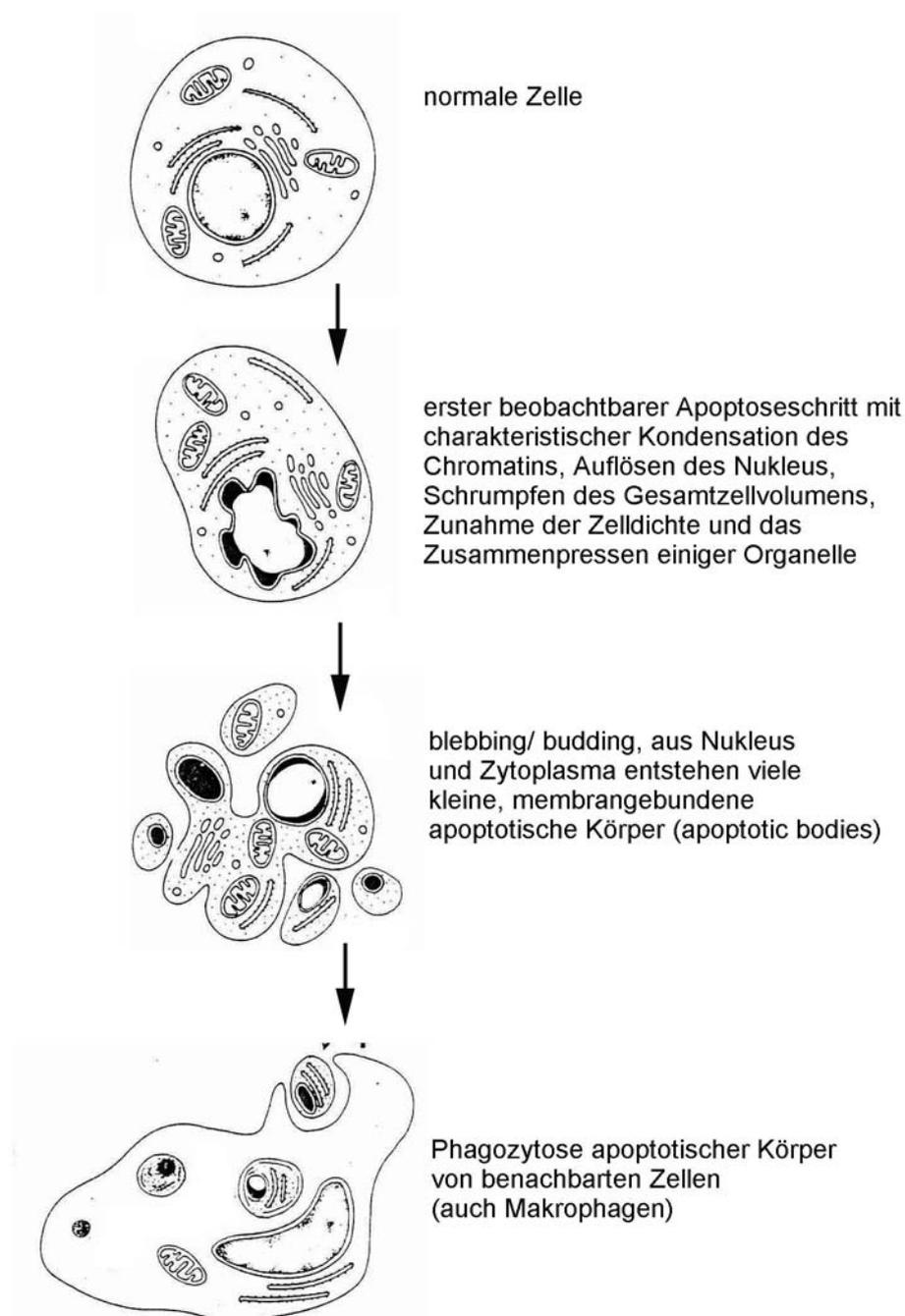


Abb. 10: Schematische Darstellung der Apoptose (nach Kerr, 1993)

2.4.4.2 Ablauf der Apoptose

Die Apoptose kann über verschiedene Regelmechanismen initiiert werden (Abb. 11). Zu unterscheiden sind in diesem Zusammenhang der Rezeptor vermittelte Apoptosepfad und der mitochondriale Pfad.

Der Rezeptor vermittelte Apoptosepfad wird über Rezeptoren wie CD95 initiiert. Die Bindung von CD95- Ligand an CD95 induziert den Signalkomplex, welcher mittels FADD (Fas associated death domain protein) Procaspase 8 Moleküle rekrutiert und somit für die Aktivierung von Caspase 8 verantwortlich ist (Hengartner, 2000).

Die Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle in der Steuerung der Apoptose ein. Der mitochondriale Weg kann über extrazelluläre Faktoren oder auch DNA – Schädigung ausgelöst werden. Proteine der Bcl-2 Familie sind an diesem Regulationsmechanismus beteiligt. Die pro- und antiapoptotischen Vertreter dieser Familie treten an den Mitochondrien in Kontakt und steuern die Ausschüttung von verschiedenen Molekülen wie zum Beispiel Cytochrom c, welches zusammen mit Apaf-1 und Procaspase 9 zur Aktivierung der Effektorcaspasen führen kann. Auf weitere im Schaubild dargestellte Detailmechanismen wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen, genauere Erklärungen sind in der Veröffentlichung von Hengartner (2000) zu finden.

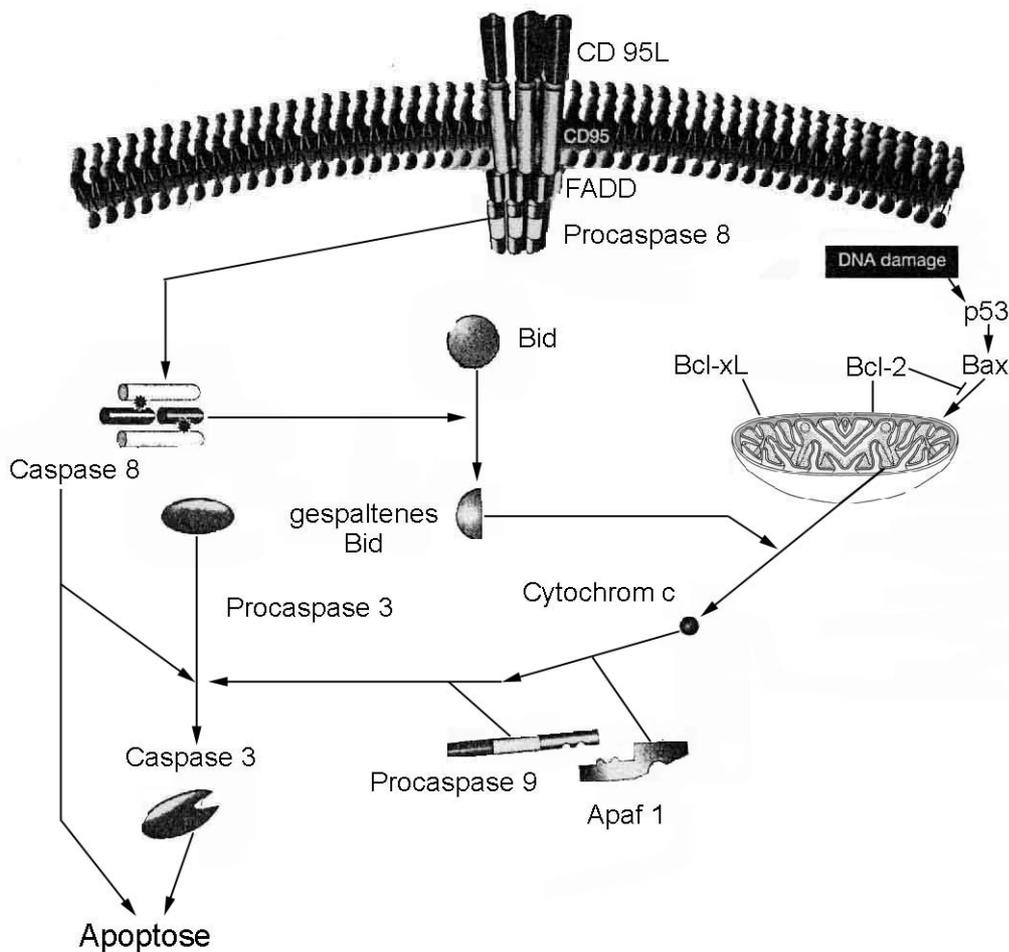


Abb. 11: Schema der wichtigsten Apoptosepfade (links: Rezeptor vermittelter Apoptosepfad; rechts: mitochondriale Apoptosepfad, nach Hengartner, 2000)

2.4.4.3 Identifizierung apoptotischer Zellen

Apoptotische Zellen können mit einer histochemischen / cytochemischen Nachweismethode identifiziert werden. Die für die Apoptose typischen DNA – Fragmente können detektiert werden, indem die neu geformten DNA – Enden angefärbt werden. Hierzu wird biotinyliertes dUTP an das 3`- Hydroxyende der fragmentierten DNA hinzugefügt. Diese Reaktion wird durch terminale Deoxy Transferase katalysiert. Die Färbung erfolgt, indem das biotinylierte dUTP mit Avidin einen Komplex eingeht und somit mittels der ABC Methode nachgewiesen werden kann. Diese Methode (TUNEL) wurde das erste Mal von Gavrieli et al. (1992) beschrieben. Der Vorteil dieses Nachweisverfahrens liegt darin, daß nicht nur die Anzahl der apoptotischen Zellen mittels Lichtmikroskop einfach und schnell erfaßt werden kann, sondern auch Informationen über die Lokalisation im Gewebe vorliegen. Die Verifikation der Apoptose kann mittels Elektronenmikroskop erfolgen. Anhand des Transmissions- Elektronenmikroskops (TEM) können Details über den Zustand des Nukleus und der Organellen untersucht werden. Das Scanning- Elektronenmikroskop (SEM) hingegen liefert ein dreidimensionales Bild des apoptotischen Prozesses innerhalb einer Zelle auf makromolekularer Ebene. Der Vorteil der Elektronenmikroskopie liegt in der eindeutigen Erfassung apoptotischer Abläufe. Jedoch kann mit dieser Methode keine quantitative Auswertung erfolgen, deshalb eignet sie sich nur für die Verifikation der Apoptose (Wyllie et al., 1980).

2.4.5 Rolle der Suppressorgene

Suppressorgene kontrollieren den Ablauf des Zellzyklus und sind wesentlich an der geregelten Zellteilung beteiligt. Nach Ausfall ihrer Funktion kommt es zum Verlust der von ihnen ausgeübten Kontrolle. Die Folge ist eine unkontrollierte Zellteilung. Der Funktionsausfall kann entweder durch Sequenzänderung der Gene (z.B. Punktmutation, Chromosomenverlust) oder durch Komplexbildung entweder mit körperfremden Virusprotein oder körpereigenen Onkoproteinen erfolgen. Zu einem der am besten charakterisierten Suppressorgene gehört das Gen p53. Es wurde p53 bezeichnet, da es aus einem 53 KD Protein besteht (Lane and Crawford, 1979). Es ist ein nukleäres Protein, dessen mRNA prinzipiell in allen Geweben nachweisbar ist (Rogel et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, daß p53 einer malignen Formation entgegenwirkt (Finlay et al., 1989). P53 ist ein Regulatorprotein des Zellzyklus mit proliferationshemmender Wirkung.

Während des Zellzyklus wird die DNA auf mögliche Schädigungen untersucht. So verhindert der Kontrollpunkt G1-S die Replikation von schadhafter DNA. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, daß eine Schädigung der DNA zu einem intranukleären Anstieg von p53 führt (Kuerbitz et al., 1992). Der Anstieg von p53 wiederum bewirkt eine Transkriptionsaktivierung der p53 abhängigen Gene, welche in den Zellzyklus regulierend eingreifen. Dadurch wird der Zellzyklus in der Phase G1 angehalten und die Replikation genetisch defekter Zellen verhindert. Neben dieser proliferationshemmenden Wirkung kann p53 auch die Apoptose geschädigter Zellen bewirken (Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993). Dies kann z.B. über Transkriptionsaktivierung des Gens bax erfolgen, dessen Protein die Wirkung des Apoptose-schutzproteins Bcl-2 aufhebt. P53 wurde aus diesen Gründen auch als „Wächter des Genoms“ (guardian of the genome) bezeichnet (Lane, 1992).

Wesentliche Bestandteile des intrazellulären Apoptosevorgangs stellen Vertreter der Bcl-2 Familie mit Mitochondrien, Cytochrom c und Caspasen dar. Eine vereinfachte Darstellung ist in Abb. 12 wiedergegeben.

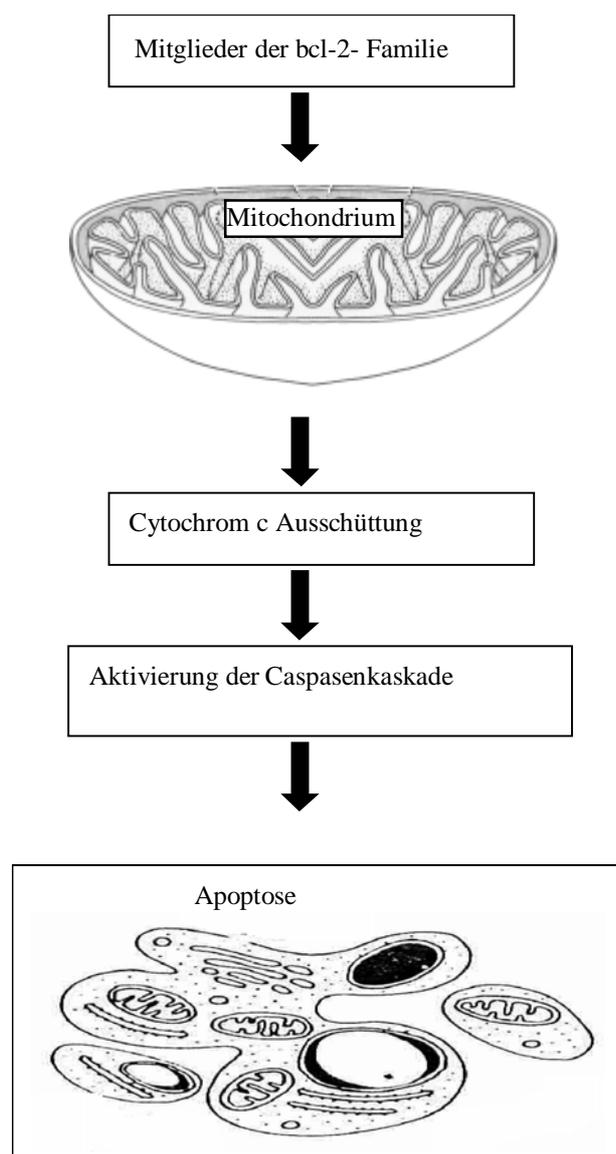


Abb. 12: Modell der Apoptosekaskade via Bcl-2, Mitochondrien, Cytochrom c und Caspasen

2.4.5.1 Apoptoseregulierende Proteine: Bcl-2 Familie

Bcl-2 wurde als Protooncogen identifiziert. Das Gen wurde erstmals in B- cell- Lymphoma entdeckt. Experimente an murinen Zelllinien zeigten auch eine Wirkung von bcl-2 auf die Apoptose (Vaux et al., 1988). Während Bcl- 2 in vielen fötalen Geweben gefunden wird, wird dieses Protein bei adulten Geweben hauptsächlich in schnell teilenden und differenzierenden Zellen exprimiert. In weiteren Untersuchungen wurde eine Anzahl von Genen gefunden, welche Sequenzhomologien zu bcl-2 aufweisen (Yang & Korsmeyer, 1996; Reed, 1997). Die Charakterisierung der Aminosäuresequenz, die biologische Wirkung und Funktion führten zu verschiedenen Beobachtungen. Demnach gehören zur Familie der Bcl-2 Proteine sowohl Ver-

treter mit antiapoptotischer als auch mit proapoptotischer Wirkung (Tab. 5). Die Aminosäuresequenzhomologie zwischen den Vertretern der Bcl-2 Familie ist gering, sie ist begrenzt auf vier spezifische Regionen, den sog. **BH**- Regionen (**B**cl-2 **H**omology). Diese Regionen vermitteln die Interaktionen zwischen den Proteinen und steuern somit die Bildung von Homo- und Heterodimeren (Borner et al., 1994; Yin et al., 1994; Farrow & Brown, 1996). Den verschiedenen Mitgliedern sind meist vier Bindungsregionen (BH1 – BH4) gemein. Die Regionen BH1, BH2, BH3 und der hydrophobe C- Terminus sind bei den meisten Mitgliedern ausgeprägt, sie sind für die funktionelle Aktivität wichtig. Die Region BH3 scheint für die Zelltod- Suppressor- Wirkung von antiapoptotischen Bcl-2 Homologen entbehrlich zu sein, jedoch notwendig für die cytotoxische Aktivität der proapoptotischen Vertreter (Kelekar & Thompson, 1998).

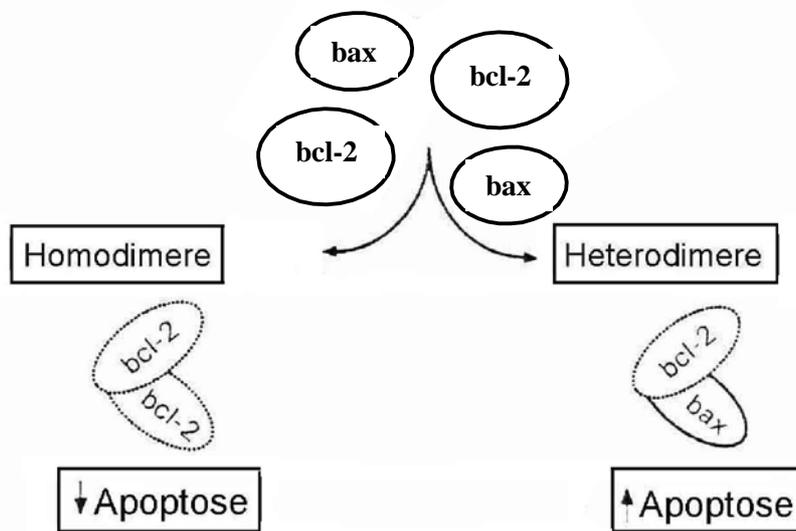
antiapoptotische Wirkung	proapoptotische Wirkung
BCL-2	Bax
Bcl-X-L	Bak
Bcl-w	Bcl-X-S
Mcl-1	Bad
A1	Bid
	HrK
	Bim
	Bok

Tab. 5 Mitglieder der Bcl-2 Familie (modifiziert nach Antonsson & Martinou 2000)

Für die Apoptoseregulation der Bcl-2 Vertreter sind Protein-Protein Interaktionen verantwortlich. Viele Mitglieder dieser Familie können Homodimere bilden, jedoch ist die Heterodimerisierung von pro- und antiapoptotisch wirkenden Vertretern von größerer Bedeutung. Die Heterodimerisierung kann als gegenseitige Neutralisierung von pro- und antiapoptotischen Proteinen gesehen werden. Zellen mit höheren Anteilen proapoptotischer Proteine neigen eher zur Apoptose, während ein Überschuß an antiapoptotisch wirkenden Proteinen den Zelltod verhindert. Die beiden Proteine Bax und Bak enthalten die Regionen BH1, BH2 und BH3. Die Region BH4 ist nur teilweise ausgebildet. Die cytotoxische Aktivität dieser beiden Proteine hängt von der Region BH3 ab, sie vermittelt die Dimerisierung von Bax / Bak zwischen

Bcl-2, Bcl-X-L, Bid oder von sich selbst (Sattler et al., 1997). Bax wirkt dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 entgegen, je höher die Konzentrationen von Bax im Vergleich zu Bcl-2 liegen, desto höher ist dessen Wirkung. Die relativen Verhältnisse von Bax / Bax Homodimeren, Bcl-2 / Bax Heterodimeren und Bcl-2 / Bcl-2 Homodimeren sind ausschlaggebend für die Ausführung der Apoptose. Überwiegen Bax Homodimere, so kommt es zum Zelltod, ein Überwiegen von Bax / Bcl-2 Heterodimeren führt eher zum Überleben der Zelle (Sato et al., 1994). Jedoch wurde in einigen Arbeiten auch gezeigt, daß unabhängig vom Dimerisationsgrad Bcl-2 und Bcl-x die Apoptose inhibieren oder auch Bax die Apoptose fördern kann (St Clair et al., 1997; Zha & Reed, 1997)(Abb. 13). Zudem scheint die proapoptotische Wirkung von Bak unabhängig von der Heterodimerisierung mit Bcl-X-L und Bcl-2 zu sein (Simonian et al., 1997).

a:



b:

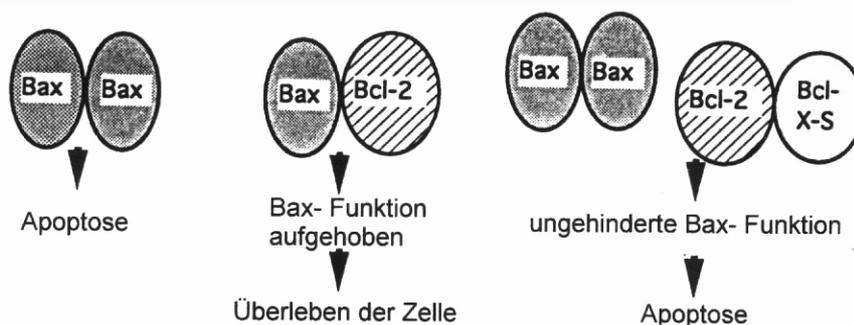


Abb. 13: Schaubilder über Protein- Protein Interaktion von Vertretern der bcl-2 Familie (a: modifiziert nach Mathers, 1998; b: Sato et al., 1994)

2.4.5.2 Lokalisation von Mitgliedern der Bcl-2 Familie in der Zelle

Die Vertreter der Bcl-2 Familie können sowohl membrangebunden als auch im Cytosol lokalisiert sein. Da einige Vertreter mit hydrophober Region membrangebunden auftreten und ein Fehlen dieser Region zu einer Lokalisation im Cytosol führt, wurde der hydrophobe C-terminus für die Membranbindung verantwortlich gemacht. Dies kann jedoch nicht verallgemeinert werden, denn Bax und Bcl-X-L werden auch im Cytosol gefunden, obwohl sie das hydrophobe C-terminus enthalten. Wird die Apoptose induziert, so scheint es für Bax spezifisch zu sein, sich, im Cytosol gelegen, den Mitochondrien anzulagern (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997). Von dieser Stelle aus assoziiert Bax mit Bcl-2 / Bcl-X-L. Unter normalen Bedingungen scheint die hydrophobe Region von Bax maskiert zu sein. In dieser Form befindet sich das Protein im Cytosol. Durch Proteininteraktionen während des Apoptosevorganges scheint sich die hydrophobe Region von Bax zu ändern und eine Verlagerung des Proteins in Richtung Mitochondrien stattzufinden. Die Verlagerung von Bax kann als wichtiger Bestandteil beim Ablauf der Apoptose gesehen werden (Antonsson & Martinou, 2000).

2.4.5.3 Regulation und Rolle der Cytochrom c- Ausschüttung

Eine Schlüsselfunktion von Bcl-2 Vertretern scheint darin zu liegen, die Ausschüttung von Cytochrom c von der mitochondrialen Zwischenmembran ins Cytosol zu regulieren (Adams & Cory, 1998; Antonsson & Martinou, 2000). Dementsprechend wurde gezeigt, daß die Zugabe von Bax zu isolierten Mitochondrien die Cytochrom c - Ausschüttung induziert. Dieser Mechanismus kann durch die Zugabe von Bcl-X-L unterdrückt werden (Jurgensmeier et al., 1998). Die Ausschüttung von Cytochrom c wiederum ist verantwortlich für die Aktivierung der Caspasenkaskade, die schließlich zur Apoptose führt. Bcl-2 Vertreter könnten ihre Wirkung vermitteln, indem sie Kanäle für den Proteintransport bilden. Dieser Erklärungsansatz basiert auf der Ähnlichkeit von Bcl-X-L zu bestimmten Giften wie zum Beispiel dem Toxin des Diphtheriebakteriums, welche Poren formende Eigenschaften aufweisen. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit könnten Bcl-2 Proteine somit die Bildung von Kanälen in die äußere mitochondriale Membran veranlassen.

Cytochrom c ist meistens in apoptotische Prozesse involviert, wird jedoch die Apoptose durch Zelltodrezeptoren induziert, ist der mitochondriale Weg oft nicht beteiligt. Diese Art von Zelltod wird somit auch nicht von Bcl-2 beeinflusst (Scaffidi et al., 1998). Die Ausschüttung von Cytochrom C scheint hierbei vielmehr ein Ergebnis der Caspasenaktivierung zu sein, als deren Ursache.

2.4.5.4 Caspasen: Ausführer der Apoptose

Da Caspasen (cysteine aspartyl protease) für die meisten sichtbaren Veränderungen während des Apoptosevorganges verantwortlich sind, können sie als zentrale Ausführer der Apoptose bezeichnet werden. Bezüglich des Zelltodes verursachen die Caspasen die meisten morphologischen Veränderungen, sie werden sowohl bei Säugetieren als auch bei Insekten und Nematoden gefunden (Earnshaw et al., 1999). Sie gehören zur Familie der Ced-3 like Cystein Proteasen (ced: cell death defective). Als erstes Homolog von ced-3 wurde bei Säugetieren ICE identifiziert (Yuan et al., 1993), welches Caspase 1 genannt wurde.

Die Caspasen 1 und 11 sind bei der proteolytischen Reifung von Cytokinen wie Interleukin 1-beta involviert, nehmen jedoch am Apoptoseprozeß nicht teil (Li et al., 1995; Wang et al., 1998). Die Caspasen -2, -3, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13, und -14 jedoch sind bei der Regulation und Ausführung der Apoptose maßgeblich beteiligt. Diese Caspasen werden während des Apoptosevorganges durch Spaltung aktiviert, was letztendlich die Apoptose vermittelt und ausführt (Wolf & Green, 1999; Thornberry et al., 1998). Die Caspasen werden als Präkursor Proenzyme synthetisiert, welche proteolytisch in ihre aktive Form umgewandelt werden, d.h. Procaspasen werden durch die Spaltung an einer bestimmten Aspartatposition aktiviert. Diese aktiven Caspasen enthalten einen katalytischen Cysteinbestandteil und eine kleinere Untereinheit, welche die Substratspezifität bestimmt (Zörnig et al.; 2001). Die Caspase 8 aktiviert sich selbst durch die Interaktion mit einem death receptor signaling complex und das aktive Enzym spaltet und aktiviert die Effektor Caspasen 3 und 7, welche die Apoptose ausführen (Krammer, 2000).

Die Caspasen 3, 6 und 7 werden auf diese Weise aktiviert und werden als Effektorcaspasen im Apoptoseprozeß gesehen. Diese Art der Aktivierung kann als Verstärkung des proapoptischen Signals gesehen werden. Die Caspase 9 benötigt diese proteolytischen Prozesse nicht, jedoch wird sie durch die Bindung mit APAF-1 aktiviert (Rodriguez & Lazebnik, 1999; Stennicke et al., 1999; Zörnig et al.; 2001). Der Komplex aus Apaf-1 und Caspase 9 stellt die aktive Form dar (Rodriguez & Lazebnik, 1999). Apaf-1 kann nicht nur als Aktivator gesehen werden, sondern stellt eine regulatorische Untereinheit dar (Hengartner, 2000).

Die Aufhebung der Caspaseaktivität führt zur Verlangsamung oder Verhinderung der Apoptose (Earnshaw et al., 1999). Generell führt die von Caspasen bedingte Spaltung von Zielproteinen zu deren Inaktivierung, jedoch können sie auch gezielt Proteine aktivieren. So wird den Caspasen eine besondere Bedeutung bezüglich der Aktivierung von Nukleasen zugesprochen, welche die Spaltung der DNA in Fragmente von 180 bp veranläßt. Die Bildung dieser Bruchstücke wird als Marker für die Apoptose verwendet. Es wurde gezeigt, daß sogenannte CAD (caspase – activated DNase) bei lebenden Zellen bereits in inaktiver Form (ICAD) vorliegen

liegen (Nagata, 2000). Die Aktivierung dieser Enzyme wird von der Caspase 3 vermittelt (Liu et al., 1997; Sakahira et al., 1998; Hengartner, 2000). Weiterhin spalten Caspasen nukleäre Bestandteile, welches zur Schrumpfung des Zellkerns führt (Buendia & Courvalin, 1999). Die Spaltung von Proteinen wie Fodrin und Gelsolin ist für den Verlust der Zellstruktur verantwortlich (Kothakota et al., 1997).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Effektorcaspasen im allgemeinen durch andere Caspasen aktiviert werden, während Initiatorcaspasen durch Protein-Protein Interaktionen aktiviert werden (Hengartner, 2000).

2.5 Nutritive Beeinflussung

Die Mucosa des gastrointestinalen Traktes steht mit der aufgenommenen Nahrung nicht nur direkt in Kontakt, sondern antwortet schnell auf die Art und Menge der Diät. Hungern der Tiere führt zum Beispiel zu einer Abnahme der Mitose im Colon, während eine Wiederaanfütterung zu einer erhöhten Mitoserate führt (Konishi et al., 1996). Die Wirkung der unterschiedlichen Nahrungsinhaltstoffe erstreckt sich nicht nur auf die Zellteilung, sondern auch auf die Apoptose. Für mehrere Nahrungsbestandteile wird eine Rolle in der Regulation der Apoptose diskutiert, so soll zum Beispiel der Gehalt von Vitamin B12 (Lewin & Weinstein, 1996) oder auch der Calcium- Gehalt der Nahrung (Penman et al., 2000) die Apoptose im Gastrointestinaltrakt beeinflussen. Weiterhin werden den Retinoiden Effekte auf die Apoptose zugesprochen (Pereira, 1999). Zu der in diesem Zusammenhang wohl am meisten diskutierten Stoffgruppe gehören die SCFA, welche im Dickdarmbereich aufgrund fermentativer Umsetzungsprozesse entstehen (Kapitel 2.3.3). Erste Hinweise, welche die Wirkung der SCFA beschreiben, wurden in der Entwöhnungsphase von Wiederkäuern beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, daß die SCFA an der Entwicklung des Pansens maßgeblich beteiligt sind (Tamate et al., 1962). In weiteren Studien konnte diese förderliche Wirkung auch für die Colonmucosa von Monogastriern bestätigt werden, so führte die Abnahme der SCFA- Konzentration im Colon zu einer Degeneration des Epithels. Eine Supplementierung von Butyrat, welches die deutlichsten Effekte auf die Epithelzellen ausübt, führte zu einer Regeneration der Mucosa (Sakata, 1987; Kripke et al., 1989). Gleichsinnig dieser wachstumsfördernden Wirkung wurde in Inkubationsstudien eine erhöhte Proliferation der Mucosa beobachtet (Bartram et al., 1993; Scheppach et al., 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Butyrat als Hauptenergiequelle für Enterocyten (Roediger, 1980; Scheppach, 1994) auf die Zellen des Colonepithels trophische Effekte zeigt (Kripke et al., 1989; Sakata & Yajima, 1984). Außerdem konnte Butyrat

mit einer Stimulation der Na- Absorption (Binder & Mehta, 1989) und Bicarbonatsekretion (Engelhardt, 1995) als auch mit einer erhöhten Mucussekretion (Finnie et al., 1995) in Verbindung gebracht werden.

2.6 Butyrat und Apoptose

	Effekt von Butyrat			
	normales Gewebe		neoplastisches Gewebe	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Apoptose	vermindert ^a	vermindert ^b	erhöht ^c	nicht bekannt
Proliferation	erhöht ^d	erhöht ^e	reduziert ^f	wahrscheinlich reduziert ^g
Differenzierung	unterdrückt ^h	unverändert ⁱ	induziert ^j	nicht bekannt

Tab. 6: Das Butyrat Paradoxon (modifiziert nach Young & Gibson, 1995)

a: Hass et al., 1997; b: Mentschel et al., 2002; c: Hague et al., 1993; d: Scheppach et al., 1992; e: Sakata, 1987; f: Kim et al., 1980; g: De Cosse et al., 1989; h: Gibson et al., 1992; i: Young & Gibson, 1991; j: Barnard & Warwick, 1993

Butyrat fördert nicht nur das Wachstum und die Proliferation der Colonmucosa, sondern wirkt auch auf die Apoptose der Colonocyten. Die Ergebnisse der verschiedenen Arbeiten scheinen sich jedoch zu widersprechen, denn während Butyrat in Tumorzellen in vitro das Wachstum inhibiert und die Differenzierung und die Apoptose fördert, stimuliert es das Wachstum normaler Zellen und inhibiert deren Apoptose. Dementsprechend wurde von Hass et al. (1997) berichtet, daß die Abwesenheit von Butyrat im Inkubationsmedium die Apoptose im Gewebe der Colonmucosa von Meerschweinchen fördert, welches einhergeht mit erhöhter Expression von Bax. Dieses Modell ist dem in vivo Ansatz näher als die Versuche mit Zelllinien. Bestätigt wurden diese Ergebnisse unter in vivo Bedingungen in eigenen Untersuchungen am Modell des Kälberpansens (Mentschel et al., 2002). Unterschiede zwischen den Survivaleffekt von Butyrat in vivo und den proapoptotischen Effekten in vitro bleiben jedoch unklar.

Der Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen metabolischen Aktivität liegen, denn normales und neoplastisches Gewebe unterscheiden sich bezüglich ihres Stoffwechsels, es findet ein Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechsel statt, welches einen Einfluß auf bestimmte Regelprozesse in der Zelle haben könnte (Jass, 1985).

Eine Zusammenfassung über die unterschiedlichen Effekte von Butyrat ist in Tab. 6 gegeben.

2.7 Zielsetzung

Der Einfluß der Nahrung auf den Gesundheitszustand des Organismus und speziell der Einfluß auf den Darm war in der vergangenen Zeit Schwerpunkt vieler Forschungsprojekte. Im Rahmen der nutritiven Beeinflussung der Proliferationsprozesse im Darm nahm die Regulation der Apoptose einen wichtigen Stellenwert ein.

Für Butyrat, ein Produkt der Kohlenhydratfermentation im Dickdarm, konnte eine Beteiligung am Apoptosegeschehen im Darm nachgewiesen werden. Die Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert, denn einerseits erhöht Butyrat die Apoptose in transformierten Zellen *in vitro* und andererseits scheint es die Apoptose *in vivo* zu vermindern. Aus diesen Gründen war es Ziel dieser Arbeit, die Wirkung von Butyrat *in vivo* durch Verfütterung von resistenter Stärke zu untersuchen. Neben der Klärung der Effekte unter *in vivo* Bedingungen sollte speziell die Frage geklärt werden, wie intrazelluläre Prozesse in die Regulation der Apoptose eingreifen. In diesem Zusammenhang wurden neben der Bestimmung von Mitose und Apoptose speziell die Effekte von Butyrat auf die Vertreter der Bcl-2 Familie untersucht.

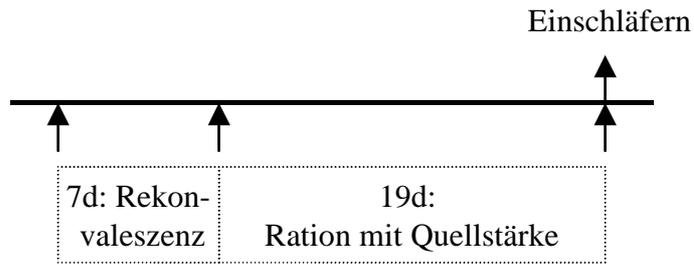
3 Material und Methoden

3.1 Tierversuch

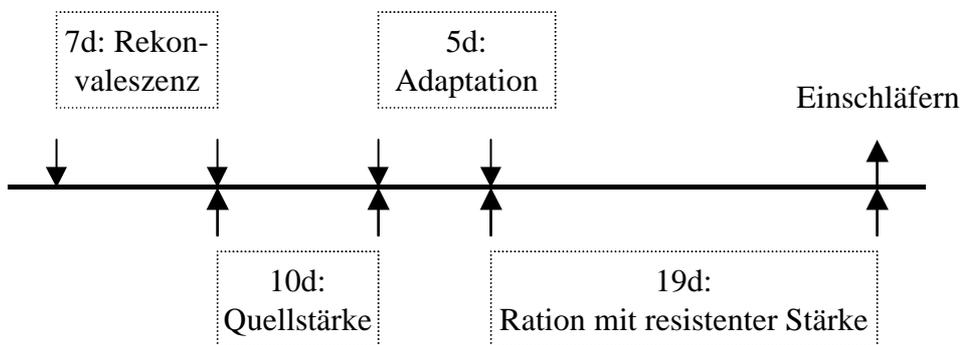
Der gesamte Versuch erstreckte sich auf den Zeitraum von September 2000 bis Februar 2001. Der Versuch wurde mit insgesamt 18 Versuchstieren durchgeführt, wobei jeweils 6 Schweine einer Gruppe zugeteilt wurden. Dabei wurden in zwei aufeinander folgenden Wiederholungen 3 verschiedene Fütterungsversuche durchgeführt.

Die Versuche gliederten sich in eine Kontrollgruppe (K) und 2 Behandlungsgruppen. Der Kontrollgruppe wurde Quellstärke als Hauptenergiequelle verabreicht. Die Behandlungsgruppen erhielten resistente Stärke als Hauptenergiequelle und unterschieden sich lediglich durch eine vorausgegangene Hungerphase voneinander, die Gruppe mit Hungerphase wurde Realignationsgruppe (RE), die ohne Hungerphase Resistente- Stärke- Gruppe (RS) genannt (Abb. 14).

Kontrollgruppe:



RS- Gruppe:



RE- Gruppe:

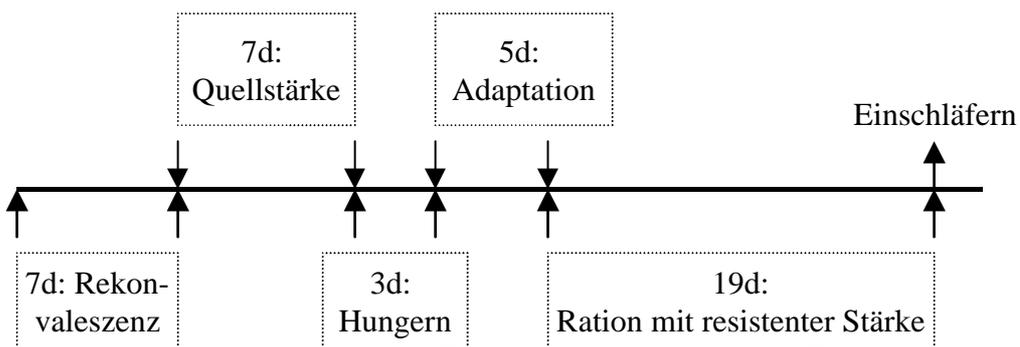


Abb. 14: Versuchsplan

Den Versuchstieren wurde jeweils eine Woche vor Versuchsbeginn operativ ein Venenverweilkatheter verlegt. Die einwöchige Rekonvaleszenz wurde veranschlagt, damit sich die Tiere ausreichend erholen konnten und eventuelle Nachwirkungen aus der Operation sich nicht nachteilig auf den Versuch auswirken konnten.

Die Kontrollgruppe erhielt für einen Zeitraum von 19 Tagen die Ration mit Quellstärke. Die RS- Gruppe erhielt parallel zu dieser Fütterung die Ration mit resistenter Stärke, jedoch wurde der 19- tägigen Versuchszeit eine Adaptationszeit und eine Quellstärkephase vorgeschaltet. Die Quellstärkephase sollte eine Beeinflussung der morphologischen und histologischen Parameter der Darmmucosa in Richtung Kontrollgruppe gewährleisten, um die aus der anschließenden Fütterung mit resistenter Stärke resultierenden Unterschiede eindeutig auf die RS zurückführen zu können. Da sich bei der Umstellung von einer Ration mit hoher praecaecaler Verdaulichkeit auf eine Ernährung mit niedriger praecaecaler Verdaulichkeit die Mikroflora im Dickdarmbereich adaptieren muß, wurde entsprechend der Literatur eine fünf- tägige Adaptationszeit durchgeführt (Topping et al., 1993).

Mit der RE- Gruppe wurde bis auf eine eingeschobene Hungerphase von 3Tagen identisch wie mit der RS- Gruppe verfahren. Die RE- Gruppe diente als Vergleich zur RS- Gruppe. Es sollte untersucht werden, ob Unterschiede bezüglich der Darmmucosa, welche durch Degenerationsphänomene während der Hungerphase verursacht werden, trotz anschließender gleicher Behandlung mit resistenter Stärke bis zum Zeitpunkt des Einschläferns weiterbestehen oder kompensiert werden können.

Der Versuchsablauf führte dazu, daß die Tiere, welche mit resistenter Stärke gefüttert wurden, zum Zeitpunkt des Einschläferns älter und damit schwerer waren als die Tiere der Kontrollgruppe. In dem vorliegenden Versuch ging es vorrangig um die Wirkung von Butyrat auf die gastrointestinale Mucosa via Verfütterung von resistenter Stärke, sodaß der Gewichtsunterschied keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben dürfte. Da in zahlreichen Studien Ergebnisse verschiedener Spezies miteinander verglichen werden, dürfte somit ein geringer Altersunterschied für die bearbeitete Fragestellung unerheblich sein.

3.1.1 Versuchstiere

Verwendet wurden männliche Kastraten der Rasse Deutsche Landrasse x Pietrain. Sie wurden einerseits von der Versuchsstation Unterer Lindenhof der Universität Hohenheim und andererseits vom Staatsgut Osterseeon, Ebersberg in Bayern bezogen. Die Schweine der beiden Herkünfte wurden gleichmäßig auf die drei Fütterungsgruppen aufgeteilt. Das durchschnittliche Gewicht der Schweine betrug bei Versuchsbeginn 62,8 (55- 72) kg.

3.1.2 Verlegen des Venenverweilkatheters

Um für die Fragestellung relevante Parameter im Blut bestimmen zu können, wurde für eine frequente aber dennoch belastungsfreie Gewinnung von Blut den Tieren 7 Tage vor Ver-

suchsbeginn ein Venenverweilkatheter gelegt. Die Operationstechnik erfolgte nach einer am Fachgebiet etablierten Methode (Claus & Gimenez, 1977). Der Verweilkatheter in Form eines Silikonschlauches wurde dabei in die Vena cephalica in der Gegend des Buggelenkes verlegt, verlief okzipital und dorsal unter der Haut und wurde an der Austrittsstelle am Nacken des Tieres in einer Segeltuchtasche verstaut. Details der Verlegung der Venenverweilkatheter sind der Dissertation von Zeifang (2000) zu entnehmen. Die Kanulierung und die Durchführung des Versuches erfolgten im Rahmen eines genehmigten Tierversuchs.

3.1.3 Haltung der Tiere

Um eine exakte Futteraufnahme der einzelnen Tiere zu gewährleisten als auch eine Beschädigung der Katheter durch gegenseitigen Kontakt zu vermeiden, wurden die Tiere in Einzelboxen aufgestellt. Weiterhin wurden die Tiere einstreulos gehalten, um eine unkontrollierbare Aufnahme von Einstreu zu verhindern. Der wärmegeämmte Betonboden sicherte die für die Gesundheit der Tiere förderliche Isolation. Obwohl die Tiere einstreulos gehalten wurden, wurde die Sauberkeit der Tiere nicht negativ beeinflusst, denn es standen pro Schwein ca. 7m² Grundfläche zu Verfügung. Um eine ausreichende Beschäftigung der Tiere zu sichern, wurden neben der intensiven Tierbetreuung in den Buchten Eisenketten zum Spielen angebracht. Außerdem bestand durch die gitterförmige Absperrung Sichtkontakt zwischen den Versuchstieren. Neben den für Schweine konzipierten Futtertrögen und Selbsttränken sorgte das bestehende Lüftungssystem für das Wohlbefinden der Tiere.

3.1.4 Fütterung

Grundvoraussetzung für den Versuch war eine dem Alter der Schweine bedarfsgerechte Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Dabei sollte die K- Gruppe eine Ration mit hoher praecaecaler Verdaulichkeit erhalten, die Behandlungsgruppen eine Ration mit niedriger praecaecaler Verdaulichkeit, welche die mikrobielle Bildung speziell von Butyrat fördert. Um das Schwein auch als Modell für humane gastrointestinale Fragestellungen anzubieten, sollten die Hauptkomponenten aus Substanzen bestehen, welche auch in der menschlichen Ernährung eingesetzt werden.

Die Komponenten der beiden Rationen bestanden demzufolge aus verschiedenen Kartoffelstärken, Kartoffeleiweiß, Weizenkleber, Weizenkleie, Mineralien und Vitaminen (Tab. 7). Kartoffeleiweiß und Weizenkleber wurden aufgrund ihrer hohen Proteingehalte eingesetzt. Weizenkleie wurde wegen des hohen Rohfasergehaltes verfüttert, somit konnte mit relativ wenig Weizenkleie eine ausreichende Versorgung an Rohfaser gewährleistet werden. Die verabreichte Stärke aus Kartoffeln diente jeweils als Hauptenergiequelle. Die K- Gruppe erhielt Quellstärke, die bereits im Dünndarm enzymatisch aufgespalten wird, so daß den Tieren

hauptsächlich Glucose als Energiequelle bereitstand. Die Rohstärke aus Kartoffeln (Behandlungsgruppen) hingegen wird aufgrund ihrer niedrigen praecaecalen Verdaulichkeit vermehrt zu SCFA im Dickdarm der Tiere umgewandelt und fördert speziell die Bildung von Butyrat (Martin et al., 1998). Die Stärken wurden von der Firma Südstärke in Schrobenhausen (Deutschland) bezogen. Die rohe Kartoffelstärke wird unter der Bezeichnung „Kartoffelstärke Superior“ und die Quellstärke unter der Bezeichnung „Spezialstärke 6007“ gehandelt. Unterschiede zwischen beiden Stärken werden durch eine thermische Behandlung im Falle der Quellstärke erzielt.

Da resistente Stärke aufgrund energetischer Verluste durch die mikrobielle Fermentation und der geringen energetischen Effizienz von SCFA gegenüber Glucose im Intermediärstoffwechsel niedriger bewertet werden muß, war es nötig, den tatsächlichen Gehalt von resistenter Stärke in den jeweiligen Stärkearten zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde mit der Quellstärke als auch mit der rohen Kartoffelstärke ein in vitro- Verdauungsversuch nach den Methoden von Morales et al. (1997) und Saura- Calixto et al. (1993) durchgeführt.

3.1.4.1 Berechnung der Futterrations

Aufgrund der Ergebnisse des in vitro Verdauungsversuches wurde bei der Berechnung davon ausgegangen, daß Quellstärke keine resistente Stärke enthält, bei roher Kartoffelstärke wurde jedoch ein Gehalt von 80% ermittelt. Diese Werte entsprechen den Angaben aus der Literatur, bei denen für rohe Kartoffelstärke ein Gehalt an resistenter Stärke von 78- 85% angegeben wird (Morales et al., 1997; Saura- Calixto et al., 1993; Faisant et al., 1995). Da die Energieverluste beim Schwein bei etwa 40% liegen, wurde der Energiewert von resistenter Stärke mit nur ca. 60 % im Vergleich zur Quellstärke bewertet. Die Art der Berechnung wurde aus dem für Schweine typischen Bewertungssystem für bakteriell fermentierbare Substanz (BFS) abgeleitet, bei dem sich der energetische Wert der im Dickdarm fermentierten Substanz auf etwa 60 % des Energiewertes der im Dünndarm abgebauten Kohlenhydrate beläuft (Kirchgessner, 1997).

Weiterhin wurde bei der Rationszusammenstellung darauf geachtet, daß die Tiere der verschiedenen Fütterungsgruppen ähnliche Mengen der Einzelkomponenten erhielten und somit bezüglich Energie- und Proteinversorgung gleichgestellt waren. Da die rohe Kartoffelstärke jedoch für die Tiere einen geringeren Wert an umsetzbarer Energie darstellt, wurde den Tieren der Behandlungsgruppen mehr Futter pro Tag zugeteilt, um eine identische energetische Versorgung der Tiere zu gewährleisten (Tab. 7/ Tab. 8/ Tab. 9).

Tab. 7: Zusammensetzung der Futterrations

Material und Methoden

Komponente	Ration mit Quellstärke		Ration mit resistenter Stärke	
	g/kg TS	g/d TS	g/kg TS	g/d TS
Quellstärke	523	1146		
rohe Kartoffel- stärke			615,5	1690
Kartoffeleiweiß	54,8	120	43,6	120
Weizenkleber	91,4	200	72,8	200
Weizenkleie	306,3	670	243,9	670
Mineralien und Vitamine	24,2	53	24,2	66
XP	173,5	380,5	138,7	381
MJ ME	14,13	31	11,28	31

Tab. 8: Nährstoffgehalte der Ration mit roher Kartoffelstärke (pro kg Trockensubstanz)

Komponente	g/kg TS	MJ ME/ kg TS	XP g/ kg TS
rohe Kartoffel- stärke	615,5	6,77	1,84
Kartoffeleiweiß	43,6	0,80	36,7
Weizenkleber	72,8	1,42	61,3
Weizenkleie	243,9	2,29	38,9
Mineralien und Vitamine	24,2		
Gesamtration	1000	11,28	138,7

Tab. 9: Nährstoffgehalte der Quellstärkeration (pro kg Trockensubstanz)

Komponente	g/kg TS	MJ ME/ kg TS	XP g/ kg TS
Quellstärke	523	8,48	1,97
Kartoffeleiweiß	54,8	1,0	46,0
Weizenkleber	91,4	1,78	76,89
Weizenkleie	306,6	2,87	48,85
Mineralien und Vitamine	24,2		
Gesamtration	1000	14,13	173,7

3.1.4.2 Wiegen der Tiere

Neben der Erfassung des Körpergewichtes zu Versuchsbeginn und –ende wurden die Tiere der RS und RE Gruppe einmal pro Woche und die der Kontrollgruppe aufgrund der allgemein kürzeren Versuchszeit zweimal pro Woche gewogen. Diese relativ frequente Gewichtserfassung wurde gewählt, um in der kurzen Behandlungszeit ausreichend Daten für den Gewichtsverlauf zu erhalten. Das Wiegen erfolgte standardisiert nach der Futteraufnahme.

3.1.5 Ablauf der Fütterung

Das für jedes Tier täglich eingewogene Futter wurde auf zwei Mahlzeiten verteilt. Die Fütterung erfolgte jeweils um 8 und 15 Uhr. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die Vermischung von Quellstärke mit Speichel beim Fressen zu Problemen bei der Futteraufnahme führte, denn Quellstärke bildet mit etwas Flüssigkeit eine klebrige und damit schlecht abschluckbare Masse. Aus diesem Grund wurde diese Ration mit ausreichend Wasser (im Verhältnis 1:1) vermischt, welches aufgrund des hohen Flüssigkeitsgehaltes zu einer verbesserten Aufnahme führte. Die Ration mit resistenter Stärke konnte hingegen aufgrund geringerer Klebeeigenschaften trocken verfüttert werden. Beim gesamten Versuch und besonders bei der Variante der Flüssigfütterung wurde auf eine stringente und regelmäßige Reinigung und Hygiene der Futtertröge geachtet.

3.1.6 Probenentnahme

3.1.6.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte zweimal am Tag, um 10 und 17 Uhr, jeweils zwei Stunden nach der Fütterung über die Venenverweilkatheter. Die Blutprobe (10 ml) wurde in ein hepariniertes Röhrchen gefüllt und 15 min. bei 3000 U/ min und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde bei –20°C tief gefroren. Nach jeder Blutentnahme wurde der Katheter mit einer Heparinlösung (1g Heparin/ 1 Kochsalzlösung, versetzt mit 50ml Gentamycin) gespült. Zur Desinfektion wurde der Dreiwegehahn mit 70%igem Alkohol mit H₂O₂- Zusatz (3%) durchgespült. In dieser Arbeit werden jedoch die im Blut gemessenen Parameter nicht dargestellt.

3.1.6.2 Erfassung von Kotproben

Zur Erfassung der gebildeten SCFA als auch der Trockensubstanz wurde darauf geachtet, möglichst frische Kotproben zu sammeln. Dies erfolgte stets unmittelbar nach der Blutprobenentnahme am Vormittag. Der Kot wurde auf zwei Szintillationsgefäße aufgeteilt und bei –20°C tief gefroren.

3.1.6.3 Einschläfern der Tiere und Entnahme der Gewebeproben

Für die immunocytochemische Auswertung und analytischen Meßmethoden der Gewebeproben war es erforderlich, das Gewebe so schnell wie möglich nach Eintreten des Todes zu fixieren bzw. in flüssigem Stickstoff einzugefrieren. Die Tiere wurden durch Infusion von 20-30 ml Narcodorm- n® (Alvetra, Neumünster) eingeschläfert. Unmittelbar nach dem Herztod wurde der Bauchraum eröffnet und das gesamte Darmpaket entnommen. Neben den in dieser Arbeit dargestellten Bereichen des Colons wurde auch aus Duodenum und Jejunum Gewebe sichergestellt (Abb. 15). Die benötigten Darmbereiche wurden mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gespült, um den Verdauungsbrei ohne Gewebsverletzungen zu entfernen. Anschließend wurde das entnommene Gewebe für verschiedene Fragestellungen aufgearbeitet und fixiert (siehe Kapitel 3.2).

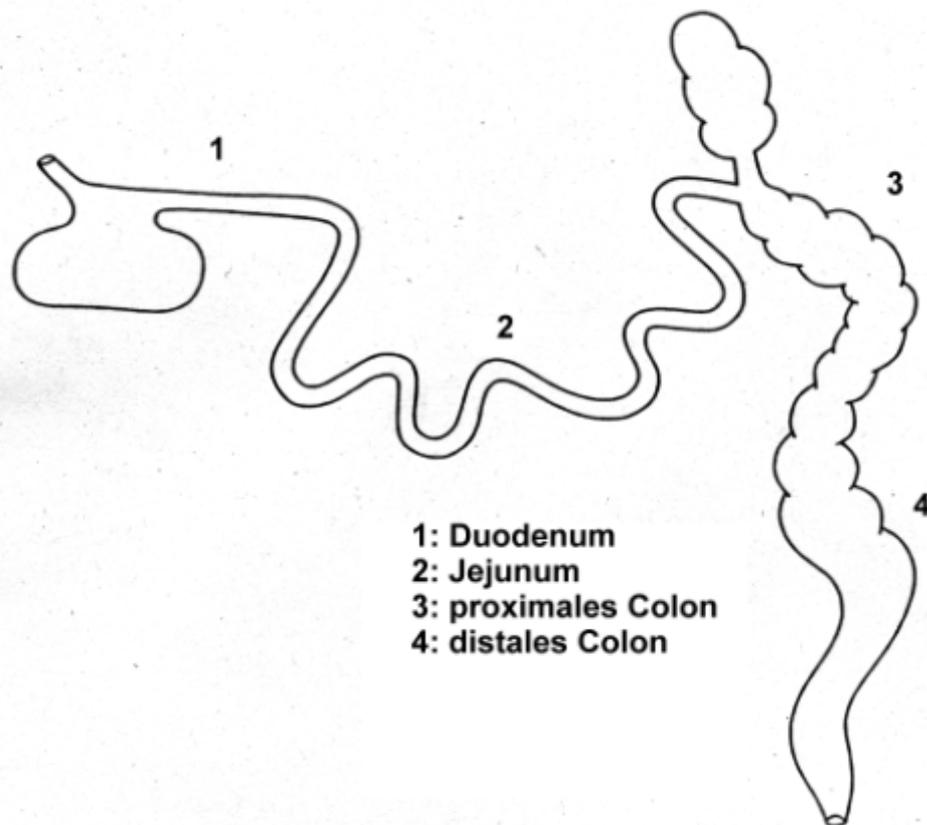


Abb. 15: Gewebentnahmeregionen (nach Raab, 1998)

3.2 Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben

3.2.1 Aufarbeitung für analytische Nachweismethoden

Das gewonnene, bereits gereinigte Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff tiefgefroren, anschließend in Alupapier eingewickelt und mit einem Stößel zerkleinert. Die auf diese Art gewonnenen Gewebstückchen wurden daraufhin im Ultrafreezer gelagert.

3.2.2 Fixation des Gewebes für Immunocytochemie

Für die immunocytochemische Färbemethoden wurde das Gewebe mit 4%igem Formalin fixiert (Romeis, 1989). Für eine ausreichende Haltbarkeit mußte das Gewebe ausreichend lang fixiert werden, jedoch sollte die Dauer im Fixationsmedium nicht zu lange sein, damit das Färberesultat der verschiedenen Antikörper nicht negativ beeinflußt wird. Somit wurde das Gewebe während der Fixation stichprobenartig auf eine ausreichende Fixierung getestet. Nach 24h war der Fixationsprozess abgeschlossen. Bis zum Einbetten in Paraffin wurde das Gewebe in Phosphatpuffer gelagert. Um für die statistische Auswertung auf genügend Gewebe zurückgreifen zu können, wurden pro Region jeweils drei Proben entnommen.

3.2.3 Fixation des Gewebes für Elektronenmikroskopie

Um sich die Möglichkeit offen zu halten, auf weitere Untersuchungsverfahren wie zum Beispiel die Rasterelektronenmikroskopie zurückgreifen zu können, wurde parallel zur Fixation für die Immunocytochemie Darmgewebe mit Glutaraldehyd fixiert (Tab. 10). Die Lagerung der Proben erfolgt am Institut für Veterinär Anatomie, -histologie und -embryologie von Herrn Prof. Leiser (Justus- Liebig- Universität, Gießen).

Tab. 10: Fixation der Gewebeproben

Medium	Dauer der Fixation	Zwischenlagerung	Lagerung/ Einbettung
N ₂	10-15 min	--	-80°C
Formalin		Phosphatpuffer +4°C	Paraffin- blöckchen
Glutaraldehyd	4-5h	Phosphatpuffer +4°C	Epon

3.2.4 Einbetten des Gewebes

Die für die Immunocytochemie fixierten Gewebsschnitte wurden nach einem Standard-Verfahren in Paraffin eingebettet (Romeis, 1989).

3.3 Immunocytochemie

3.3.1 Durchführung der Immunocytochemie

Mit einem Schlittenmikrotom wurden aus dem in Paraffin eingebetteten Gewebe 2-3µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf silanbeschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeofen getrocknet (<60°C). Die Vorgehensweise der Färbemethode war bei allen verwendeten Antikörpern ähnlich, so wurden die im Wärmeofen getrockneten Gewebsschnitte in einem Chloroformbad 30min. entparaffiniert. In einer absteigenden Alkoholreihe wurden sie langsam dem Wasser zugeführt. Nach dem Spülen in Citratpuffer wurden die Objektträger 6 mal 5min. in einem Mikrowellenofen in Citratpuffer gekocht, um die Antigene zu demaskieren und somit die Sensibilität der Antikörper zu erhöhen, ohne jedoch die Spezifität zu beeinträchtigen (Pellicer & Sundblad, 1994). Um endogene Peroxidaseaktivitäten zu blocken, wurden die Schnitte in einer Methanol- H₂O₂- Lösung für 15. min. inkubiert. Nach dem Spülen in Aqua dest. wurden die Gewebsschnitte zum Blockieren der unspezifischen Bindung mit einem Blutserum jener Spezies, in der auch der zweite Antikörper erzeugt wurde, in einer Feuchtkammer bei einer Verdünnung von 1:10 mit TBS- BSA- Lösung 30 min. inkubiert. Nach Abtropfen des Serums wurde der Erstantikörper aufgetragen, anschließend wurden die Präparate in einer Feuchtkammer über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Als Nächstes erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers für einen Zeitraum von 30 min. Da der Zweitantikörper, welcher an den ersten binden kann, mit Biotin konjugiert war, wurde ein Peroxidasekonjugierter Avidin- Biotin- Komplex (ABC) ebenfalls für 30 min. zugegeben. Schließlich wurde die Färbung der Schnitte mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid) entwickelt, mit Hämatoxylin nach Mayer 30 sec. gegengefärbt und mit Histogel eingedeckt (Romeis, 1989).

Zwischen den Reaktionsschritten erfolgte jeweils eine Inkubation der Schnitte in TBS, lediglich vor Inkubation des Erstantikörpers wurde darauf verzichtet. Die Negativkontrolle wurde jeweils durch Weglassen des Erstantikörpers erhalten.

3.3.2 Verwendete Reagenzien für die Immunocytochemie

Die verwendeten Reagenzien wurden wie in Tab. 11 dargestellt angesetzt.

Tab. 11: Verwendete Reagenzien für Immunocytochemie

Reagenzien	Zusammensetzung	pH- Wert	Gebrauchslösung/ Besonderheiten
TBS- Stammlösung (Tris buffered saline)	60,6g Tris Ultrapure (Merck 1083820500) 163,6g NaCl 2000 ml Aqua dest.	7,5	1:10 mit Aqua dest.
Citratpuffer	21g Citronensäuremonohydrat (Merck 244) 1 l Aqua dest.	6,0	1:10 mit Aqua dest.
Substratpuffer	21g Citronensäuremonohydrat (Merck 244) 34g Imidazol (Fluka 56749) 29,2g NaCl 500ml Aqua dest.	7	unverdünnt
Methanol- H ₂ O ₂ - Lösung	250 ml Methanol 6ml H ₂ O ₂ (30%) (Roth 80702)	--	unverdünnt
TBS- BSA	100mg bovines Serum Albumin (BSA, Merck, 1120180100) 100ml TBS	--	eine Woche im Kühlschrank haltbar
StreptAB- Complex/HRP	1ml TBS- BSA 5 µl Reagenz A 5 µl Reagenz B (Dako, K3077)	--	30 min. vor Gebrauch ansetzen
DAB (3,3`-Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid)	100mg DAB (Fluka, 32750) 20ml Substratpuffer 66,6µl H ₂ O ₂ 200 ml Aqua dest.	--	dunkel lagern, vor Gebrauch filtrieren

3.3.3 Verwendete Antikörper

Unter Verwendung des dargestellten Färbeschemas wurden verschiedene immunocytochemische Färbungen durchgeführt. Sie dienten zur Erfassung der Mitose, von EGF und proapoptotischer als auch antiapoptotischer Genprodukte, welche maßgeblich an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Aufgrund antikörperspezifischer Eigenschaften wurde das Färbeprotokoll an die unterschiedlichen Antikörper angepaßt (Tab. 12).

Tab. 12: Verwendete Antikörper

Erst-antikörper	Funktion	Eigenschaft	Bezug	Besonderheiten/ Verdünnung/ Blocken	Zweit-antikörper
bax (p- 19): sc- 526	proapoptotisch	polyclonal rabbit	Santa Cruz, California, USA	1 : 200 Sheep- Serum	sheep- anti- rabbit ^a (1:400)
bak (A3538)	proapoptotisch	polyclonal rabbit	Dako, Hamburg, Deutschland	40min. Mikrowelle 1:100 Sheep- Serum	sheep- anti- rabbit (1:400)
bcl-2 (M0887)	antiapoptotisch	monoclonal mouse	Dako, Hamburg, Deutschland	1:80 Rabbit- Serum	rabbit- anti- mouse ^b (1:400)
Ki- 67 (MIB 1, E059)	Mitosenachweis	monoclonal mouse	Histoprime, Camon, Wiesbaden, Deutschland	1:4 Goat- Serum	goat- anti- mouse ^c (1:400)
EGF	Wachstums- Reparaturfaktor	polyclonal rabbit	Institut für Tierhaltung	1:1000 Sheep- Serum	sheep- anti- rabbit (1:400)

a: sheep- anti- rabbit IgG, biotinyliert, Biozol, Eching, Deutschland, 2AB02B

b: rabbit- anti- mouse, biotinyliert F(ab`)₂, Dako, Hamburg, Deutschland, E0413

c: goat- anti- mouse IgG, biotinyliert, Dako, Hamburg, Deutschland, E0433

Die verwendeten Antikörper wurden jeweils mit der TBS- BSA- Lösung verdünnt. Der Nachweis von Bax im Colongewebe erwies sich aufgrund nichtspezifischer bzw. nicht zufriedenstellender Färberesultate als problematisch. Versuche, mit Seren anderer Spezies zu blocken als auch die Antigenstellen mit proteolytischen Enzymen zu demaskieren, führten nur zu einer geringen Verbesserung.

3.3.4 Apoptose- Nachweis

Der Apoptose- Nachweis wurde nach einer von Gavrieli et al.(1992) modifizierten Methode durchgeführt. Diese Färbung wird als TUNEL- Methode (terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated dUTP nick end labeling) bezeichnet. Die Proben wurden nach herkömmlichen Verfahren entparaffiniert und dem Wasser langsam zugeführt. (Das Entparaffinieren als auch das langsame Zuführen zu Wasser entsprechen der Vorgehensweise des bereits beschriebenen herkömmlichen Färbeprotokolls.) Um eine Andauung der nukleären Proteine zu erreichen, wurden die Gewebsschnitte 10 min. mit Proteinase K inkubiert. Nach der Behandlung mit 2%igem H₂O₂ (5 min.) wurden die Schnitte in einer Feuchtkammer mit TdT- Puffer benetzt (10 min.). Bei der anschließenden einstündigen Inkubation (37°C) vermittelte die terminale deoxynucleotidyl Transferase die Polymerisation von Biotin- 16- dUTP an die freien 3'- OH- Enden der DNA- Fragmente. Als Nächstes erfolgte eine Spülung der Präparate in TB- Puffer für 2 x 5 min. und eine Behandlung mit einer BSA- TBS- Lösung für 20 min. Der StreptAB- Complex/ HRP wurde zur Detektion des Biotins verwendet. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Färbung in DAB, die weitere Vorgehensweise wie Gegenfärben und Eindecken entsprach dem üblichen Verfahren für Immunocytochemie. Weiterhin wurden die Gewebsschnitte vor und nach der Inkubation mit H₂O₂ mit Aqua bidest. gespült. Nach der Behandlung mit TB- Puffer, BSA- TBS- Lösung und StreptAB- Complex/ HRP wurden die Schnitte für jeweils 2 x 5min. in TBS gestellt. Positivkontrollen wurden erhalten, indem die Schnitte mit DN Puffer für 10 min. und anschließend mit DNAase I inkubiert wurden. Dieser Behandlungsschritt führt zur Spaltung der DNA in sämtlichen Zellen und bewirkt eine intensive Färbung aller Zellkerne. Negativkontrollen wurden durch das Weglassen der Transferase erhalten. Eine Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien ist aus Tab. 13, Tab. 14 und Tab. 15 zu entnehmen.

Tab. 13: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung	pH
TBS 0,05M	6,1g Tris Ultrapure (Merck, 1083820500) 37ml 1n HCl 9g NaCl 1000 ml Aqua bidest.	7,6
TB	1,75g NaCl 0,88g Na- Citrat 100ml Aqua bidest	8
TdT	0,36g Tris Ultrapure (Merck 1083820500) 3,0g Na- Cacodylat (Merck 1032560100) 0,024g Kobaltchlorid (Merck 1592420050) 100ml Aqua bidest	7,2
Tris- HCl 0,05 M	6,1g Tris 37ml 1 N HCl 1000 ml Aqua bidest	7,6
DN	3,63g Tris 29,96g Natriumcacodylat 0,81g Magnesiumchlorid 0,0154g DTT (Dithiothreitol, Sigma, D9779) 1000ml Aqua bidest	7,2
PBS 0,01M	1,48g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,43g KH ₂ PO ₄ 7,2g NaCl 1000ml Aqua bidest	7,4
TBS- BSA	10 ml TBS- Puffer 300mg BSA	

Tab. 14: Zusammensetzung des Inkubationsmediums

Zusammensetzung des Inkubationsmediums	Inkubationsbedingungen
25U/ 25µl terminale deoxynukleotidyl Transferase, (Böhringer, 220582, Originallösung mit PBS/ Glycerin 50% (v/v) 1:25 verdünnen)	60min. 37°C feuchte Kammer
5nM/ 50µl Biotin dUTP, (Böhringer, 1093070, Originallösung mit PBS 1:10 verdünnen)	
500µl TdT Puffer	

Tab. 15: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Zusammensetzung
H ₂ O ₂ - Lösung	5ml H ₂ O ₂ (30% ig) 70ml Aqua bidest
DNAase	250U/ 250µl DNAase, (Böhringer, 776785, Originallösung 10000U mit 10ml Tris- HCl Puffer/ Glycerin 50% (v/v) verdünnen)
Proteinase- K	10µg Proteinase- K (Fluka 82456) 1 ml TBS
3,3'- Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid	50mg DAB (Fluka 32750) 200ml TBS 93,3µl H ₂ O ₂

3.4 Auswertung der Gewebsschnitte

Um den Effekt der Behandlung anhand der immunocytochemischen Parameter zu erfassen, wurden die gefärbten Gewebsschnitte des distalen und proximalen Colons im Lichtmikroskop ausgewertet. Untersucht wurde vorrangig die Epithelschicht der Darmmucosa. Neben der Intensität/ Spezifität der Färbung wurde vor allem die Lokalisation der angefärbten Zellen entlang der Krypte untersucht. Entsprechend dem in Abb. 16 dargestellten Auswertungsschema wurde die Lamina epithelialis mucosae der Hemikrypten in drei gleich große Auszählfelder unterteilt, indem die Gesamtzellzahl des einschichtigen Epithels ausgezählt und durch drei dividiert wurde. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen wurde im Verhältnis zur Gesamtzellzahl der jeweiligen Auszählungsfelder dargestellt (Mitosefärbung) oder als Anzahl pro Kompartiment bzw. Hemikrypte dargestellt. Neben der Ermittlung der angefärbten Zellen in den

einzelnen Kompartimenten entlang der Kryptenachse wurde auch die Anzahl in der gesamten Hemikrypte ermittelt. Ausgewertet wurden nur intakte vollständig dargestellte Krypten, deren basales Kompartiment direkt an die Lamina muscularis mucosae anschloß.

Zur Erfassung morphologischer Unterschiede wurde die Epitheldicke des Gewebes bestimmt, indem die Gesamtzellzahl entlang der Kryptenachse ausgezählt wurde.

Pro Versuchstier und Region wurden mindestens 30 Krypten ausgewertet. Jeder Parameter wurde stets von nur einer Person bearbeitet. Um die Auswertung der Gewebsschnitte neutral bzw. objektiv zu gestalten und nicht durch Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit Einfluß darauf zu nehmen, wurden die Objektträger mit Nummern codiert.

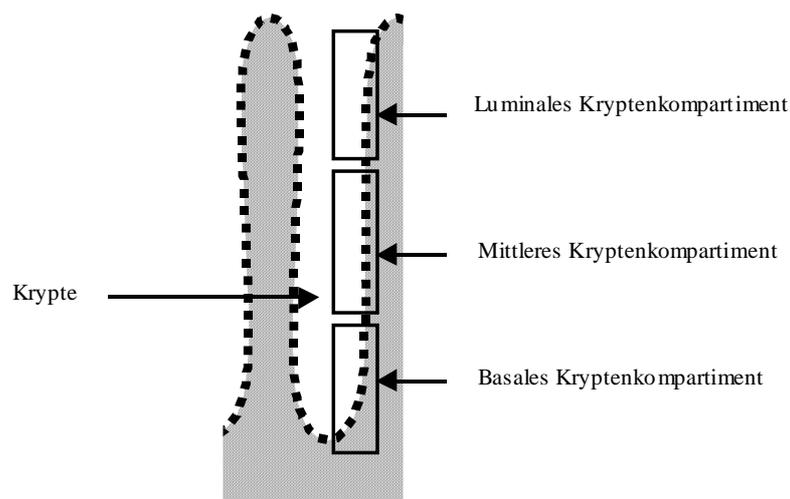


Abb. 16: Auswertungsschema

Die Auszählung erfolgte mit einem Lichtmikroskop der Marke Leitz (DM RBE) bei einer Objektivvergrößerung von 40. Zur Übersicht wurde die Objektivvergrößerung 20 verwendet,

zum Erkennen von Detailstrukturen die Objektivvergrößerung 100. Zur Dokumentation wurden spezifische Gewebsregionen photographiert. Verwendet wurde hierzu die Kamera Leitz Wild MPS 52 (Heerburgg Schweiz) und der Film Kodak Professional 100T.

3.5 Analytische Methoden

Für die Auswertung mittels analytischer Verfahren wurden etablierte Verfahren verwendet, die nachfolgend zitiert sind. Details sind den Originalzitataten zu entnehmen.

3.5.1 Messung des pH- Wertes im Kot

Die verwendete Methode wurde von Topping et al. (1993) beschrieben. Jeweils 0,5g Kot wurde mit der 4-fachen Menge Aqua bidest vermischt und 15min. lang bei 3000 G zentrifugiert. Der pH- Wert wurde im Überstand mittels einer pH- Elektrode ermittelt.

3.5.2 Bestimmung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA)

Die SCFA wurden gaschromatographisch in Anlehnung an Tangerman und Nagengast (1996) erfaßt. Jeweils 0,4g Kot wurden mit Aqua bidest auf 0,5g aufgefüllt. Nach Zugabe von 2,5ml 0,25 M Schwefelsäure wurde das Gemisch 5 min. bei 3000G zentrifugiert. 1.5 ml des Überstandes wurden wiederum bei 14000 G für 10 min. zentrifugiert und 900µl davon zu 100µl von 19,6 µmol/ ml 2- Methylvaleriansäure als Internen Standard pipettiert. Details sind aus der Veröffentlichung Claus et al. 2003 zu entnehmen. Die Ergebnisse wurden auf den Trockenmassegehalt (TM) bezogen, welcher mittels einer herkömmlichen Methode ermittelt wurde (Aerts et al. 1974).

3.6 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM wiedergegeben. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov – Smirnov – Test. Bei den analytischen Ergebnissen wurden Gruppenunterschiede mittels t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Unterschiede zwischen Fütterungsphasen innerhalb der Gruppe erfolgte mittels t-Test für abhängige Stichproben. Für die Berechnung der histologischen/ immunocytochemischen Daten wurde für jedes Tier der Mittelwert positiv gefärbter Zellen in den einzelnen Regionen von mindestens 30 Hemikrypten ermittelt. Von diesen Mittelwerten \pm SEM wurden Gruppenmittelwerte berechnet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ermittelt, die Unterschiede zwischen Regionen anhand des t-Testes für abhängige Stichproben.

Sämtliche Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 11; Chicago; USA durchgeführt.

Folgende Wahrscheinlichkeitsgrenzen wurden festgelegt:

- ns (nicht signifikant): $p > 0,05$
- *: (signifikant): $p \leq 0,05$
- ** : (sehr signifikant): $p \leq 0,01$
- ***: (höchst signifikant): $p \leq 0,001$

4 Ergebnisse

4.1 Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) im Kot

In Abb. 17 wird der Verlauf der SCFA im Kot der Kontrolltiere wiedergegeben. Erwartungsgemäß liegen die Werte von Acetat mit durchschnittlich $190 \pm 6,22 \mu\text{mol/g TS}$ deutlich über den durchschnittlichen Konzentrationen von Propionat ($67 \pm 2,55 \mu\text{mol/g TS}$) und Butyrat ($65 \pm 3,85 \mu\text{mol/g TS}$). Es bestehen Schwankungen, sie zeigen jedoch keine systematischen Veränderungen während des erfaßten Versuchsabschnitts.

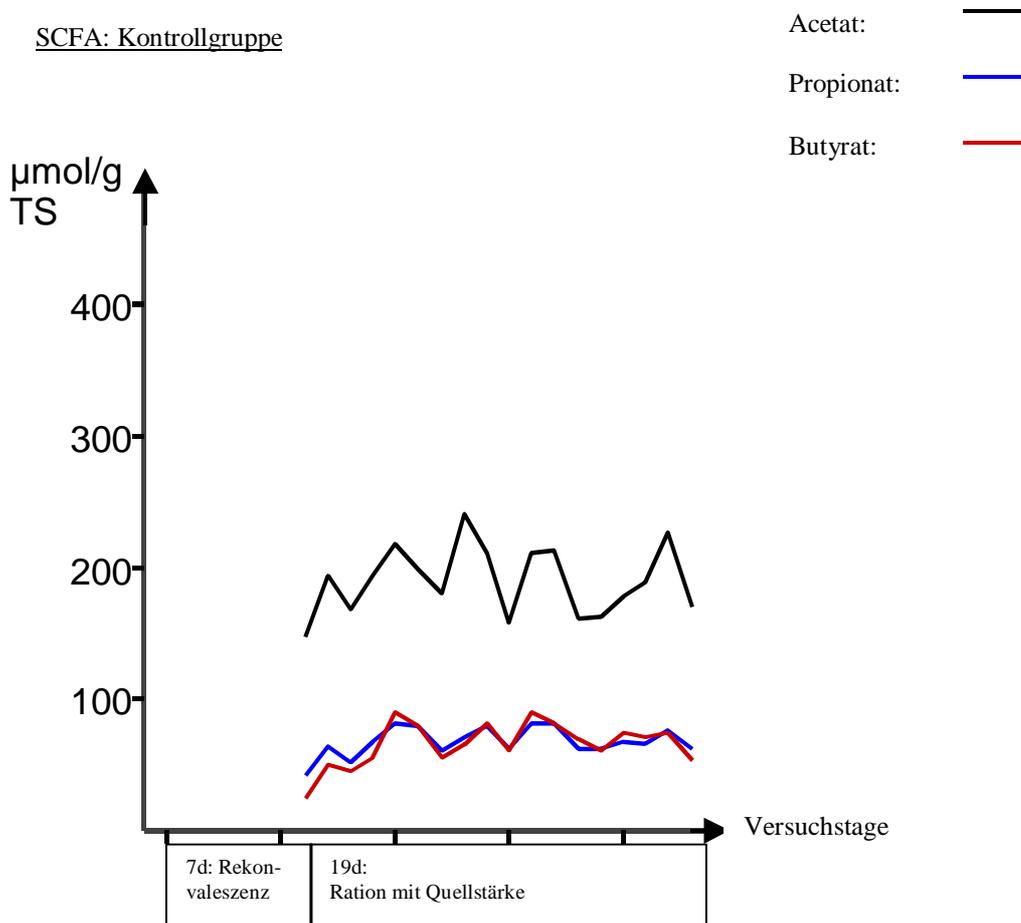


Abb. 17: Verlauf der SCFA- Konzentrationen im Kot der Kontrollgruppe (Mittelwerte)

Die in Abb. 18 dargestellten Konzentrationen der SCFA geben die Mittelwerte in den einzelnen Versuchsabschnitten von der RS- Gruppe wieder, Standardfehler sind nicht angegeben. In der mit Quellstärke gefütterten Phase liegen die Konzentrationen von Acetat ($226 \pm 9,1 \mu\text{mol/g TS}$) erwartungsgemäß über den Werten von Propionat ($90 \pm 4,76 \mu\text{mol/g TS}$) und

Butyrat ($63 \pm 3,99 \mu\text{mol/g TS}$), weiterhin liegen die durchschnittlichen Werte auf ähnlichem Niveau wie diejenigen der Quellstärkefütterung in der Kontrollgruppe. Mit Beginn der Futterumstellung (Adaptationsphase) steigen die Werte von Acetat und Butyrat deutlich an und nach einer 10-tägigen Fütterung von RS wird ein Plateau erreicht. Die durchschnittlichen Werte von Acetat, Propionat und Butyrat liegen in der 19-tägigen Hauptphase bei $372 \pm 7,88 \mu\text{mol/g TS}$, $83 \pm 4,5 \mu\text{mol/g TS}$ und $136 \pm 8,1 \mu\text{mol/g TS}$. Während bei Acetat das höchste Niveau im zweiten Drittel der 19-tägigen Hauptphase erreicht wird, stellen sich bei Butyrat die höchsten Konzentrationen im ersten Drittel ein. Der durchschnittliche Acetat - Wert der 19-tägigen Hauptphase liegt 1.6- fach sehr signifikant ($p \leq 0,001$) über dem Wert der Quellstärkephase, der Butyrat - Wert dementsprechend ebenfalls sehr signifikant 2,2- fach ($p \leq 0,001$).

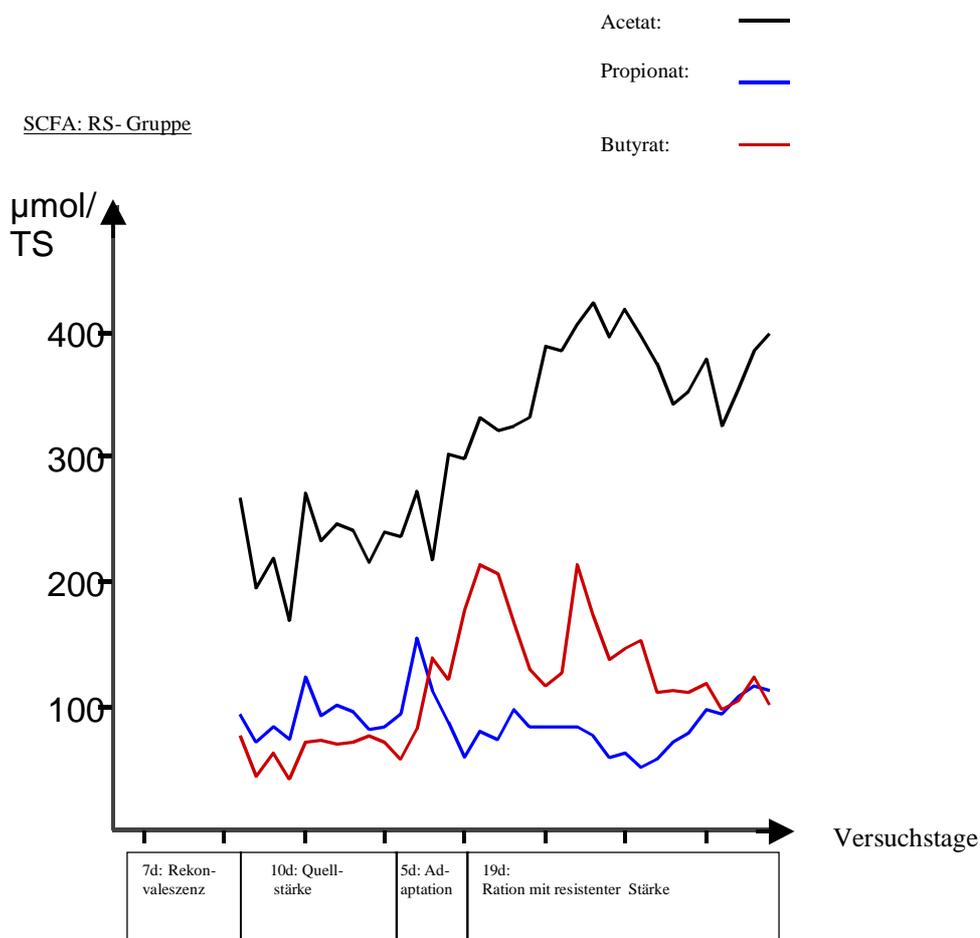


Abb. 18: Verlauf der SCFA- Konzentrationen im Kot der RS- Gruppe (Mittelwerte)

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, wird in der RE- Gruppe ein ähnlicher Einfluß der Fütterung auf den Verlauf der SCFA beobachtet wie in der RS- Gruppe. Die durchschnittlichen Mittelwerte der einzelnen Fettsäuren in der Quellstärkephase unterscheiden sich nur geringfügig von den entsprechenden Werten der RS- Gruppe. Jedoch werden in der darauffolgenden Hungerphase deutlich niedrigere Werte beobachtet. Der Abfall bezüglich der durchschnittlichen SCFA-Konzentrationen bei den drei gemessenen SCFA ist signifikant ($p \leq 0,001$). Es wird ein Abfall der Acetatkonzentration um 52,3%, der Propionatkonzentration um 56,5% und der Butyratkonzentration um 72,1% beobachtet. Durch die anschließende Realimentation der Tiere mit resistenter Stärke wird ein steiler Anstieg vor allem von Acetat und Butyrat erzielt. In der 19-tägigen Hauptphase erreichen der durchschnittliche Butyrat- und Acetatwert im ersten Drittel das höchste Niveau, der durchschnittliche Mittelwert von Butyrat liegt dabei mit $185,1 \pm 11,33 \mu\text{mol/g TS}$ sogar signifikant ($p \leq 0,05$) über denjenigen der RS Gruppe.

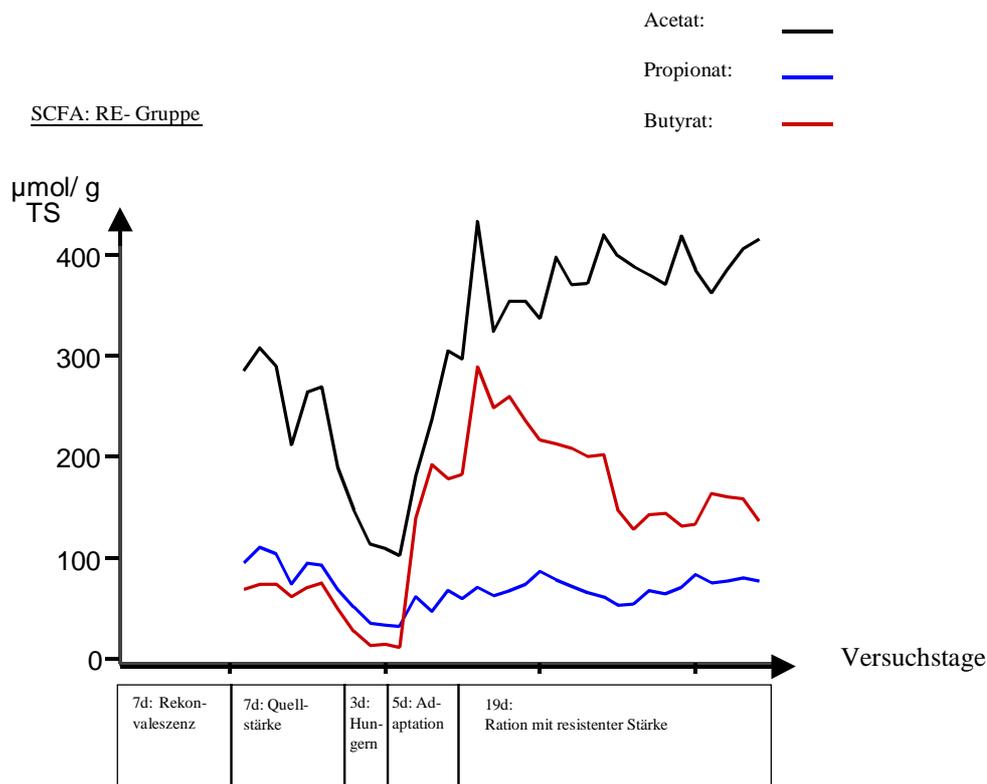


Abb. 19: Verlauf der SCFA- Konzentrationen im Kot der RE- Gruppe (Mittelwerte)

4.2 pH- Wert im Kot

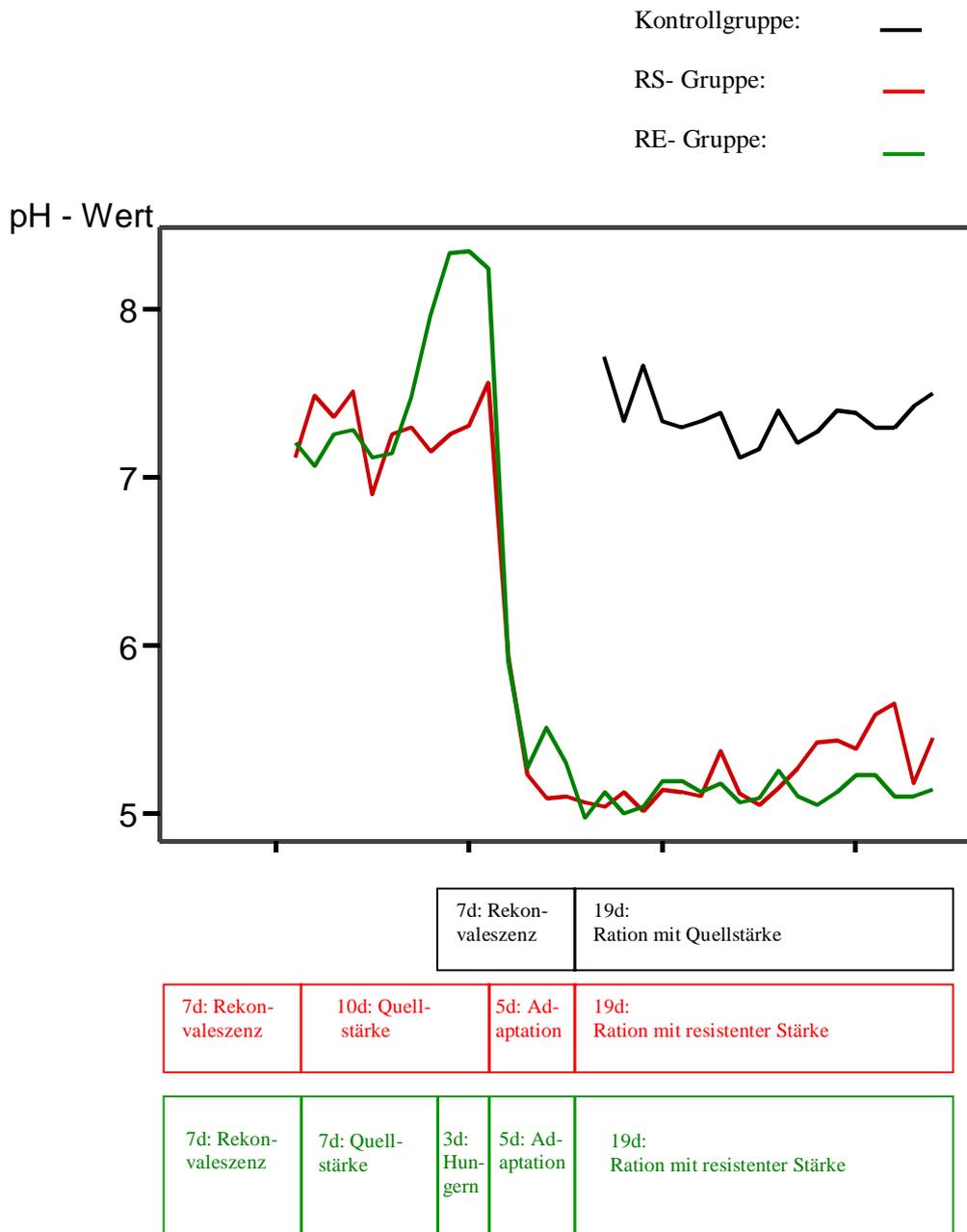


Abb. 20: Verlauf des pH – Wertes in Abhängigkeit von der Fütterung (Mittelwerte)

In Abb. 20 ist der Verlauf des mittleren pH – Wertes in den unterschiedlichen Gruppen in Abhängigkeit von der Fütterung dargestellt. Die Werte der Kontrollgruppe zeigen in der 19-tägigen Fütterung der Quellstärkeration keine wesentlichen Schwankungen auf, der Verlauf ist mit den Ergebnissen der RS- Gruppe und RE- Gruppe in der Quellstärkephase vergleichbar. Während der Hungerphase in der RE- Gruppe wird ein Anstieg beobachtet. Ab dem Zeitpunkt der Fütterung mit resistenter Stärke ist in der RS- als auch RE- Gruppe ein steiler Abfall zu verzeichnen, die Werte pendeln sich auf ein niedrigeres Niveau ein, die Schwankungen

liegen dabei zwischen pH 5-5,5. Die Unterschiede zwischen Quellstärkephase und der Phase mit resistenter Stärke sind jeweils signifikant ($p < 0,001$).

4.3 Gewichtsentwicklung

Die einzelnen Versuchsgruppen erzielten entsprechend der vergleichbaren nutritiven Versorgung ähnlich hohe tägliche Zunahmen. Die täglichen Zunahmen der Kontrollgruppe lagen in der Hauptversuchsphase bei $614 \pm 43,3\text{g}$ (SEM), die der RS Gruppe bei $628,3 \pm 12,1\text{g}$ (SEM). Die Tiere der RE Gruppe erreichten in dieser Zeitspanne tägliche Zunahmen von $711,0 \pm 8,0\text{g}$ (SEM).

4.4 Ergebnisse der histologischen Parameter

Die Ergebnisse sind nachfolgend als Säulendiagramme zur besseren Vergleichbarkeit dargestellt. Die Daten sind im Tabellenanhang dokumentiert.

4.4.1 Kryptentiefe

Die Auswertung der histologischen Untersuchungen im Lichtmikroskop ergab deutliche Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. In Abb. 21 ist die Kryptentiefe, ausgedrückt durch die Anzahl der Zellen, als Marker für die unterschiedliche Epithelentwicklung wiedergegeben. Sowohl im proximalen als auch im distalen Colon ist bei den mit Resistenter Stärke gefütterten Tieren ein Epithelzuwachs zu beobachten. Im proximalen Colon liegen die Werte der RS Gruppe 19% und die Werte der RE Gruppe 27% über denjenigen der Kontrollgruppe. Im distalen Bereich ist in der RS Gruppe eine Zunahme von 16% und in der RE Gruppe von 13% im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Tieren der Behandlungsgruppen und der Kontrolle in den jeweiligen Regionen waren deutlich und signifikant. Die Unterschiede zwischen den Regionen (proximal/ distal) innerhalb der verschiedenen Fütterungsgruppen waren gering und nicht signifikant.

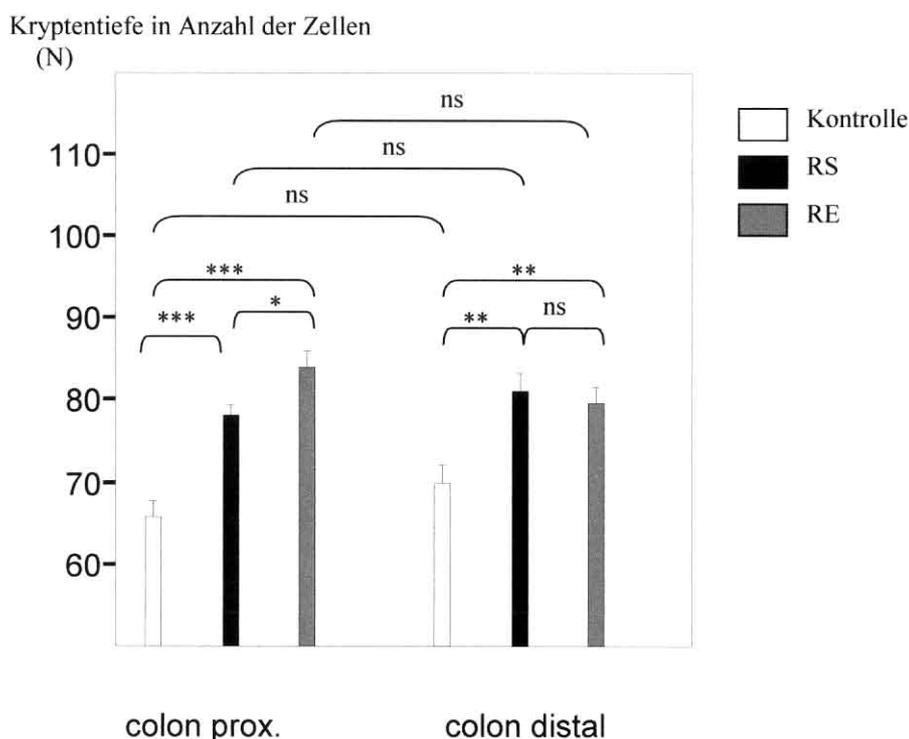


Abb. 21: Darstellung der Kryptentiefe (Mittelwerte \pm SEM) im Epithelgewebe des Colons bei den unterschiedlichen Fütterungsgruppen

4.5 Ergebnisse der Immunocytochemie mit Kryptenachse als Bezugsbasis

Da sich die Werte der RS - und RE – Gruppen hinsichtlich der dargestellten Parameter nur geringfügig unterscheiden, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. Die Daten sind jedoch im Tabellenanhang dokumentiert.

4.5.1 Ergebnisse der Mitoseauswertung in den verschiedenen Fütterungsgruppen

In Abb. 22 sind die Ergebnisse der Ki- 67 Färbung der Kontrollgruppe und der RS Gruppe dargestellt. Aus dem Balkendiagramm kann entnommen werden, daß sich die beiden Fütterungsgruppen hinsichtlich ihrer mitotischen Aktivität in den Krypten nur geringfügig und nicht signifikant unterscheiden. Die Behandlung mit resistenter Stärke hatte somit keinen Einfluß auf die Mitoseaktivität.

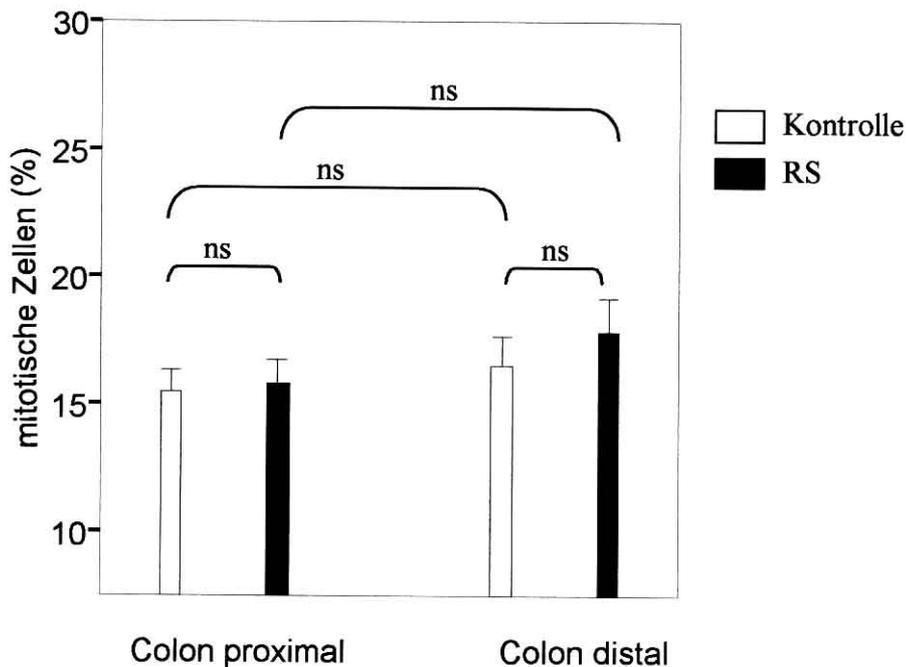


Abb. 22: Vergleich der Mitoserate zwischen Kontrollgruppe und RS Gruppe (Mittelwerte \pm SEM)

4.5.2 Darstellung der Apoptosedaten

Die apoptotischen Zellen wurden anhand der TUNEL- Färbung ermittelt. Die Werte sind in Anzahl der Zellen pro Hemikrypte wiedergegeben. Die Auswertung im Lichtmikroskop ergab, daß die Apoptose im Epithel der Krypten der mit resistenter Stärke gefütterten Tiere deutlich erniedrigt war. Während sich die Werte zwischen den beiden Regionen des Colons innerhalb einer Gruppe nicht signifikant unterschieden ($p > 0,05$), war in der RS Gruppe des proximalen Colons im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante ($p \leq 0,01$) Verminderung der Apoptose um etwa 40% und im distalen Bereich eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$) von 54% zu verzeichnen, so daß die Gesamtapoptoseaktivität durch die Rohstärkefütterung nur mehr rund die Hälfte der Kontrollwerte betrug (Abb. 23).

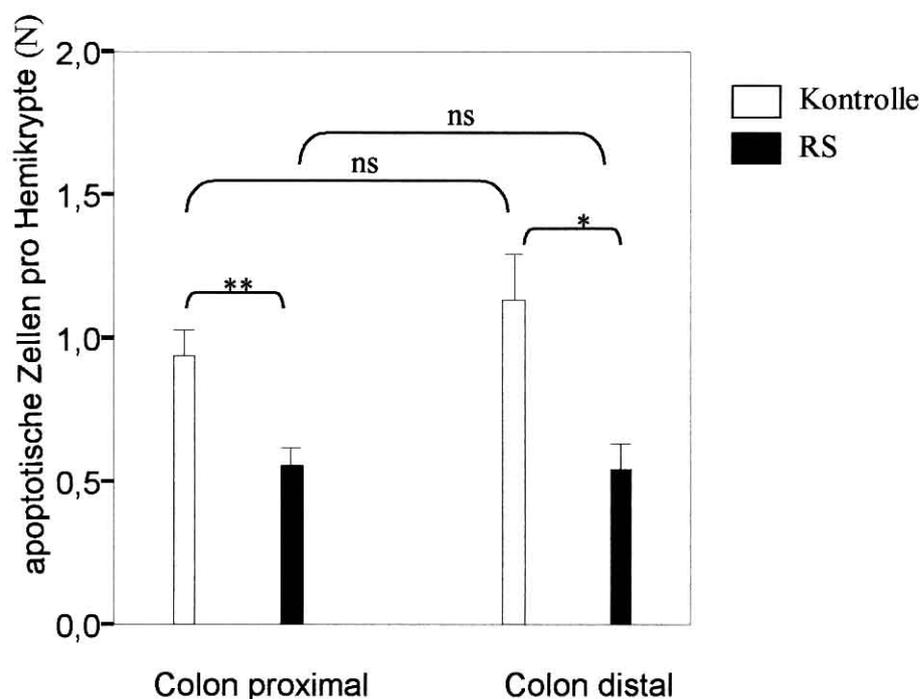


Abb. 23: Anzahl der apoptotischen Zellen im Kryptenbereich des Colons, Kontrollgruppe und RS Gruppe im Vergleich (Mittelwerte \pm SEM)

4.5.3 Mitglieder der Bcl-2 Familie

Entsprechend der Vorgehensweise bei der Bestimmung der Apoptose ist die Expression der Vertreter der Bcl- 2 Familie jeweils in Anzahl der gefärbten Zellen pro Hemikrypte angegeben.

4.5.3.1 bak

Bak gehört zu den proapoptotischen Vertretern der bcl-2 Familie. Die Auswertung dieses Genprodukts ergab eine unterschiedliche Expression abhängig von der Fütterung. Die Expression (n pro Hemikrypte) war bei den mit Quellstärke gefütterten Tieren (Kontrolle) geringer ausgeprägt als bei den RS Tieren. Im proximalen Bereich war eine hoch signifikante ($p \leq 0,001$) Verringerung um ca. 67% zu beobachten, jedoch war der im distalen Bereich um ca. 30% erniedrigte Wert nicht signifikant. Unterschiede zwischen den Regionen innerhalb der Fütterungsgruppen bestanden bei der Kontrollgruppe ($p \leq 0,01$), waren jedoch im Falle der RS Gruppe nicht signifikant (vgl. Abb. 24).

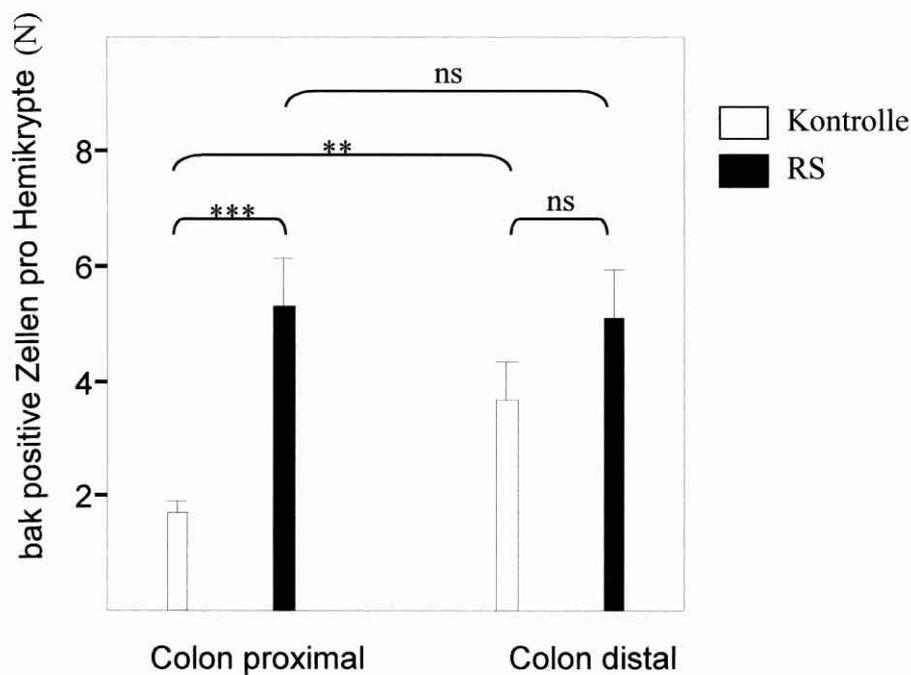


Abb. 24: Anzahl Bak- positiver Zellen im Kryptenbereich des Colons von Kontrollgruppe und RS Gruppe (Mittelwerte \pm SEM)

4.5.3.2 bcl-2

Von den antiapoptotisch wirkenden Genprodukten wurde bcl-2 immunocytochemisch bestimmt. Die ermittelten Werte von der Kontrollgruppe und der RS Gruppe sind in Abb. 25 zusammengefaßt. Zwischen den Fütterungsgruppen innerhalb derselben Region ist in der Kontrollgruppe eine deutliche und signifikante Abnahme (44% proximal mit $p \leq 0,001$ und 50% distal mit $p \leq 0,01$) zu verzeichnen. Innerhalb der Gruppen ist die Abnahme von proximal zu distal im Falle der Kontrollgruppe signifikant ($p \leq 0,01$).

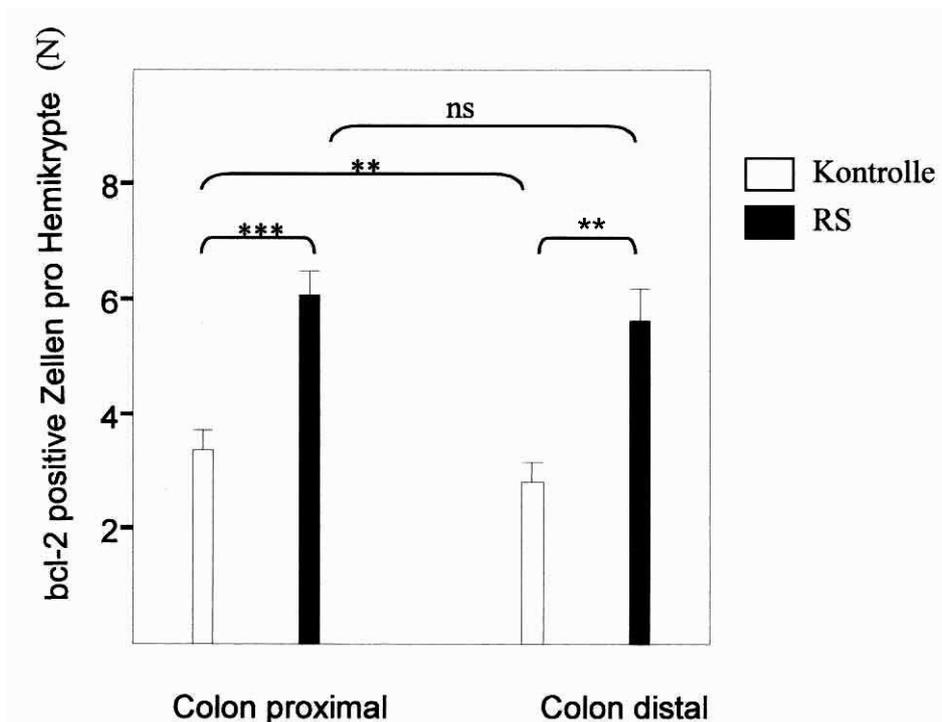


Abb. 25: Mittelwerte (\pm SEM) der bcl-2 positiven Zellen des Kryptenbereichs, Kontrollgruppe und RS Gruppe

4.5.4 EGF (epidermal growth factor)

EGF wurde immunocytochemisch erfaßt, weil EGF mitogen wirkt und an der Aufrechterhaltung der funktionalen Integrität vieler Organe beteiligt ist, indem es Survival- Funktionen übernimmt. In Abb. 26 werden die Daten der EGF Auswertung der Kontrollgruppe und RS Gruppe wiedergegeben, dargestellt ist der Anteil der positiv gefärbten Gobletzellen. Signifikant sind lediglich die Unterschiede zwischen beiden Gruppen im distalen Bereich ($p \leq 0,05$).

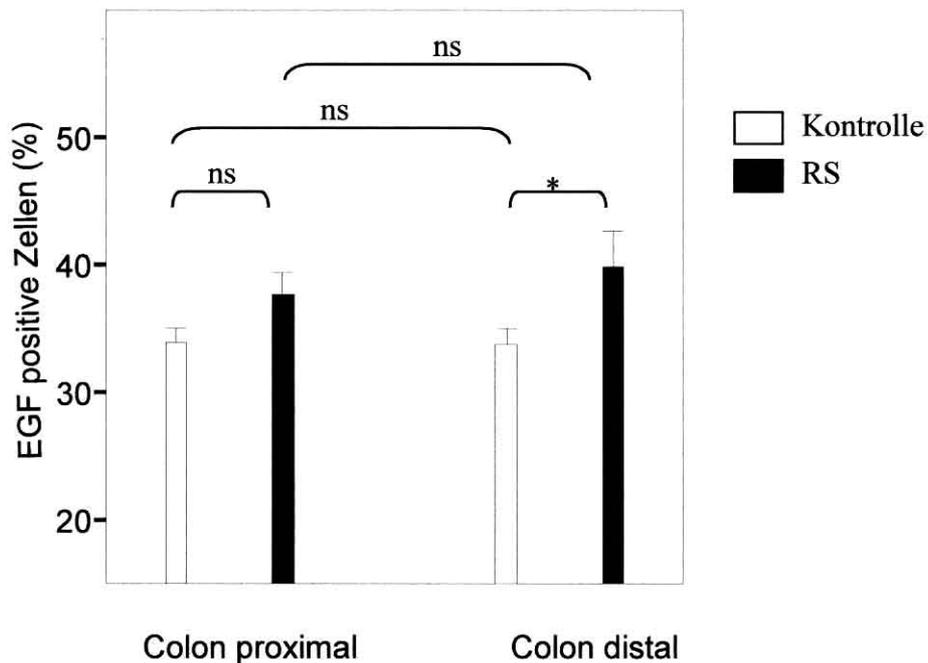


Abb. 26: Anteil EGF (epidermal growth factor) positiv gefärbter Zellen (in %) im Kryptenbereich, Kontrollgruppe und RS Gruppe (Mittelwerte \pm SEM)

Neben der prozentualen Expression von EGF entlang der Kryptenachse wurde die durchschnittliche Fläche der EGF angefärbten Gobletzellen ermittelt. Hierbei wurde mittels eines speziellen Auszählgitters im Lichtmikroskop die Fläche der positiv gefärbten Schleimblasen, welche aus den Gobletzellen münden, erfaßt. Der Anstieg der positiv angefärbten Zellen als auch die Erhöhung der Mucusfläche scheinen für eine erhöhte Funktionalität von EGF verantwortlich zu sein (Claus et al., 2001).

In Abb. 27 ist die durchschnittliche Mucusfläche der EGF positiv gefärbten Becherzellen wiedergegeben. Die RS Gruppe unterscheidet sich sowohl im proximalen als auch distalen Colonabschnitt deutlich von den Werten der Kontrollgruppe, im proximalen Bereich der RS Gruppe liegt die durchschnittliche Mucusfläche ca. 90% signifikant ($p \leq 0,001$) über den Werten der Kontrollgruppe, im distalen Bereich besteht ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,01$)

von ca. 65%. Zwischen der distalen und proximalen Region innerhalb einer Gruppe bestehen jeweils keine signifikanten Unterschiede.

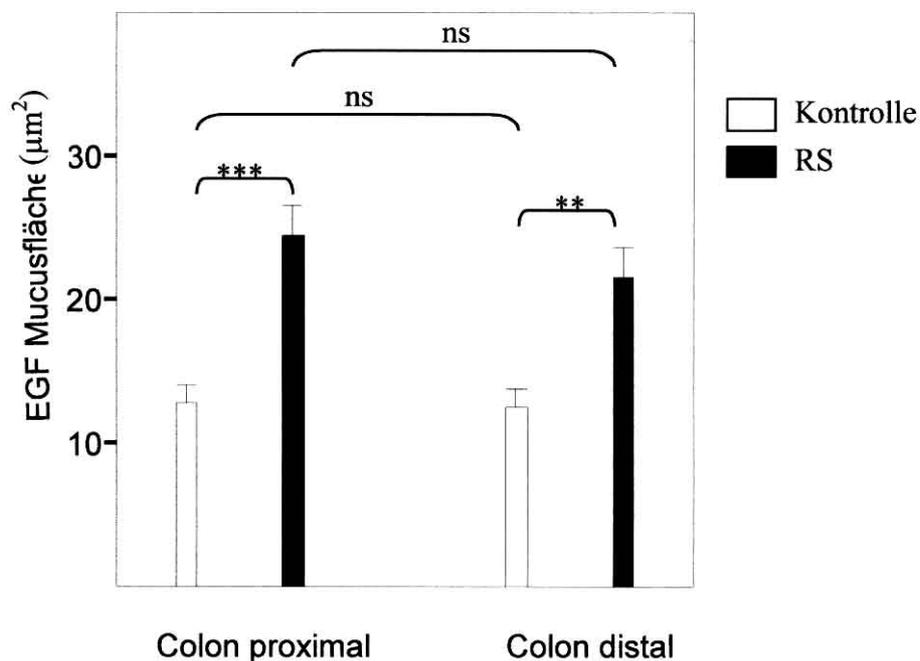


Abb. 27: Durchschnittliche Mucusfläche EGF positiv gefärbter Becherzellen (µm²), Kontrollgruppe und RS Gruppe, Mittelwerte \pm SEM

4.5.5 Verteilung in den einzelnen Kompartimenten entlang der Kryptenachse

Neben der Expression der unterschiedlichen Parameter in den Krypten der Colonmucosa wurde weiterhin die Verteilung der immunocytochemischen Färbung entlang der Kryptenachse untersucht. Ausgewertet wurde jeweils nur eine der beiden Kryptenhälften, die sog. Hemikrypte. Weiterhin wurden die Hemikrypten anhand der Zellzahl in drei gleich große Kompartimente unterteilt, welche als basales, mittleres und luminales Kompartiment bezeichnet wurden (vgl. Abb. 16). Die Einteilung entsprechend dieses Schemas soll der unterschiedlichen Funktionalität der Epithelzellen entlang der Kryptenachse entsprechen, so findet im basalen Kompartiment vorrangig die Zellteilung statt, im mittleren sind die bereits differenzierten Zellen funktionstüchtig und im luminalen Bereich werden die Zellen durch Apoptose beseitigt. Da sich die proximalen und distalen Darmregionen innerhalb der Versuchsgruppen nur geringfügig unterscheiden, wird in der Darstellung der Kompartimente darauf nicht näher eingegangen. Dargestellt werden jeweils die Unterschiede zwischen den Kompartimenten innerhalb der Gruppen und zwischen den jeweiligen Kompartimenten der RS Gruppe und der Kontrollgruppe.

4.5.5.1 Mitose

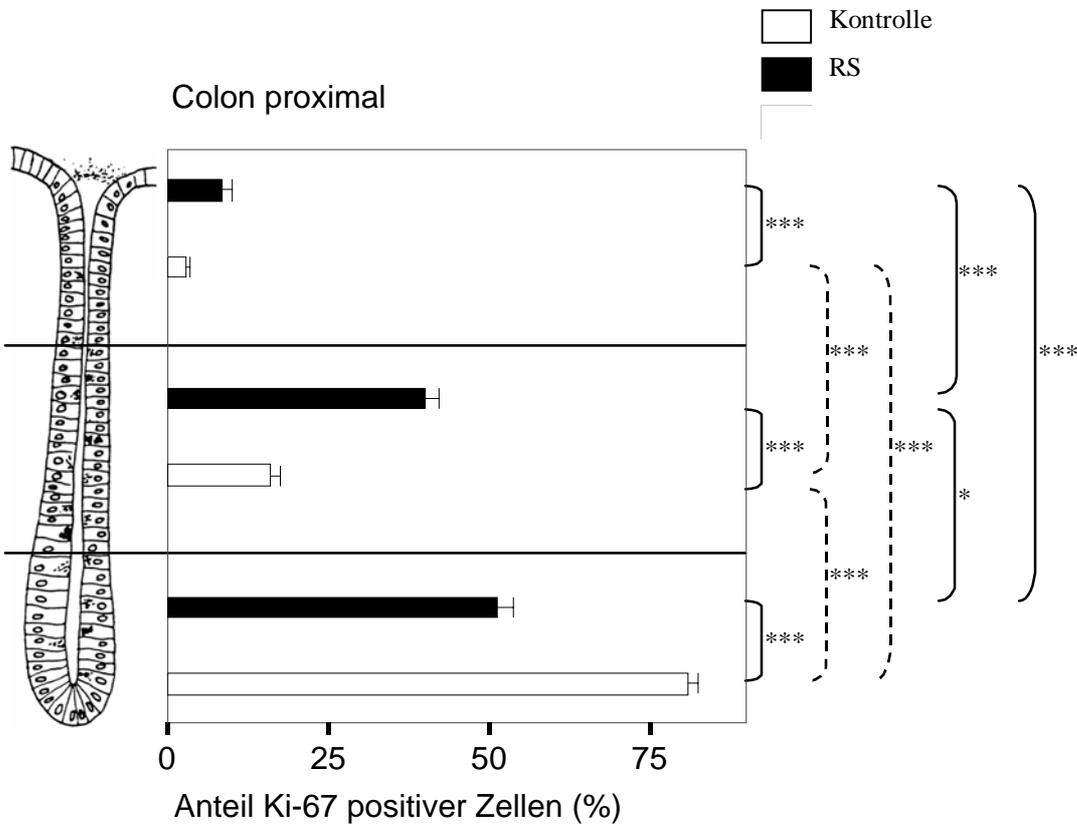


Abb. 28: Prozentuale Verteilung der Ki-67 positiven Zellen entlang der Kryptenachse (%), Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon proximal, Mittelwerte \pm SEM

In Abb. 28 ist die Verteilung der Ki-67 Färbung entlang der Kryptenachse wiedergegeben. In der Kontrollgruppe sind ca. 81% bzw. 2.9% der Zellen im basalen bzw. luminalen Bereich angefärbt, in der RS Gruppe hingegen ca. 51% bzw. 8,5%. Die Mitoserate ausgedrückt in Prozent ist im basalen Kompartiment am höchsten und im luminalen am geringsten ausgeprägt. Die Werte zwischen den Gruppen innerhalb eines Kompartiments unterscheiden sich signifikant voneinander ($p \leq 0,001$). Die Daten zwischen den Kompartimenten innerhalb der Gruppen weisen ebenfalls signifikante Unterschiede auf. Im Falle der Kontrollgruppe und der RS Gruppe (zwischen Kryptenöffnung und Mitte als auch Basis) wird jeweils eine Signifikanz von $p \leq 0,001$ erreicht, zwischen Mitte und Basis der RS Gruppe ein Wert von $p \leq 0,01$. Auffallend ist die erhöhte Anzahl mitotischer Zellen im basalen Kompartiment der Kontroll-

gruppe (81%). In der RS Gruppe sind im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich mehr mitotische Zellen (40% vs. 16%) im mittleren Kompartiment lokalisiert. Da sich die Anzahl der mitotischen Zellen in der Gesamtkrypte nicht unterscheidet (vgl. Abb. 22), scheint die verringerte Mitoserate des basalen Kompartiments in der RS Gruppe durch eine erhöhte Mitoserate im mittleren Kompartiment kompensiert zu werden.

Im Vergleich der distalen Regionen zwischen Kontrollgruppe und RS Gruppe (Abb. 29) werden ähnliche Verhältnisse ersichtlich wie im proximalen Bereich. Die Unterschiede sind jeweils signifikant und erreichen Werte bis hin zu $p \leq 0,001$. Im basalen Bereich liegen die Mitosewerte deutlich unter den Werten der Kontrolle (um ca. 27 Prozentpunkte), im mittleren Bereich überwiegt jedoch die Mitoserate der RS Gruppe (ca. 23 Prozentpunkte).

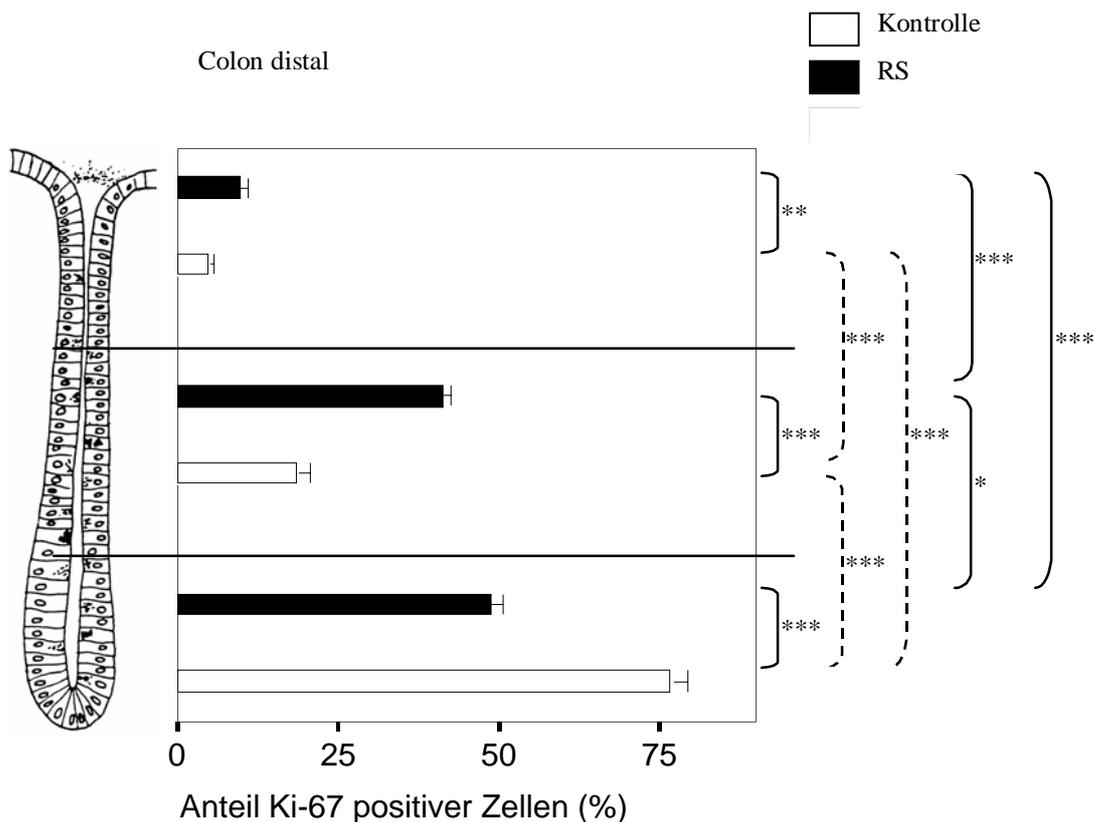


Abb. 29: Prozentuale Verteilung der Ki-67 positiven Zellen entlang der Kryptenachse (%), Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon distal, Mittelwerte \pm SEM

Die Verteilung Ki-67 positiver Zellen entlang der Kryptenachse ist in der Abb. 28 und Abb. 29 wiedergegeben. Der Schwerpunkt der Mitose befindet sich zwar in beiden Gruppen im basalen Bereich der Krypte, jedoch lassen sich in der RS Gruppe mehr mitotische Zellen im mittleren Kompartiment nachweisen, während in der Kontrollgruppe wesentlich mehr mitotische Zellen im basalen Kompartiment lokalisiert sind.

4.5.5.2 Verteilung der Apoptose entlang der Kryptenachse

In Abb. 30 wird die durchschnittliche Anzahl TUNEL positiver Zellen als auch die prozentuale Verteilung dieser Zellen in den verschiedenen Kompartimenten des proximalen Colons beider Gruppen dargestellt. Während die einzelnen Balken die absoluten Zahlen apoptotischer Zellen in den Kompartimenten der Hemikrypten wiedergeben, wird durch die Prozentangaben die Verteilung der angefärbten Zellen entlang der drei Abschnitte der Krypte beschrieben. Da sich die Prozentangabe auf eine unterschiedliche Anzahl apoptotischer Zellen in der Gesamtkrypte der jeweiligen Gruppen (vgl. Abb. 23) bezieht, ist ein statistischer Vergleich der Prozentangaben zwischen den jeweils gleichen Kompartimenten beider Gruppen nicht zulässig, gibt jedoch wertvolle Informationen über das Verteilungsmuster innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Aus der Abbildung geht hervor, daß in der Kontrollgruppe der Schwerpunkt der Apoptose im luminalen Kompartiment liegt, so werden in der Kontrollgruppe ca. doppelt soviel Zellen als in der RS Gruppe angefärbt. Der Unterschied ist hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Weiterhin befinden sich in der Kontrollgruppe 63,2% der Zellen im luminalen Bereich, gegenüber 44,4% in der RS Gruppe. Im mittleren Kompartiment liegen die Werte der Kontrollgruppe mit fast 20% signifikant ($p \leq 0,01$) über denen der RS Gruppe, jedoch bestehen nur geringe Unterschiede hinsichtlich des Verteilungsmusters (16,6% vs. 19,5%). Im basalen Bereich ist die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen der RS Gruppe nicht signifikant unterschiedlich von der Kontrollgruppe. Jedoch wird aufgrund des Verteilungsmusters ersichtlich, daß in der RS Gruppe 39% der Zellen basal angefärbt sind, während es in der Kontrollgruppe nur 17,3% sind. Die im luminalen Kompartiment verminderte Apoptose der RS Gruppe scheint basal durch eine erhöhte Anzahl kompensiert zu werden.

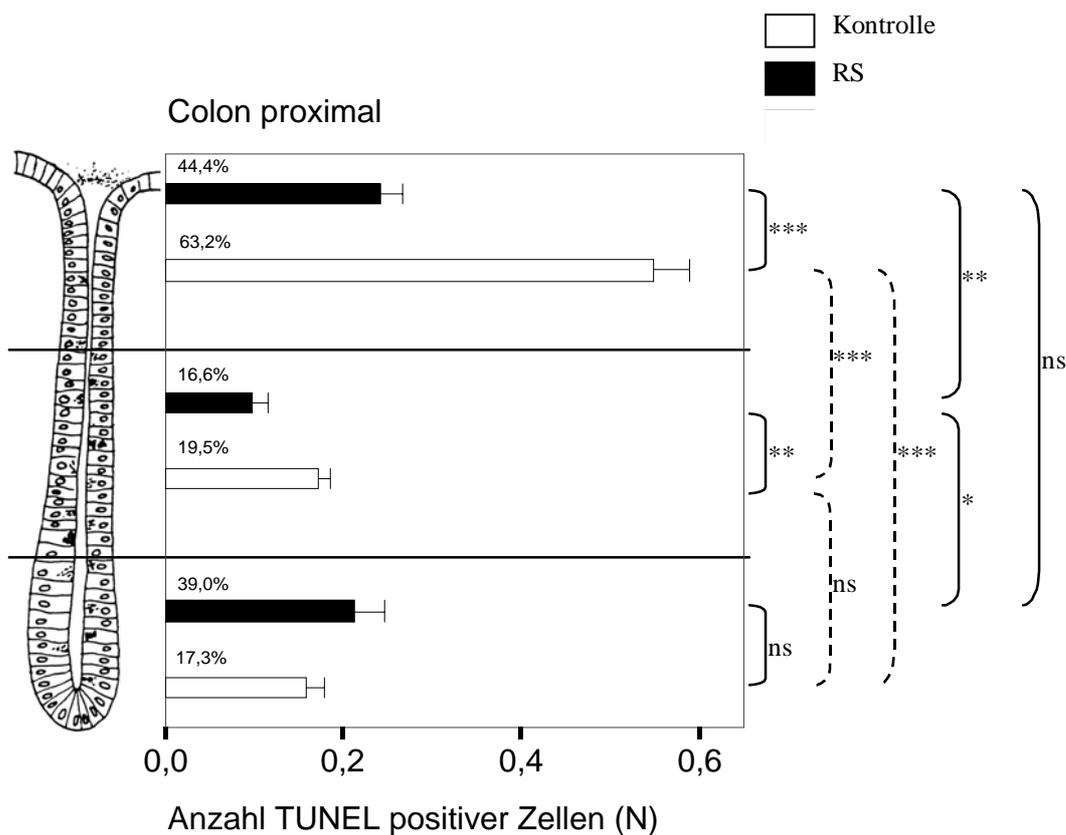


Abb. 30: Anzahl TUNEL positiver Zellen (Mittelwerte \pm SEM) in den Hemikrypten und prozentuale Verteilung (%) entlang der Kryptenachse, Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon proximal

Im distalen Bereich des Colons (Abb. 31) liegt der Schwerpunkt der Apoptose in der Kontrollgruppe statistisch signifikant ebenfalls im luminalen Kompartiment. Im Vergleich zur RS Gruppe werden in der Kontrollgruppe ca. dreimal soviel apoptotische Zellen gefunden ($p \leq 0,001$). Dementsprechend befindet sich in der Kontrollgruppe im Vergleich zur RS Gruppe ein deutlich höherer Anteil positiv gefärbter Zellen im luminalen Kompartiment (50,9 % vs. 35,8%). Die Werte des mittleren Kompartiments unterscheiden sich nur geringfügig und nicht signifikant voneinander. Im basalen Bereich in der Kontrollgruppe werden im Vergleich zur RS Gruppe zwar mehr apoptotische Zellen gefunden (0,39 vs. 0,23), jedoch ist in dieser Gruppe auch die Anzahl der gesamten apoptotischen Zellen pro Hemikrypte deutlich erhöht. Damit sind in der RS Gruppe mit 45,4% wesentlich mehr apoptotische Zellen im basalen

Kompartiment lokalisiert als in der Kontrollgruppe mit 34,8%. Der Schwerpunkt der Apoptose liegt somit in der RS Gruppe deutlich im basalen Bereich der Krypte.

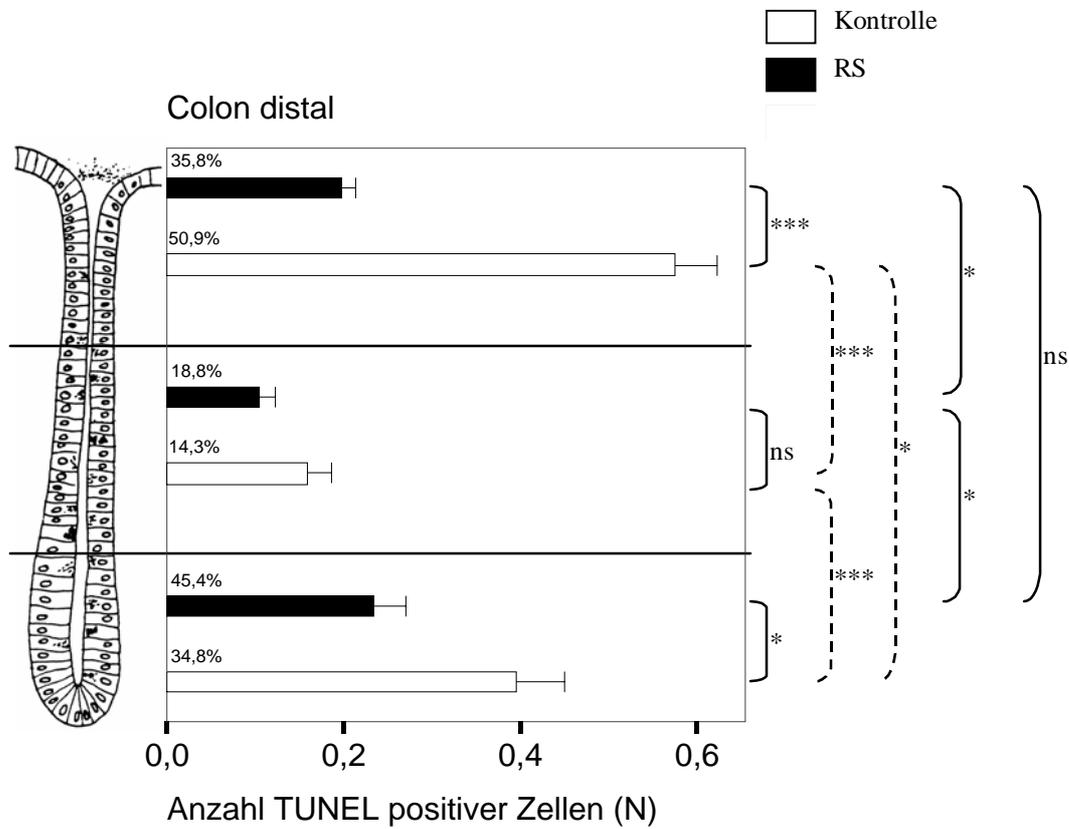


Abb. 31: Anzahl TUNEL positiver Zellen (Mittelwerte \pm SEM) in den Hemikrypten und prozentuale Verteilung (%) entlang der Kryptenachse, Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon distal

Die Verteilung TUNEL positiver Zellen entlang der Kryptenachse ist in der Abb. 30, Abb. 31 zusammengestellt. Von besonderer Bedeutung ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der RS Gruppe. Während sich in der Kontrollgruppe das Haupt- Apoptosekompartiment luminal befindet, ist es in der RS Gruppe basal lokalisiert.

4.5.5.3 Verteilung von Mitgliedern der Bcl-2 Familie

4.5.5.3.1 Verteilung von Bak (proapoptotisches Protein)

In Abb. 32 wird die Anzahl Bak positiver Zellen, also jener Zellen, die das proapoptotische Protein exprimieren, in den Kompartimenten des proximalen Colons von Kontrollgruppe und RS Gruppe verglichen. Die Zahl gefärbter Zellen liegt in der RS Gruppe sowohl im basalen als auch luminalen Kompartiment hoch signifikant ($p \leq 0,001$) über den Werten der Kontrollgruppe. Im basalen Bereich unterscheiden sie sich um den Faktor 3,5 und im luminalen um den Faktor 3. Im Falle der Kontrollgruppe liegt der Schwerpunkt der Expression im luminalen Bereich, welcher sich von den anderen beiden Kompartimenten signifikant unterscheidet ($p \leq 0,001$ für Lumen vs. Mitte und $p \leq 0,05$ für Lumen vs. Basis). In der RS Gruppe fallen im Gegensatz dazu die Unterschiede zwischen basalem und luminalem Kompartiment geringer und nicht signifikant aus. Der Schwerpunkt der Bak Expression liegt somit in der RS Gruppe nicht nur im luminalen Kompartiment. Die Werte des basalen und luminalen Kompartiments liegen somit in der RS Gruppe auf einem ähnlich hohen Niveau bzw. sind nicht signifikant unterschiedlich.

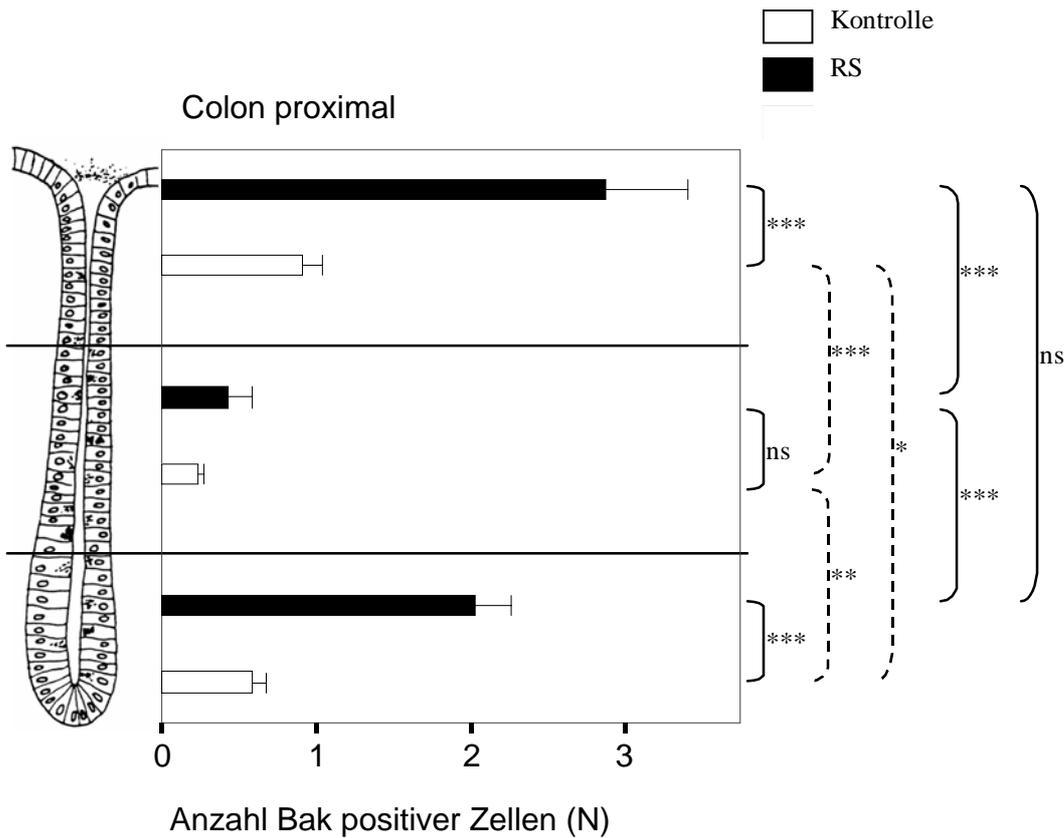


Abb. 32: Durchschnittliche Anzahl Bak positiver Zellen (N) in den Kompartimenten des proximalen Colons, Kontrollgruppe und RS Gruppe, Mittelwerte \pm SEM

Wie auch im proximalen Colon werden im basalen Kompartiment des distalen Colons der RS Gruppe (Abb. 33) wesentlich mehr Bak positive Zellen beobachtet als in der Kontrollgruppe (1,9- fach). Der Unterschied ist mit $p \leq 0,05$ signifikant. Der luminalen Bereich unterscheidet sich jedoch nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Die Werte des luminalen und basalen Kompartiments innerhalb der Gruppen unterscheiden sich jeweils signifikant bis hoch signifikant vom mittleren Kompartiment, d.h., daß bak – positive Zellen unabhängig von der Gruppe eine bimodale Verteilung aufweisen, mit Maxima im basalen und zusätzlich luminalen Kompartiment.

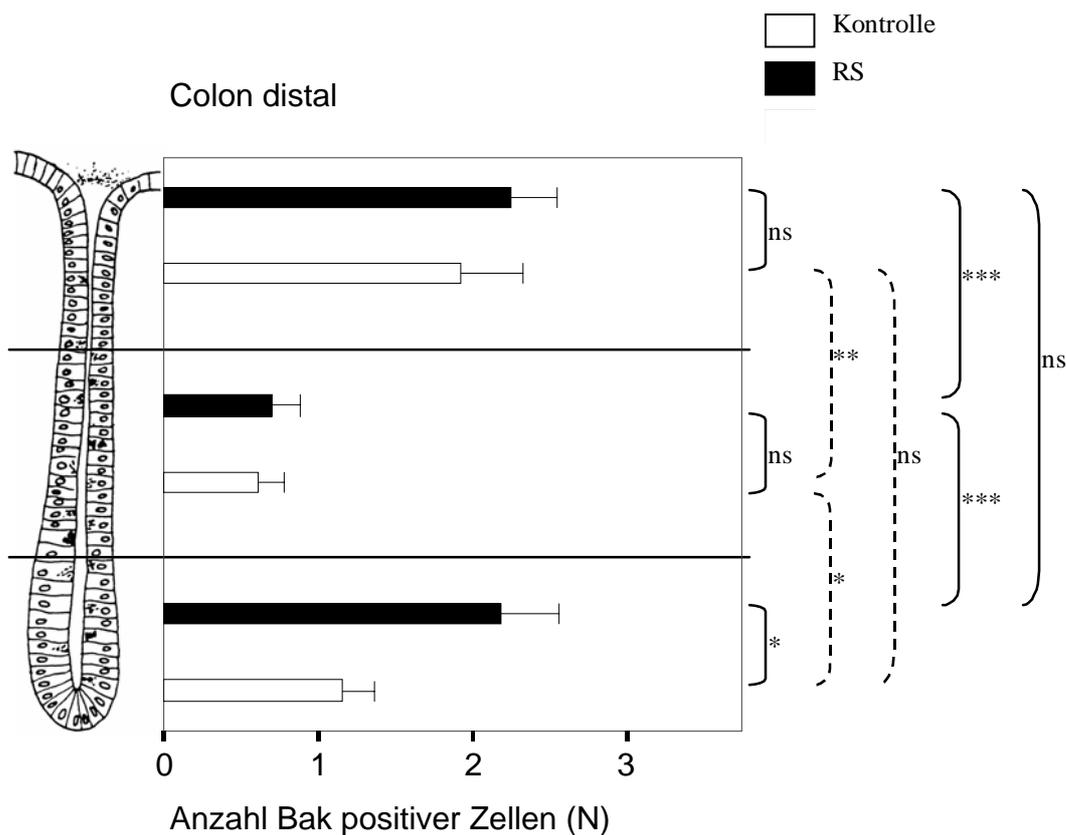


Abb. 33: Durchschnittliche Anzahl Bak positiver Zellen (N) in den Kompartimenten des distalen Colons, Kontrollgruppe und RS Gruppe, Mittelwerte \pm SEM

Insgesamt zeigt die Verteilung Bak positiver Zellen (Abb. 32 und Abb. 33) deutliche Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und RS Gruppe. Auffällig ist die erhöhte Anzahl Bak positiver Zellen im basalen Bereich der RS Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Jedoch ist die Anzahl Bak positiver Zellen in der RS Gruppe auch im luminalen Bereich erhöht.

4.5.5.3.2 Verteilung von Bcl-2 (antiapoptotisches Protein)

In Abb. 34 wird die Expression von Bcl-2 in den Zellen der Epithelschicht des proximalen Colons wiedergegeben. In der Kontrollgruppe sind im basalen ($p \leq 0,01$) und luminalen Kompartiment ($p \leq 0,001$) erheblich weniger positive Zellen vorhanden als in der RS Gruppe. In beiden Bereichen liegt der Unterschied bei ca. 55%. Der Vergleich der einzelnen Kompartimente innerhalb der Gruppen läßt jeweils eine erhöhte Zahl gefärbter Zellen im basalen und luminalen Bereich erkennen, im Falle der RS Gruppe liegt der Schwerpunkt der Expression

im luminalen Bereich, dieser unterscheidet sich jedoch, wie auch in der Kontrollgruppe, nicht signifikant vom basalen Kompartiment.

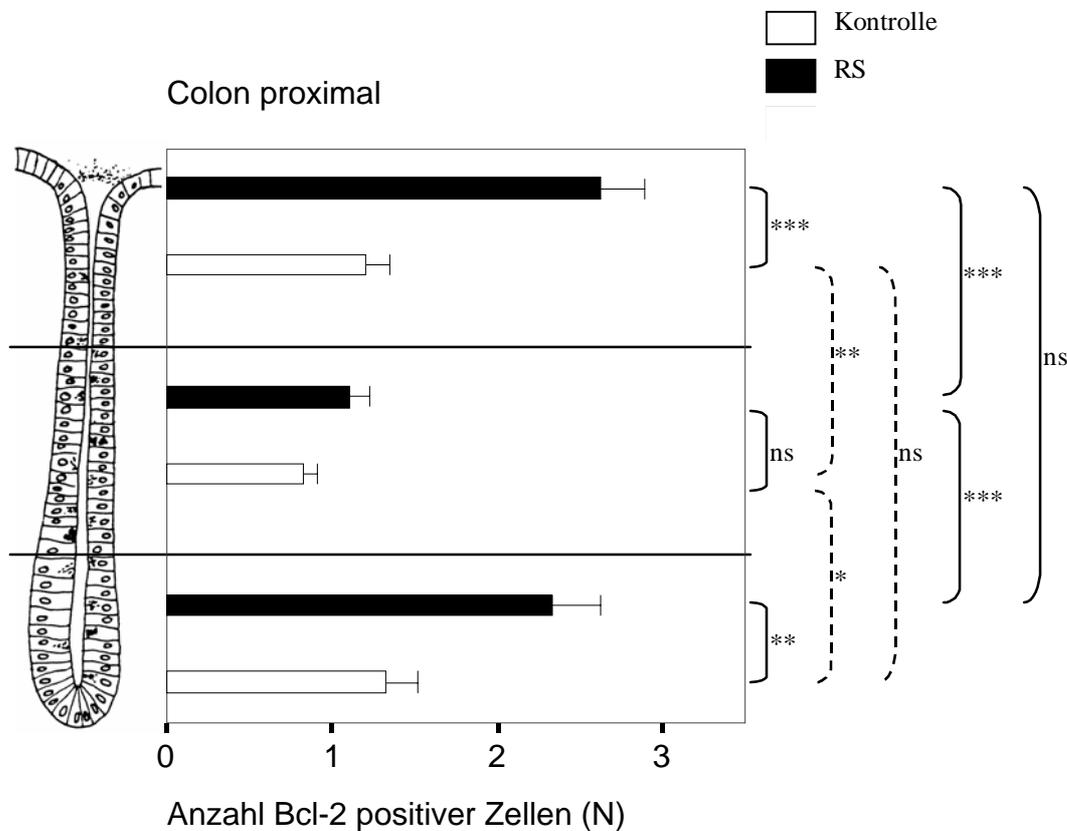


Abb. 34: Darstellung Bcl-2 positiver Zellen (N) in den Kompartimenten entlang der Kryptenachse, Colon proximal, Kontrollgruppe und RS Gruppe, Mittelwerte \pm SEM

Der Vergleich Bcl-2 positiver Zellen im distalen Bereich von Kontrollgruppe und RS Gruppe (Abb. 35) zeigt im luminalen Kompartiment der Kontrollgruppe eine deutlich erniedrigte Expression von Bcl-2 (ca. 70%). Dieser Unterschied ist mit $p \leq 0,001$ hoch signifikant. Bei der RS Gruppe werden die meisten positiven Zellen im luminalen Bereich gefunden, der Unterschied zum mittleren Kompartiment ist hoch signifikant ($p \leq 0,001$), der zum basalen jedoch nicht signifikant. In der Kontrollgruppe dagegen werden die meisten Zellen in der basalen Region gefunden, der Unterschied zum mittleren und luminalen Kompartiment ist jeweils mit $p \leq 0,01$ signifikant. Weiterhin zeigt bcl-2, besonders deutlich ausgeprägt in der RS Gruppe, die bereits diskutierte bimodale Verteilung.

4.5.5.4 Verteilung von EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)

Eine orientierende Betrachtung der auf EGF gefärbten Schnitte ergab Anhaltspunkte dafür, daß EGF - positive Zellen in einem der Kompartimente gehäuft auftreten, bzw. daß die Behandlung irgendeinen Einfluß auf die Zahl positiver Zellen hat. Weiterhin ergaben sich Hinweise, daß die sekretorische Aktivität, charakterisiert durch die Fläche der sezernierten Schleimtropfen, Unterschiede aufweist. Daher wurde dieses Kriterium näher quantifiziert und analysiert.

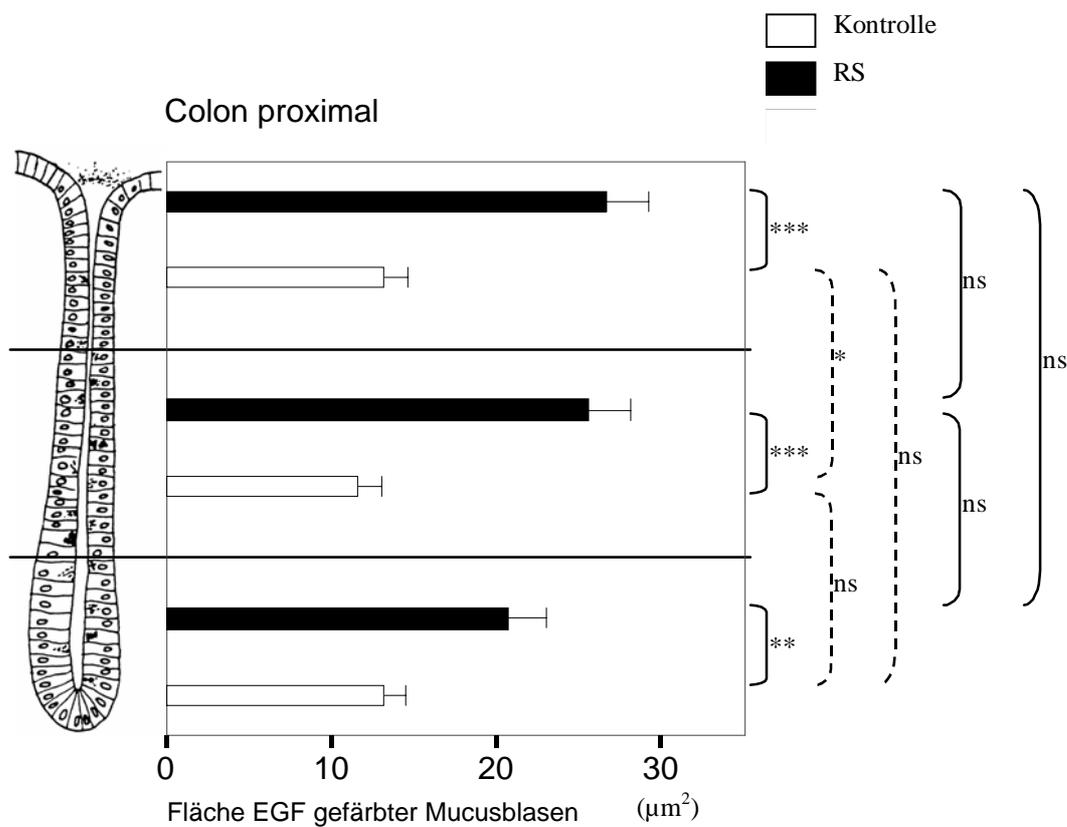


Abb. 36: Durchschnittliche Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen (µm²), Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon proximal, Mittelwerte ± SEM

In Abb. 36 ist die durchschnittliche Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen in den einzelnen Kompartimenten der Kontrollgruppe und RS Gruppe dargestellt. In der RS Gruppe weist die durchschnittliche Fläche der Mucusblasen in allen drei Kompartimenten höhere Werte als in der Kontrollgruppe auf. So ist die luminale Mucusfläche der RS Gruppe doppelt so hoch

wie in der Kontrollgruppe ($p \leq 0,001$). Tendenziell, jedoch nicht signifikant, nimmt die Mucusfläche vom Lumen bis zum basalen Kompartiment kontinuierlich ab, während in allen drei Kompartimenten signifikant höhere Flächen bei der RS Gruppe aufgefunden wurden.

Wie im proximalen Colon weisen auch im distalen Colon (Abb. 37) die Mucusflächen der RS Gruppe unabhängig vom Kompartiment größere Werte als die der Kontrollgruppe auf. Sie unterscheiden sich jedoch nur im mittleren ($p \leq 0,01$) und luminalen Kompartiment ($p \leq 0,001$) signifikant. Im Vergleich der Kompartimente ist in der RS Gruppe von luminal zu basal ein deutlicher Unterschied ($p \leq 0,001$) zu erkennen, ähnlich verhält es sich im Vergleich des luminalen und des mittleren Kompartiments ($p \leq 0,05$).

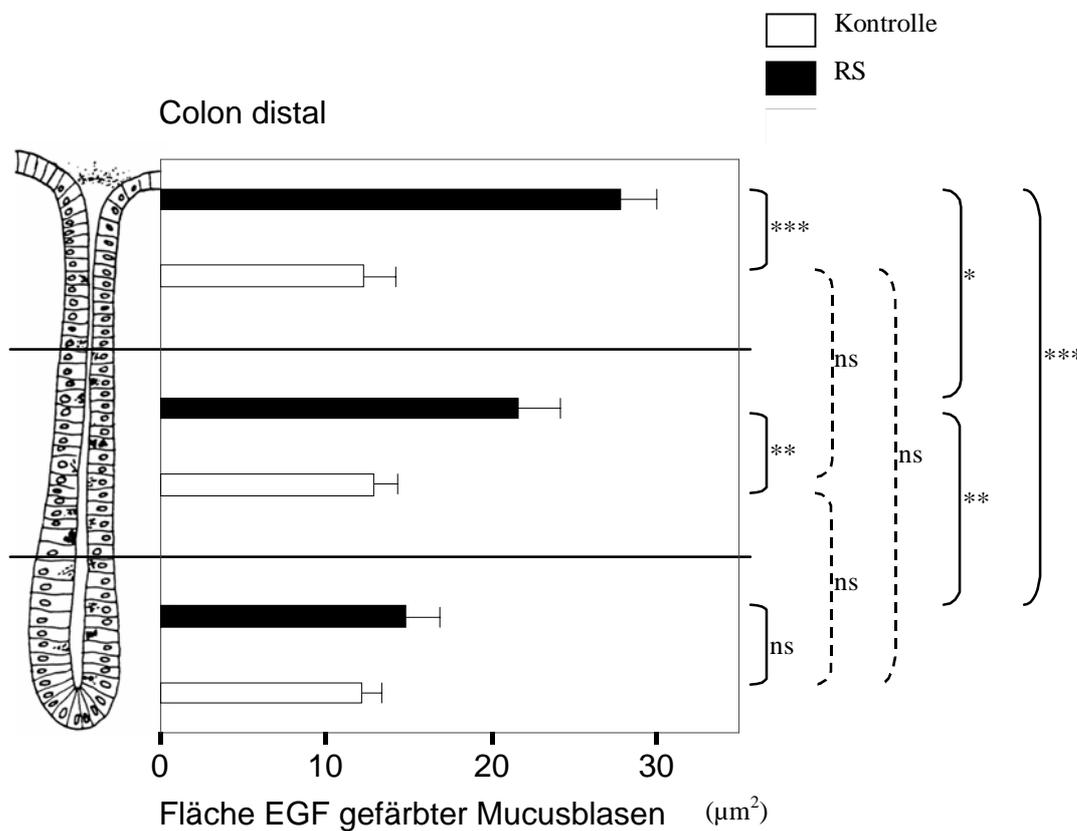


Abb. 37: Durchschnittliche Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen (µm²), Kontrollgruppe und RS Gruppe, Colon distal, Mittelwerte \pm SEM

Insgesamt zeigt die Analyse der EGF -haltigen Mucusflächen, daß die Resistente Stärke im Vergleich zur Ration der Kontrollgruppe sehr wohl einen Einfluß auf die sekretorische Aktivität der Gobletzellen hat.

In der RS Gruppe lag die durchschnittliche Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen über den Werten der Kontrollgruppe. Neben dieser allgemeinen Erhöhung EGF positiv gefärbter Mucusblasen war tendenziell die Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen in der RS Gruppe im luminalen Bereich erhöht. Die allgemeine Erhöhung der positiv gefärbten Fläche in der RS Gruppe scheint im Vergleich zur Lokalisation im Gewebe der wichtigere Aspekt zu sein.

4.6 Photographische Darstellung der immunocytochemisch nachgewiesenen Parameter

Im vorangegangenen Teil der Arbeit wurden die Auszählungsergebnisse der immunocytochemischen Färbungen graphisch dargestellt. Um die Spezifität der Färbung als auch die Lokalisation der gefärbten Zellen im Gewebe beurteilen zu können, ist im folgenden Teil eine exemplarische photographische Dokumentation wiedergegeben. Erstellt wurden die Photos im Lichtmikroskop, gegengefärbt wurde mit Hämatoxylin nach Mayer (Romeis, 1989). Da Gruppenunterschiede anhand einzelner Photos nur schwer zu erkennen sind, wurden die verschiedenen Färbungen nur exemplarisch dargestellt.

4.6.1 TUNEL- Färbung

In Abb. 38 sind verschiedene Gewebsschnitte der TUNEL- Färbung abgebildet. Die bräunlich angefärbten apoptotischen Zellen befinden sich in der Lamina epithelialis mucosae sowohl im luminalen (A) als auch basalen (B) Kompartiment der Krypte. Die Färbung ist sehr spezifisch, denn es werden nur einzelne Zellen angefärbt und die für die TUNEL- Färbung spezifischen Kriterien werden erfüllt. So fehlt die oft beobachtete und nichtspezifische Anfärbung des gesamten cytoplasmatischen Bereiches ganzer Zellverbände. Weiterhin ist die unspezifische Anfärbung des Hintergrundes nicht ausgeprägt und bei der Negativkontrolle (D) sind keine positiven Zellen vorhanden. Die gehäufte Anfärbung der Zellen bei der Positivkontrolle (C) resultiert aus der DNase Behandlung der Gewebsschnitte, diese gezielte Anfärbung der durch DNase bewirkten Veränderungen der DNA ist ein wichtiges Indiz für die Spezifität der Färbung.

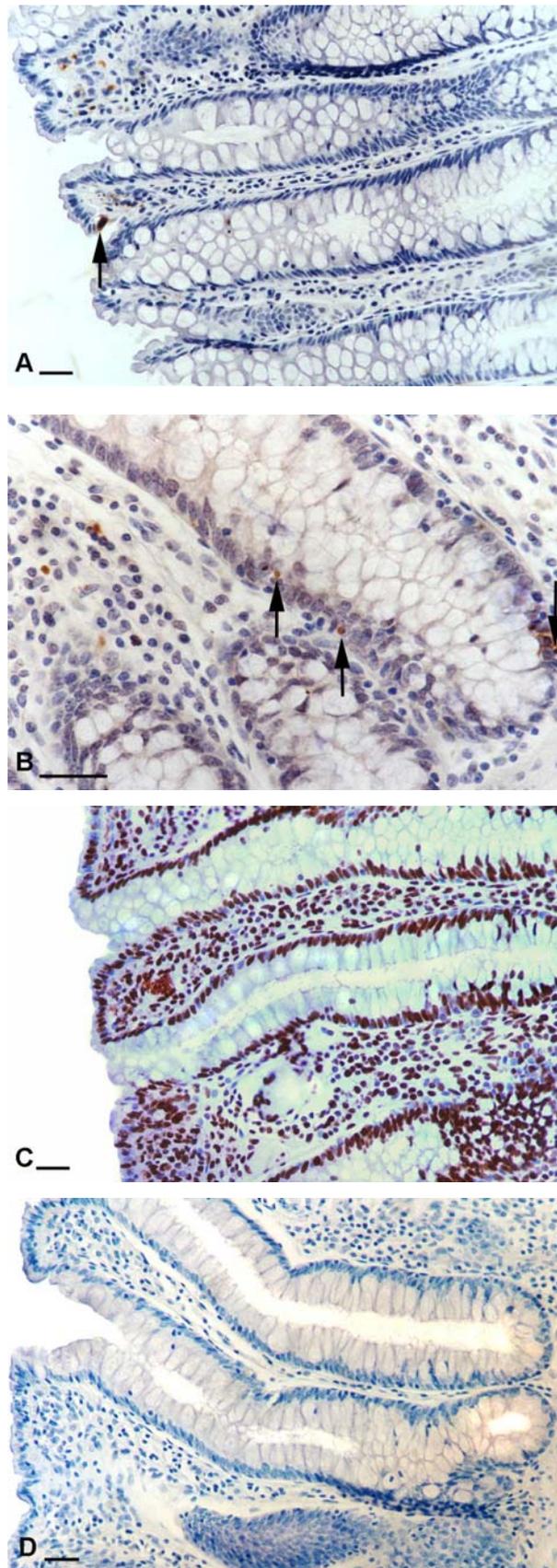


Abb. 38: Gewebsschnitte der Apoptosefärbung (TUNEL) des distalen Colons der RS Gruppe (A), RE Gruppe (B), einer Positivkontrolle (C) und einer Negativkontrolle (D). Die apoptotischen Zellen sind braun angefärbt. Der einkopierte schwarze Balken entspricht in Wirklichkeit: 36 μ m

4.6.2 Mitose (KI-67)- Färbung

In Abb. 39 ist ein Beispiel für die Ki-67 Färbung wiedergegeben. Der Gewebsschnitt stammt aus dem proximalen Bereich eines Kontrolltieres. Die mitotischen Zellen sind bei dieser Färbemethode braun angefärbt, sie befinden sich in der Lamina epithelialis mucosae vorrangig im basalen und mittleren Kompartiment der Krypte. Entsprechend der Lokalisation der Stammzellen findet die Mitose vorrangig im basalen und mittleren Bereich der Krypte statt. Der Bereich der Lamina propria mucosae, welcher ebenfalls zahlreiche Mitosen aufweist, wurde in dieser Arbeit nicht ausgewertet. Die spezifische Anfärbung des Zellkerns, die Lokalisation im Gewebe als auch das Fehlen Ki-67 positiver Zellen bei der Negativkontrolle sprechen für die Spezifität der Färbung.

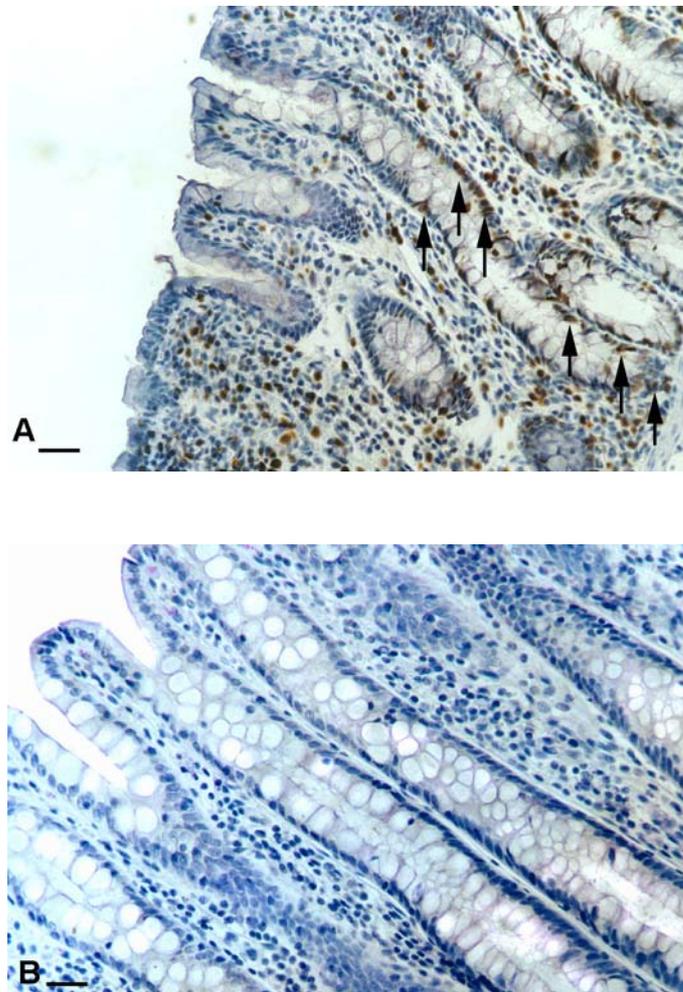


Abb. 39: Photographie einer Ki-67 – Färbung (A) bzw. Negativkontrolle (B); die mitotischen Zellen befinden sich in der Lamina epithelialis mucosae (A) vorrangig im basalen und mittleren Kompartiment (Pfeile); proximales Colon eines Kontrolltieres; Der einkopierte schwarze Balken entspricht in Wirklichkeit: 36µm

4.6.3 EGF- Färbung

In Abb. 40 wird die immunocytochemische Färbung des Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) in der Mucosaschicht des Colons wiedergegeben. EGF positiv gefärbte Becherzellen sind durch Pfeile beispielhaft gekennzeichnet. Ausgewertet wurden die Zellen der Lamina epithelialis mucosae. Angefärbt sind vorrangig die Becherzellen bzw. deren apikale Schleimblasen, mit Schwerpunkt im vom Lumen abgewandten lateralen Bereich der Blasen (Insert). Die durchschnittliche Fläche EGF positiv gefärbter Mucusblasen liegt in der RS Gruppe über den Werten der Kontrollgruppe. Dieser Sachverhalt ist jedoch in der Darstellung nicht ersichtlich, er wurde bei der Auswertung der Gewebsschnitte im Lichtmikroskop erhalten (siehe Abb. 27).

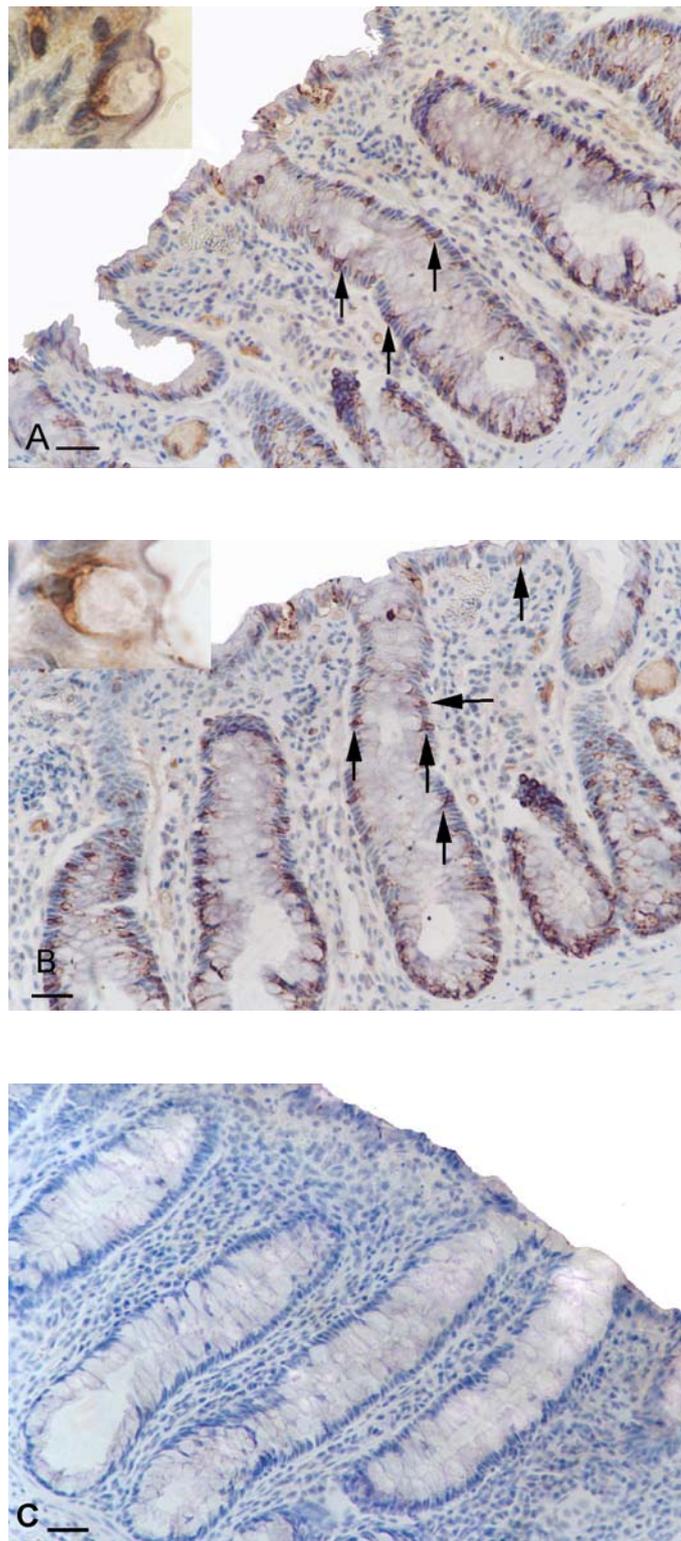


Abb. 40: Photographische Darstellung des immunocytochemisch angefärbten Epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) in Gewebsschnitten des distalen Colons der RE Gruppe (A) und Kontrollgruppe (B) mit Detailaufnahme. Die bräunlich angefärbten Zellen (Pfeile) repräsentieren EGF positive Zellen. In der Abbildung der Negativkontrolle (C) ist keine EGF Färbung ersichtlich. Der einkopierte schwarze Balken entspricht in Wirklichkeit: 36 μ m

4.6.4 Bak- Färbung

In Abb. 41 sind immunocytochemisch Bak positiv gefärbte Zellen in verschiedenen Gewebsschnitten des distalen und proximalen Colons der RS- Gruppe dargestellt. Positiv gefärbte Zellen (Pfeile) befinden sich in der Lamina epithelialis mucosae sowohl im luminalen als auch basalen Bereich der Krypten. Entsprechend der Ergebnisse in Abb. 24 können zahlreiche Zellen als Bak – positiv identifiziert werden. Angefärbt ist einerseits der gesamte cytoplasmatische Bereich mit Schwerpunkt in der perinukleären Region (Detailaufnahme B), andererseits werden granular- artige Strukturen erkannt (Detailaufnahme C). Bei der systematischen Auswertung im Lichtmikroskop konnte aufgrund fließender Übergänge beider Erscheinungsformen nicht zwischen rein- cytoplasmatischer und granularartiger Färbung differenziert werden.

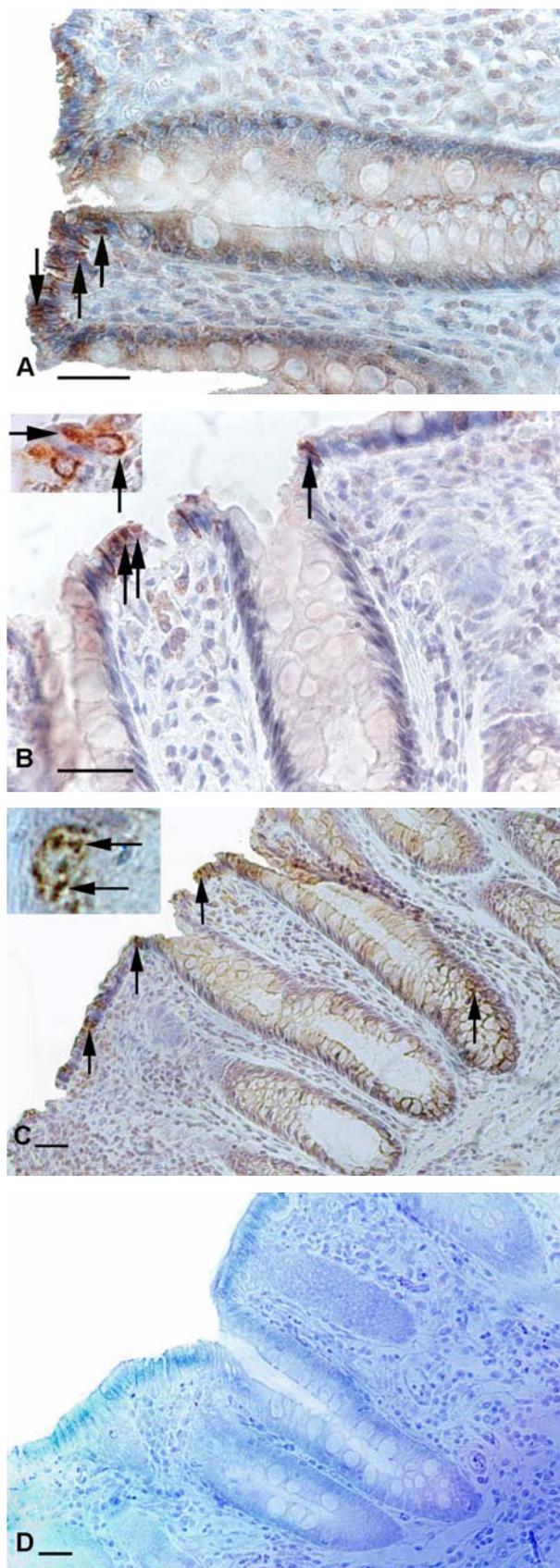


Abb. 41: Photographische Darstellung der immunocytochemischen Bak Färbung in Gewebsschnitten des distalen (A, C), des proximalen (B) Colons der RS- Gruppe und einer Negativkontrolle. Die bräunlich angefärbten Zellen (Pfeile) stellen Bak positive Zellen dar. Der eingekopierte schwarze Balken entspricht in Wirklichkeit: 36 μ m

4.6.5 Bcl-2- Färbung

Die immunocytochemische Färbung von Bcl-2 ist in der Abb. 42 dargestellt. Die Aufnahmen repräsentieren Gewebsschnitte eines Kontrolltieres. Neben der zahlreichen Anfärbung in der Lamina epithelialis mucosae wird ebenfalls eine Färbung in der Lamina propria mucosae beobachtet. Die für Bcl-2 charakteristische Färbung im Cytoplasma der Zellen ist teilweise auch perinukleär ausgeprägt (A). Das Fehlen der Anfärbung bei der Negativkontrolle einerseits als auch die Lokalisation (basaler Bereich der Krypte, Cytoplasma) andererseits sprechen für die Spezifität der Färbung. Die in den Lymphfollikeln des Colons ausgeprägte Anfärbung (D) dient als interne Positivkontrolle.

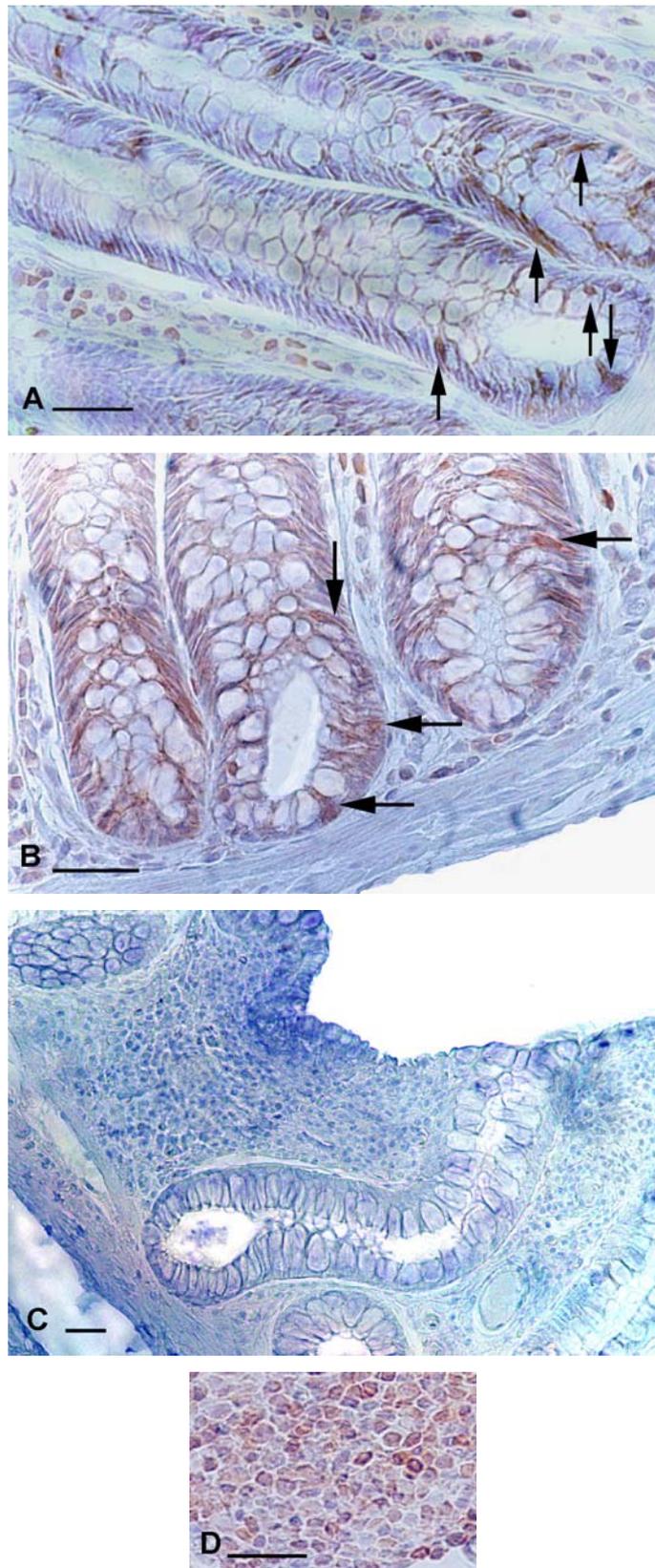


Abb. 42: Gewebsschnitte der immunocytochemischen bcl-2 Färbung des distalen Colons eines Kontrolltieres (A, B), entsprechende Negativkontrolle (C) und Lymphfollikel des Colons als interne Positivkontrolle (D). Pfeile zeigen Beispiele Bcl-2 positiv gefärbter Zellen. Der einkopierte schwarze Balken entspricht in Wirklichkeit: 36 μ m

5 Diskussion

Überblick und Bedeutung von Butyrat für den Dickdarm:

Die Funktionalität einzelner Organe und damit auch des Verdauungstraktes wird durch die Aufrechterhaltung der Gewebshomeostase gesichert, welche durch ein geordnetes Zusammenspiel von Mitose und Apoptose bedingt wird. Pro Zeiteinheit müssen ebensoviel Zellen nachgebildet werden wie durch den Zelltod verloren gehen. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes kann entweder zu einem Zuwachs des Gewebes oder zur Degeneration bzw. Abnahme desselben führen. Beide Inbalancen können krankhafte Gewebsentwicklungen zur Konsequenz haben, so führt eine Abnahme der Zellzahl zu einer Gewebsatrophie, eine Zunahme zur Hyperproliferation, die wiederum als Vorstufe von Tumoren gilt (Young & Gibson, 1995). Hinsichtlich des Gastrointestinaltraktes wurden solche Entgleisungen vor allem im Colon beobachtet (Potten et al., 1992), so daß Colontumore (als häufigste Ursache tumorbedingter Todesfälle) in ihrer Entstehungsgeschichte durch die charakteristische Sequenz Hyperproliferation - Polypenbildung – Tumor gekennzeichnet sind. Neben einer genetischen Disposition greifen auch nutritive Faktoren steuernd in die Regulationsprozesse des Zellturnovers ein. Eine besondere Bedeutung spielen in diesem Zusammenhang die kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acid), welche im Dickdarmbereich bei der Fermentation praecaecal unverdaulicher Kohlenhydrate entstehen. So verursachen reduzierte Gehalte an SCFA degenerative Erscheinungen an der Darmmucosa. Vor allem Butyrat scheint eine zentrale Rolle zu spielen, denn die Infusion dieser flüchtigen Fettsäure kann die Regeneration einer atrophischen Colonschleimhaut induzieren (Sakata, 1987; Kripke et al., 1989). Um die Ursachen der von Butyrat bedingten Gewebsveränderungen herauszufinden, wurde in zahlreichen Studien die Wirkung von Butyrat auf die Zellteilung, die Differenzierung und die Apoptose untersucht. Entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeiten wird die Wirkung von Butyrat kontrovers diskutiert, denn die Versuche führten im Vergleich von in vivo zu in vitro Studien als auch im Vergleich von gesunden und neoplastischen Geweben zu widersprüchlichen Resultaten. So wird die Apoptose in vitro bei normalem Gewebe durch Butyrat vermindert, während sie bei neoplastischem Gewebe erhöht ist. Die Widersprüche sind so eklatant, daß sie in der Literatur mitunter als Butyrat- Paradox bezeichnet werden (Velazquez et al., 1996).

Studienvergleich und das Modell Schwein:

Abgesehen von den zahlreichen in- vitro Studien, wurde eine Vielzahl dieser Arbeiten an Ratten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind jedoch nur bedingt auf den Menschen

übertragbar, denn einerseits können Versuche unter in vitro Bedingungen nur teilweise mit den komplexen in vivo Abläufen verglichen werden, andererseits sind Ratten aufgrund verdauungsphysiologischer Eigenschaften nur bedingt mit dem Menschen vergleichbar.

Demzufolge war es Ziel dieser Arbeit, ein Tiermodell aufzubauen, mit dem die Effekte von Butyrat auf Turnover Phänomene im Colon untersucht werden können und dessen Ergebnisse auf den Menschen großteils übertragbar sind. Die Bildung von Butyrat sollte durch die Verabreichung von Nahrungsmitteln erreicht werden, welche auch in der humanen Ernährung eingesetzt werden. Aus diesen Gründen wurde rohe Kartoffelstärke als Hauptenergiequelle gewählt. Das Schwein ist ein gutes Modell für humane Ernährungsstudien, da die Anatomie des Gastrointestinaltraktes, die Verdauungsphysiologie und die nutritiven Ansprüche dem Menschen ähnlicher sind als bei anderen Tierarten (Graham & Aman, 1982; Miller & Ullrey, 1987). Zudem ist die Fermentation praecaecal unverdaulicher Kohlenhydrate bei Schweinen und Menschen vorrangig im Colon lokalisiert, während sie bei Ratten hauptsächlich im Caecum abläuft.

Diskussion der Methodik:

Abgesehen von den beschriebenen Vorteilen sind die Forschungsmöglichkeiten bei Schweinen limitiert, so sind nur begrenzt porcine Antikörper für die Immunocytochemie kommerziell verfügbar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper zeichneten sich durch eine hohe Speziespezifität aus, da sie zum Teil gegen recombinant hergestellte Proteine des Schweines erzeugt worden waren (z.B. EGF), bzw. die Aminosäuresequenzen wenig Unterschiede zwischen den Spezies aufweisen, so daß ratten- oder humanspezifische Antiseren auch beim Schwein kreuzreagieren. Zudem wird durch das Fehlen jeglicher Anfärbung bei der Negativkontrolle die Anwendbarkeit der Antikörper auf porcinen Gewebe bestätigt. Hinzukommend wurde ein Teil der Antikörper wie bcl-2 (Smith et al., 1998) und KI-67 (Shayan et al., 1999; Garrett et al., 1999) bereits an porcinen Gewebe getestet. Da bei der TUNEL-Technik DNA – Bruchstücke detektiert werden, gilt die Anwendung als speziesunabhängig. Außerdem war bei der mitgeführten Positivkontrolle eine hohe Färbeintensität zu beobachten und es war keine Hintergrundanfärbung zu beobachten. Weiterhin wurde die TUNEL- Färbung bereits bei Schweinen getestet (Wakiyana et al., 2002; Sirotkin & Makarevich, 2002), die Anzahl TUNEL positiver Zellen in der Colonmucosa entspricht den Angaben aus der Literatur (Moss et al., 1996b). Der speziell für porcines Gewebe entwickelte Antikörper für EGF ist institutseigen (Claus et al., 2001).

Auswirkungen der Fütterung auf die erfaßten Parameter:

Neben der Spezifität der immunocytochemischen Färbungen galt für das Gelingen der Arbeit die Bildung von Butyrat aus roher Kartoffelstärke als Voraussetzung für den Versuch. Kontrolliert wurde die Bildung von Butyrat über die Messung der SCFA in den täglich gesammelten Kotproben. Da bei der Probenerfassung darauf geachtet wurde, frisch abgesetzten Kot zu sammeln, kann davon ausgegangen werden, daß emissive Verluste zu vernachlässigen sind. Der Verlauf der SCFA und speziell der von Butyrat kann in deutlicher Abhängigkeit zur Fütterung gesehen werden. Demnach stiegen die SCFA Konzentrationen im Allgemeinen und speziell von Butyrat während der Phasen mit Fütterung von resistenter Stärke deutlich an. Nach Futterumstellung von Quellstärke auf rohe Kartoffelstärke war in der RS Gruppen ein Butyratanstieg um das 2,2-fache zu verzeichnen (Abb. 18). Bei der Gruppe mit vorgeschalteter Hungerphase (RE) war der Anstieg noch deutlicher ausgeprägt. Einen weiteren Hinweis für die Abhängigkeit der Butyratbildung von der Fütterung roher Kartoffelstärke geben der Vergleich der 19-tägigen Hauptphase der Kontrollgruppe und der Vorphase der Behandlungsgruppen, denn in beiden voneinander unabhängigen Versuchszeiträumen wurden unter der Fütterung von Quellstärke ähnlich niedrige Konzentrationen von SCFA gemessen. Die in diesem Versuch beobachtete Butyratbildung aus roher Kartoffelstärke bestätigt Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Martin et al., 1998; Le Blay et al., 1999). Die Messung von Butyrat im Kot läßt auf eine Bildung im Dickdarmbereich schließen, jedoch können keine Aussagen über den hauptsächlichen Bildungsort getroffen werden. Ähnliche bzw. nur geringe Unterschiede bezüglich der immunocytochemisch gemessenen Parameter im Vergleich von proximalen und distalen Colon innerhalb der Gruppen lassen darauf schließen, daß die Verteilung von Butyrat im Colon relativ konstant gewesen sein dürfte. Hinweise bezüglich der Richtigkeit dieser Aussage können auch aus der Literatur entnommen werden. So konnte gezeigt werden, daß bei der Verfütterung von resistenter Stärke und Weizenkleie an Schweine die Konzentrationen von Butyrat zwischen proximalen und distalen Colon nur geringfügig voneinander abweichen (Govers et al., 1999). Unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse scheint rohe Kartoffelstärke ein geeignetes Futtermittel zu sei, um die Butyratbildung im Colon zu fördern. Außerdem lagen die gemessenen Konzentrationen von Butyrat im Kot innerhalb der für Schweine diskutierten Schwankungsbreiten (Schnabel et al., 1990).

Parallel zum SCFA- Anstieg bei der Futterumstellung von Quellstärke auf die Ration mit resistenter Stärke war ein Abfall des pH Wertes um zwei Stufen zu verzeichnen. Ähnliche Reaktionen wurden auch von Younes et al. (1995) berichtet. Durch den Einsatz von roher Kartoffelstärke in der Ration wurde in diesen Versuchen ein pH- Abfall im Caecum von 7.22 auf

5,42 erreicht. Andere Ursachen wie die Verfügbarkeit von Substanzen mit unterschiedlicher Pufferkapazität können wohl ausgeschlossen werden, da die unterschiedlichen Futterrationen bis auf die verschiedenen Stärkearten sehr ähnlich zusammengesetzt waren. Weiterhin ist bekannt, daß der pH- Wert negativ mit der SCFA- Bildung aus resistenter Stärke korreliert (Campbell et al., 1997; Yanahira et al., 1997). Da die beobachteten Schwankungen des pH- Wertes innerhalb der physiologischen Streuung lagen (Topping & Clifton, 2001), sind keine negativen Auswirkungen auf die Epithelzellen zu erwarten. Allerdings könnte die veränderte sekretorische Aktivität der Gobletzellen eine Schutzmaßnahme darstellen. Auch im Rahmen der histologischen Untersuchungen konnten weder Entzündungen noch Nester nekrotischer Zellen oder Hinweise auf pathologische Prozesse festgestellt werden. Außerdem werden einem niedrigen pH- Wert sogar positive Effekte zugesprochen. So wurde zum Beispiel gezeigt, daß eine hohe Azidität (pH 5), durch SCFA verursacht, E. coli- Bakterien abtöten können (Cherrington et al., 1991). Weiterhin wurde bei der Berechnung der Futterrationen darauf geachtet, sämtliche Versuchstiere hinsichtlich der Nährstoffversorgung adäquat und im Gruppenvergleich gleichwertig zu versorgen. Da es sich im vorliegenden Fall nicht um einen Mastversuch handelte, wurden mittlere Gewichtszunahmen angestrebt. Eine ausgeglichene Energie- und Proteinversorgung der Versuchstiere sollte gewährleisten, daß Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Parameter eindeutig auf die unterschiedlichen Stärkearten zurückzuführen sind und nicht aus eventuellen Mangelerscheinungen resultieren. Kontrolliert wurde dies teilweise über die Erfassung des Körpergewichtes. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, verlief die Gewichtsentwicklung in den Versuchsgruppen während der Hauptfütterungsphase sehr ähnlich, wenn auch tierindividuelle Unterschiede bestanden. Dies wurde jedoch zum Teil durch das Versuchsdesign bedingt, denn bei den Tieren der RE Gruppe war während der Hungerphase eine Gewichtsreduzierung festzustellen. Die anschließende Anfütterung führte zu kompensatorischen Wachstumserscheinungen mit kurzzeitig erhöhten täglichen Zunahmen. Zusammenfassend betrachtet wurde im Versuch die erstrebte Gewichtszunahme erreicht, es kann davon ausgegangen werden, daß eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet war.

Um die Auswirkung der unterschiedlichen Fütterung auf das Colonepithel zu ermitteln, wurde die Morphologie des Colonepithels der verschiedenen Fütterungsgruppen im Lichtmikroskop untersucht. Dabei wurde bei den mit resistenter Stärke gefütterten Tieren ein Epithelzuwachs von 20 % im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Ermittelt wurde der Epithelzuwachs, indem die Anzahl der Colonocyten entlang der Kryptenachse von den Kontrolltieren mit denen der Behandlungsgruppen verglichen wurde. Bezüglich des Epithelzuwachses als auch der

weiteren gemessenen Parameter wurden keine bzw. nur geringe Unterschiede zwischen der RS und RE Gruppe festgestellt. Die bei der Versuchsplanung aufgestellte Hypothese, durch eine vorgeschaltete Hungerphase gewebliche Unterschiede im Vergleich zur RS Gruppe festzustellen, konnte nicht bestätigt werden. Diese Beobachtung dürfte auf die relativ lange Hauptphase zurückzuführen sein, denn die durchschnittliche Lebensspanne von Zellen des gastrointestinalen Traktes liegt bei ca. 3-5 Tagen (Potten, 1992). Aus diesem Grund werden im folgenden Teil nur die Ergebnisse der RS Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe diskutiert. Es kann angenommen werden, daß die Effekte des Epithelzuwachses auf die erhöhte Bildung von Butyrat zurückzuführen ist. Laut Literaturangaben könnte auch Propionat oder Azetat für diesen Behandlungseffekt verantwortlich sein (Jacobasch et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit kann die Wirkung dieser beiden Fettsäuren vernachlässigt werden, da zum einen entsprechend den Messungen im Kot kein Propionatanstieg festgestellt wurde, zum anderen die Wirkung von Acetat auf lokale Regulationsprozesse wesentlich geringer ist als diejenige von Butyrat (Hague et al., 1993). Außerdem wird Azetat hauptsächlich im Muskelgewebe metabolisiert und Propionat in der Leber, während Butyrat hauptsächlich im Epithel des Colons verstoffwechselt wird (Cummings & Macfarlane, 1997).

Bedeutung der Mitose und Apoptose und deren Regulation:

Die fördernde Wirkung von Butyrat auf das Wachstum der Mucosa im Colon wurde bereits in der Literatur beschrieben (Bartram et al., 1993; Sakata, 1987). Da Butyrat die Hauptenergiequelle für Colonocyten darstellt (Roediger, 1980), wäre eine mitosefördernde Wirkung von Butyrat zu erwarten. Tatsächlich kann jedoch die unterschiedliche Epithelhöhe nicht auf eine erhöhte Zellteilungsrate in den Behandlungsgruppen zurückgeführt werden, denn die Mitoserate lag bei den Tieren der unterschiedlichen Behandlungsgruppen auf einem ähnlichen Niveau. Diese Beobachtung scheint zahlreichen Studien, in denen Butyrat eine mitogene Wirkung zugesprochen wurde zu widersprechen (Scheppach et al., 1993; Sakata, 1987). Jedoch wurde in diesen Versuchen unter dem Einfluß von Butyrat nur eine kurzzeitige Erhöhung der Mitoserate beobachtet. In Versuchen über einen längeren Zeitraum konnte entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit dagegen kein mitogener Effekt beobachtet werden (Goodlad, 1981). Selbst wenn eine erhöhte Mitoserate vorhanden ist, führt dies nicht zwangsläufig zu einem erhöhten Epithelzuwachs, denn in Geweben mit einer hohen Turn-over Rate wie zum Beispiel im Colon ist stets die Balance zwischen Zellteilung und Zelltod für die Aufrechterhaltung der Zellzahl verantwortlich (Kerr et al., 1972). Demnach könnte ein Epithelzuwachs selbst durch eine verminderte Mitoserate erreicht werden, wenn das Ausmaß der Reduzierung der Apoptose verhältnismäßig über demjenigen der Mitose liegt. Im vorliegen-

den Fall konnte in den Gruppen mit erhöhter Butyratbildung der Epithelzuwachs auf eine allgemeine Verminderung der Apoptose bei unveränderter Mitoserate zurückgeführt werden, denn bei den mit resistenter Stärke gefütterten Tieren lag die Anzahl apoptotischer Zellen pro Hemikrypte deutlich unter der Anzahl der Kontrollgruppe. Diese auf Butyrat zurückzuführende Reduktion der Apoptose steht im Widerspruch zu zahlreichen *in vitro* Studien an transformierten Zellen (z.B. Mandal et al., 2001), in welchen für Butyrat eine apoptosefördernde Wirkung nachgewiesen wurde. Eine Apoptosehemmung durch Butyrat wurde in Inkubationsstudien (Hass et al., 1997) beschrieben und war auch Ergebnis von *in vivo* Versuchen am Kälberpansen (Mentschel et al., 2002). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen somit beide bereits in der Literatur beschriebenen Effekte von Butyrat, nämlich die Förderung der Apoptose in neoplastischen Geweben, als auch die Reduktion der Apoptose in normalen Zellen *in vivo* (Hague et al., 1997b).

Da luminale Nahrungsbestandteile des Verdauungsbreies das Muster der Gen- Expression verändern können und somit das Ausmaß der Apoptose beeinflussen können (Hague et al., 1997a), wurden zur Klärung der Apoptoseregulation Vertreter der Bcl-2 Familie untersucht. Diese Proteine der Bcl-2 Familie nehmen bei der Regulation der Apoptose eine wichtige Funktion ein, eingeteilt werden sie nach ihrer Wirkung in antiapoptotische (z.B.: Bcl-2, Bcl-X_L) und proapoptotische Proteine (z.B.: Bax, Bak).

Im vorliegenden Versuch scheint die allgemeine Verminderung der Apoptose mit der vermehrten Expression von bcl-2 in den Krypten der Behandlungsgruppen übereinzustimmen. Jedoch wurde neben der erhöhten Expression dieses antiapoptotisch wirkenden Proteins ebenfalls eine erhöhte Expression des proapoptotisch wirkenden Proteins Bak beobachtet. Da die proapoptotischen Vertreter der bcl-2 Familie antagonistisch zu den antiapoptotischen Mitgliedern wirken, indem Heterodimere gebildet werden, ist nicht das Einzelprotein sondern die Gleichgewichtslage ausschlaggebend für die apoptoseregulierende Wirkung solcher Proteine (Hsu & Youle, 1997; Knudson & Korsmeyer, 1997). Daher scheint im vorliegenden Versuch die Hemmung der Apoptose anhand der beiden untersuchten Vertreter der bcl-2 Familie nicht ausreichend charakterisiert zu sein. Zudem waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nur im proximalen Colon signifikant. Im Gegensatz dazu scheint der ebenfalls immunocytochemisch gemessene Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) mit der Reduzierung der Apoptose in Zusammenhang zu stehen. EGF ist neben seiner mitogenen Wirkung auch an der Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität vieler Organe beteiligt (Claus et al., 2001). Zwar lag der Anteil EGF positiv gefärbter Zellen bei der Behandlungsgruppe nur geringfügig über den Wert der Kontrolle, jedoch lag die EGF positiv gefärbte Mucusfläche bei der RS- Gruppe

hoch signifikant über den Werten der Kontrolle. Gestützt wird dieser Sachverhalt aus Angaben aus der Literatur. So ist bekannt, daß EGF Zellen vor der Induktion der Apoptose schützen kann (Survivalfunktion) (Hague et al., 1997c). Weiterhin wird vermutet, daß EGF die Apoptose von Enterocyten verzögert, indem die Expression spezifischer Mitglieder der bcl-2 Familie reguliert wird (O'Brien et al., 2001). Zudem wurde beobachtet, daß EGF die Apoptose von Enterocyten während Adaptationsprozessen nach einer Resektion eines Darmabschnittes hemmt und Butyrat die Bildung von Mucus im Colon fördert (Smith et al., 1998).

Detailmechanismen der Apoptose:

Unter Berücksichtigung der verminderten Apoptose von 40 % im proximalen und 54% im distalen Colon der RS Gruppe im Vergleich zur Kontrolle liegt der beobachtete Epithelzuwachs von 20 % bei gleicher Mitoserate unter den Erwartungen. Aufschluß über den relativ geringen Epithelzuwachs gibt die Verteilung der Apoptose entlang der Kryptenachse. Während bei den Kontrolltieren der Schwerpunkt der Apoptose im luminalen Kompartiment lag, wurden bei den Tieren der RS Gruppe wesentlich mehr Zellen im basal gelegenen Kompartiment beseitigt als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Diese erhöhte Apoptose im basalen Bereich ist letztendlich für den nur um 20% erhöhten Epithelzuwachs verantwortlich. Der Grund hierfür dürfte in der Eliminierung von Colonocyten bereits im Stammzellbereich liegen. Aufgrund dieses Prinzips der vorzeitigen Apoptose, sinkt die durchschnittliche Lebensdauer der Zellen und der Epithelzuwachs fällt in der RS Gruppe geringer aus, obwohl in beiden Gruppen ebensoviel Zellen gebildet werden. Im Allgemeinen beinhaltet der Prozeß der Erneuerung der Colonmucosa die Proliferation von Enterocyten in den basal gelegenen Regionen der Krypten, die Differenzierung und Wanderung entlang der Kryptenachse in Richtung Oberflächenepithel und schließlich den Verlust der Zellen durch Absonderung von der luminalen Oberfläche. Im vorliegenden Fall jedoch handelt es sich um einen weiteren Mechanismus zur Beseitigung von Enterocyten in der Colonmucosa, bei welchem die apoptotischen Zellen durch benachbarte Zellen (Lifshitz et al., 1998) aufgenommen werden. Diese Art der Apoptose ist im Gegensatz zur Extrusion an der luminalen Oberfläche in den basal gelegenen Kompartimenten innerhalb der Proliferationszone gelegen (Sträter et al., 1995). Entsprechend den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit wird angenommen, daß die Positionierung der Apoptose in den basalen Bereichen der Krypte vor einer Hyperplasie des Gewebes schützt (Loeffler et al., 1993). Gleichsinnig wird diskutiert, diese Art der Apoptose beseitige zu viel produzierte Zellen (Haake et al., 1993). Da diese Art der Apoptose auch nach Bestrahlung des Gewebes als auch nach Gabe cytotoxischer Substanzen beobachtet wurde, wird zudem diskutiert, daß auf diese Weise eventuell geschädigte Zellen beseitigt werden können (Potten et al., 1992;

Sträter et al., 1995; Ijiri & Potten, 1987). Demnach wäre es möglich, daß unter dem Einfluß von Butyrat, welches eine allgemeine Reduzierung der Apoptose bewirkt, der Organismus sich es leisten kann, eventuell geschädigte Zellen zu eliminieren. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht untersucht werden, ob es sich um geschädigte Zellen handelte.

Einhergehend mit der erhöhten Apoptose im basalen Kryptenbereich der RS Gruppe wurden bei dieser Fütterungsgruppe relativ mehr Zellen im mittleren Kompartiment nachgebildet. Dabei dürfte es sich um sog. Transitzellen handeln, welche aus Stammzellen hervorgehen und als Zwischenstufe von Stammzellen und funktionstüchtigen Zellen zu sehen sind. Sie unterscheiden sich von den Stammzellen durch den teilweise vorhandenen Differenzierungs- und Reifungsgrad in Richtung maturer Zellen. Sie sind zwischen dem Stammzellkompartiment und den funktionalen Zellen lokalisiert. Dementsprechend besitzen sie sowohl Eigenschaften der Stammzellen als auch der bereits differenzierten Zellen, sie können sich vier- bis sechsmal teilen (Potten & Loeffler, 1990). Die erhöhte Mitoserate im mittleren Kompartiment und somit die Ausdehnung der Proliferationszone könnte als Gegenspieler zu der basal gelegenen Apoptose gesehen werden, indem der Organismus versucht basal eliminierte Zellen zu ersetzen und somit die Effekte auf den Epithelzuwachs zu kompensieren. Die Auswirkung auf die durchschnittliche Lebensspanne der Colonocyten dürfte jedoch aufgrund der Lage im mittleren Kompartiment deutlich geringer ausfallen als die Wirkung der basalen Apoptose, da Zellen, welche im mittleren Kompartiment nachgebildet werden, aufgrund der Wanderung entlang der Kryptenachse relativ nahe zum luminalen Apoptosebereich gelegen sind und somit um so schneller beseitigt werden. Weiterhin wird bei der TUNEL- Färbung ein nur sehr kurzer Zeitraum (2-4h) erfaßt (Colucci, 1996). Bei der Messung der Mitose mittels KI-67 wird hingegen ein wesentlich längerer Zeitraum bestimmt, dessen Länge (12-32h) wiederum stark variieren kann (Potten & Loeffler, 1990). Eine exakte mathematische Berechnung zur Überprüfung des Epithelzuwachses anhand der vorliegenden Daten wäre somit fehlerhaft.

Entsprechend dem Auswertschema bei der Apoptose wurde die Verteilung von bcl-2 und bak entlang der Kryptenachse untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß der Schwerpunkt der Bcl-2 Expression in der RS Gruppe im luminalen Kompartiment lag. Diese erhöhte Expression von bcl-2 steht im Einklang mit der verminderten Apoptose im luminalen Bereich. Die Werte von bak lagen zwar in der RS Gruppe in diesem Kompartiment geringfügig über denjenigen der Kontrolle, jedoch wurde in der RS Gruppe auch mehr bcl-2 exprimiert. Außerdem waren absolut gesehen in der RS Gruppe weniger Zellen bak positiv angefärbt als bcl-2 (Zellen). In der Kontrolle hingegen waren weniger Zellen bcl-2 als bak positiv angefärbt. Die reduzierte

Apoptoserate im luminalen Bereich der Krypten in der RS Gruppe scheint somit von Vertretern der bcl-2 Familie geregelt zu werden.

Gleichsinnige Phänomene werden im basalen Bereich beobachtet. So wurden in der RS Gruppe im basalen Kompartiment verhältnismäßig mehr bak positive Zellen gefunden als im Gewebe der Kontrolltiere, jedoch auch mehr bcl-2 Zellen. Weiterhin waren absolut gesehen in der RS Gruppe mehr Zellen bak positiv als bcl-2 positiv angefärbt und in der Kontrollgruppe weniger bak positiv als bcl-2. Bcl-2 und bak scheinen somit bei erhöhten Butyratkonzentrationen an der Regulation der Apoptose im Colon maßgeblich beteiligt zu sein. Die Beteiligung von bcl-2 und bak an den von Butyrat beeinflussten Zelltod wurde bereits in anderen Studien beschrieben. Demnach wurde in Untersuchungen an Krebszelllinien des Colons erhöhte Werte des Proteins Bak nach einer Behandlung mit Butyrat nachgewiesen (Moss et al., 1996a). Aus anderen Untersuchungen an Krebszelllinien wird sogar gefolgert, daß unter der Wirkung von Butyrat eine Überexpression von bcl-2 nicht vor bak vermittelter Apoptose schützen kann (Hague et al., 1997a). In diesen Studien scheint bcl-2 nicht in der Lage zu sein, den proapoptischen Eigenschaften von bak entgegenzuwirken.

EGF scheint bezüglich der Kompartimentierung der Apoptose eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im distalen Colon war zwar lumenwärts die Fläche EGF positiv gefärbter Zellen doppelt so groß als im basalen Bereich, jedoch waren die Unterschiede im proximalen Colon nicht signifikant. Somit scheint unter Butyratwirkung EGF an der Regulation der gesamten Apoptose in der Colonmucosa beteiligt zu sein. Der Einfluß auf die einzelnen Kompartimente scheint vernachlässigbar zu sein.

Weitere Diskussionsansätze:

Aus der Beteiligung von Mitgliedern der bcl-2 Familie an dem von Butyrat vermittelten Apoptoseprozessen ergeben sich weitere interessante Diskussionsansätze. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, daß die Vertreter der bcl-2 Familie am mitochondrialen Apoptosepfad beteiligt sind (Adams & Cory, 2001; Gross et al., 1999). Mitochondrien nehmen wiederum eine zentrale Stellung beim Ablauf der Apoptose ein, so vermitteln sie z.B. über die Ausschüttung von Cytochrom c letztendlich die Aktivierung von Effektorcaspasen, welche für die apoptotischen Veränderungen verantwortlich sind (Kluck et al., 1997; Liu et al., 1996; Susin et al., 1996, 1999; Yang et al., 1997; Zamzami et al., 1996). Neben dieser zentralen Bedeutung beim Ablauf der Apoptose werden die Mitochondrien aufgrund ihrer Funktion bei der Energiebereitstellung als Kraftwerke (powerhouse) der Zellen bezeichnet (Pedersen, 1999). Da Butyrat die Hauptenergiequelle für Colonocyten darstellt (Roediger, 1980), scheint es sehr interessant, daß Butyrat über die Mitochondrien-Funktion für das Schicksal der Zelle verantwortlich

ist, zum einen als Energiequelle und zum anderen als Mediator von Apoptose. Die Rolle von Mitochondrien einerseits als „cell’s powerhouse“ und andererseits deren zentrale Bedeutung bei der Kontrolle der Apoptose werden in der Literatur beschrieben (Ravagnan et al., 2002) und als Schwerpunkt neuester Forschungsbereiche verstanden. Die Beteiligung von Butyrat an diesen Regulationsprozessen ist jedoch ein neuer Diskussionsaspekt.

Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Konsens aus den *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben werden. Unter der Wirkung von Butyrat wird einerseits eine allgemeine Reduzierung der Apoptose in der gesamten Colonmucosa beobachtet. Bestätigt werden hierdurch Ergebnisse, welche in Inkubationsstudien und am *in-vivo* Modell beobachtet wurden (Hass et al., 1997; Mentschel et al., 2002). Andererseits wurde neben dieser allgemeinen Verminderung der Apoptose relativ mehr apoptotische Zellen im basalen Kompartiment beobachtet, diese Beobachtung entspricht den *in vitro* Ergebnissen von transformierten Zellen. Sowohl die von Butyrat bedingte Hemmung der Apoptose als auch die lokale Förderung im Stammzellbereich könnten aus physiologischen Gesichtspunkten als erstrebenswert eingestuft werden.

6 Zusammenfassung

Der Einfluß der Ernährung auf den Gesundheitszustand sowohl des Menschen als auch von landwirtschaftlichen Nutztieren ist ein aktuelles Forschungsgebiet. Von hohem Interesse sind in diesem Zusammenhang Komponenten natürlich vorkommender Nahrungsmittel, welche fördernd auf den Gesundheitszustand des Organismus wirken. In der Tierernährung werden positive Effekte prae- als auch probiotischer Inhaltsstoffe diskutiert, um aufbauend auf ihrer prophylaktischen Wirkung den Einsatz von Antibiotika zu verringern. In der Humanernährung wird aufgrund epidemiologischer Studien der Rohfaser in der Nahrung eine hemmende Wirkung auf die Colonicarcinogenese zugesprochen. Eine besondere Bedeutung spielen in diesem Zusammenhang die Short Chain Fatty Acids (SCFA), welche im Dickdarm durch Fermentation praecaecal unverdaulicher Kohlenhydrate entstehen. So führen z.B. reduzierte Gehalte an SCFA zu degenerativen Erscheinungen an der Darmmucosa. Vor allem Butyrat spielt eine zentrale Rolle, denn die Infusion von Butyrat kann die Regeneration einer atrophischen Colonschleimhaut induzieren. Neben diesen regenerativen Eigenschaften wird angenommen, daß speziell Butyrat vor Dickdarmkrebs schützt.

Um die Ursachen der von Butyrat bedingten Gewebsveränderungen zu klären, wurde in zahlreichen Studien die Wirkung von Butyrat auf die Proliferation, die Differenzierung der Zellen und die Apoptose untersucht. Dabei zeigte sich, daß sich die Wirkung von Butyrat im Vergleich von in vivo - und in vitro - Studien deutlich unterscheidet. So wird die Apoptose bei gesunden Geweben in vivo vermindert und bei neoplastischen Geweben in vitro erhöht. Die Ursachen dieses Phänomens als auch die Regulation der Apoptose unter Butyrat-einfluß in vivo konnten bisher nicht geklärt werden.

Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit der Einfluß von Butyrat auf Proliferationsprozesse des Colons untersucht. Schwerpunkt war in diesem Zusammenhang die Apoptose der Colonocyten und deren Regulation. Um eine erhöhte Butyratbildung im Colon von Schweinen zu erreichen, wurde resistente Kartoffelstärke verabreicht.

Zur Klärung der Fragestellung wurden 18 männliche Kastraten der Rasse DL x Pietrain verwendet, welche in drei homogene Gruppen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt wurden.

Die Kontrollgruppe erhielt in der 19-tägigen Hauptphase eine Ration mit Quellstärke (14,13 MJ ME und 173,5g XP/kg Trockensubstanz) als Hauptenergiequelle, welche eine hohe praecaecale Verdaulichkeit aufweist.

Die Tiere der Behandlungsgruppe RS (resistant starch) erhielten eine Ration mit resistenter Kartoffelrohstärke als Hauptenergiequelle (11,28 MJME und 138,5 g XP/ kg DM) für einen

Zeitraum von 19 Tagen. Kartoffelrohstärke weist eine niedrige praecaecale Verdaulichkeit auf und fördert im Dickdarm die Bildung von Butyrat. Da diese Tiere auch in der Vorphase die Ration mit Quellstärke verabreicht bekamen, wurde der 19-tägigen Hauptphase eine 5-tägige Adaptationsphase vorgeschaltet. In dieser Phase sollte sich die gastrointestinale Flora auf die Ration mit resistenter Stärke einstellen.

Die Tiere der zweiten Behandlungsgruppe (RE für Realimentation) wurden identisch versorgt, jedoch war der Behandlungsphase eine dreitägige Hungerphase vorgeschaltet worden. Um eine ausgeglichene Nährstoffversorgung der Tiere zu gewährleisten, wurde den Behandlungsgruppen aufgrund der geringeren Energiedichte der Ration mit resistenter Stärke entsprechend mehr Futter verabreicht.

Zur Erfassung der Effekte der unterschiedlichen Fütterung, wurden täglich Blut- und Kotproben gesammelt. Die Tiere wurden am Ende des Versuchs eingeschläfert und Gewebsmaterial aus dem Verdauungstrakt für immunocytochemische und histologische Fragestellungen sichergestellt.

Die Verfütterung von resistenter Stärke führte im Vergleich zur Quellstärkeration zu einem Anstieg der Butyratkonzentration im Kot der Tiere um den Faktor 2,2. Um die Auswirkung dieses Butyratanstieges auf das Colonepithel zu erfassen, wurde das Colongewebe histologisch untersucht. Dabei wurde bei den mit resistenter Stärke gefütterten Tieren ein Epithelzuwachs (Zellzahl) von 20 % im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Dieser Epithelzuwachs konnte, da sich die Mitoserate zwischen den Behandlungsgruppen nicht unterschied, eindeutig auf eine um ca. 40% verringerte Apoptoserate zurückgeführt werden. Diese allgemeine Reduzierung der Apoptoserate ging einher mit einer erhöhten Expression von EGF, denn die Werte der positiv gefärbten Mucusfläche der Becherzellen lag bei der RS Gruppe im Durchschnitt ca. 50% über den Werten der Kontrollgruppe. EGF scheint in diesem Zusammenhang an der Regulation der Apoptose im Colon beteiligt zu sein.

Eine Reduzierung der Apoptose um ca. 40% würde bei gleicher Mitoserate einen höheren Epithelzuwachs erwarten lassen. Die Erklärung für den insgesamt geringen Zuwachs ist auf die Verschiebung der Apoptose entlang der Kryptenachse zurückzuführen, denn unter Butyrat einfluß waren etwa 39% der apoptotischen Zellen im basalen Bereich lokalisiert, in der Kontrollgruppe jedoch nur 17%. Diese Erhöhung der Apoptose in der Stammzellregion der Krypten führte zu einer Reduzierung der durchschnittlichen Lebensspanne der Zellen und ist somit für den unter den Erwartungen gebliebenen Epithelzuwachs verantwortlich.

Die Verschiebung der Apoptose wird von den pro- und antiapoptotischen Vertretern der bcl-2 Familie geregelt, denn in den Colonekrypten der Tiere, welche unter verstärktem Butyrat einfluß

standen, wurde parallel zur erhöhten Apoptoserate im basalen Kompartiment in mehr Zellen das proapoptotisch wirkende Protein Bak exprimiert. Der Faktor lag im proximalen Bereich bei 3,5. Gleichsinnig zu dieser Beobachtung wurde im luminalen Bereich der Krypten dieser Gruppen parallel zur verminderten Apoptose eine erhöhte Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-2 (55%) beobachtet. Die Ergebnisse der beiden Behandlungsgruppen RS und RE unterschieden sich nur geringfügig. Die Gründe hierfür dürften in der relativ langen Behandlungsphase von 19 Tagen liegen, denn die Zellen in der Mucosa des Colons unterliegen einer hohen Turnoverrate. Die Effekte des Hungerns vor der Behandlungsphase scheinen somit durch die 19-tägige Fütterung von resistenter Stärke kompensiert worden zu sein. Die Hintergründe über die gesundheitsfördernde Wirkung von Butyrat bzw. über die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen in - vivo und in – vitro Studien konnten anhand der vorliegenden Arbeit nicht komplett geklärt werden, jedoch wurden wertvolle Erkenntnisse über Detailmechanismen der Apoptose in vivo erhalten.

7 Summary

Effects of nutrition on health status were examined in numerous studies for human as well as animal species. The interest is mainly focused on those components which are known to exert a beneficial effect on health. Specifically pre- and probiotic substances are discussed to decrease the use of antibiotics in animal nutrition. Moreover epidemiological studies suggest that a higher fiber content reduces the risk for carcinogenesis. The effects seem to be mediated by short chain fatty acids (SCFA). SCFA are major products of microbial fermentation of fiber in the hindgut and are essential for normal colonic function. Butyrate has been shown to have the most significant effects on colonic epithelium. For example colonic recovery after mucosal atrophy is improved due to butyrate supply.

To examine the principles of the butyrate dependent effects, in numerous studies the effects of butyrate on mitosis, cell differentiation, and apoptosis of epithelial cells were determined. It has been shown that butyrate increases proliferation of normal cells both in vitro and in vivo, but decreases proliferation in neoplastic cells in vitro. In addition the incubation of adenoma and tumour cell lines with butyrate induced apoptosis whereas the absence of butyrate from the incubation medium triggered apoptosis in guinea pig colonic mucosa. This antiapoptotic function of butyrate has been confirmed in the bovine ruminal epithelium. The reasons for these contradicting results and the regulation of butyrate mediated apoptosis have not been examined so far.

In the present study, therefore, the effects of butyrate on colonic epithelium were investigated by feeding resistant potato starch. Effects were verified by determining immunocytochemical parameters.

The experiments were performed with 18 castrated male pigs (German Landrace x Pietrain). They were divided into the control group, the resistant starch group (RS), and the realimentation group (RE). At the end of the feeding period the pigs were killed and tissue samples for immunocytochemical studies were obtained.

The controls were fed during the whole treatment period (19d) with a ration containing pregelatinized starch with a high ileal digestibility (14,13 MJME and 173,5g XP / kg DM).

The RS group received the same diet for 10 days. Thereafter a ration with a lower ileal digestibility containing raw potato starch (11,28 MJME and 138,5g XP/ kg DM) was fed for 5 days in the adaptation period and for 19 d in the treatment period.

The pigs of the RE group were fed identically, however after the control diet a starvation period of 3 days was included.

Due to the lower energy content of resistant starch compared to pregelatinized starch the average energy and protein content differed between the two rations. To ensure an equal energy and protein supply the RS and RE group received a higher amount of the resistant starch ration.

For later analytical determination of pH and SCFA, representative amounts of fresh faeces were collected every morning. They were stored deep frozen (-20°C). At the end of the experimental period pigs were killed and colonic tissue samples were taken for histological and immunocytochemical analysis.

Feeding of resistant starch led to a 2.2-fold increase of butyrate in faeces. The morphological results revealed a significant increase of crypt depth (20%) in the resistant starch groups. This difference, however, can not be explained by a different mitotic rate which was nearly identical in both groups. Thus the morphological difference has to be attributed to the differences in the apoptotic activity which was significantly lower (40%) in the groups fed with resistant starch. This decrease of apoptosis was paralleled by an increase of the mucus area of goblet cells which were shown to contain EGF (epidermal growth factor). The difference was about 50%. The results indicate a link between apoptosis and EGF in the colonic epithelium.

A reduction of apoptosis by 40% and no change of mitotic rate should lead to higher differences in epithelial development. The low increase of crypt depth can be explained by the shift of apoptosis along the crypt axis. In the group with high butyrate levels 39% of the apoptotic cells were located in the basal compartment of the crypts, in the control-group, however, only 17%. This higher incidence of apoptosis in the stem-cell compartment led to an decrease of average lifespan of colonocytes and consequently to the relative low increase of epithelium.

The compartmental distribution of apoptosis is regulated by pro- and antiapoptotic members of the bcl-2 family. Compared to the control group the higher apoptotic rate in the basal compartment of the butyrate group was paralleled by the higher expression (3,5- fold) of the proapoptotic protein Bak. In addition the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 was increased in the luminal compartment by 55%.

The results of the RS and RE group did not differ significantly. Due to the treatment-period of 19 days and the high turnover-rate in the colon the effects of starvation seem to be compensated.

Summary

In conclusion the results demonstrate that under in vivo conditions in the pig butyrate is an inhibitor of apoptosis, but additional mechanisms ensure that the resulting proliferation is limited.

8 Literaturverzeichnis

- Adams J. Cory S. (1998)
The Bcl-2 family of proteins.
Science 281: 1322-6
- Adams J. Cory S. (2001)
Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family.
Trends in Biochemical Sciences. 26(1):61-6
- Aerts JV. De Brabander DL. Cottyn BG. Buysse FX. Moermans RJ. (1974)
Comparison of methods for dry matter determination of high moisture roughages and faeces.
Journal of the Science of Food & Agriculture. 25(6):619-27
- Afanas'ev VN. Korol BA. Mantsygin YuA. Nelipovich PA. Pechatnikov VA. Umansky SR. (1986)
Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death.
FEBS Letters. 194(2):347-50
- Ansari B. and Hall PA. (1992)
The kinetic organisation of tissues.
In: The assessment of cell proliferation in clinical practice. Eds: Hall PA, Levison DA, Wright NA;
Springer Verlag; 45-62
- Antonsson B. and Martinou JC. (2000)
The Bcl-2 Protein Family.
Experimental cell research 256, 50-57
- Arends MJ. Morris RG. Wyllie AH. (1990)
Apoptosis. The role of the endonuclease.
Am J Pathol. 136(3): 593-608
- Bach SP. Renehan AG. Potten CS. (2000)
Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm.
Carcinogenesis. 21(3):469-76, 2000 Mar.
- Baisch H. Gerdes J. (1990)
Identification of proliferating cells by Ki-67 antibody.
Methods in Cell Biology. 33:217-26, 1990
- Barnard JA. Warwick G. (1993)
Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells.
Cell Growth & Differentiation. 4(6):495-501
- Bartram HP. Scheppach W. Schmid H. Hofmann A. Dusel G. Richter F. Richter A. Kasper H. (1993)
Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH.
Cancer Research. 53(14):3283-8
- Berggren AM. Bjorck IME. Nyman EMGL. and Eggum BO. (1993)
Short chain fatty acid content and pH in caecum of rats given various sources of carbohydrates.
J. Sci. Food Agric, 63: 397
- Binder HJ. Mehta P. (1989)
Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon.
Gastroenterology: 96(4):989-96
- Borner C. Olivier R. Martinou I. Mattmann C. Tschopp J. Martinou JC. (1994)
Dissection of functional domains in BCL-2 alpha by site- directed mutagenesis.
Biochem. cell Biol. 72, 463-469

- Bourquin LD. Titgemeyer EC. Fahey GC. (1993)
Vegetable fiber fermentation by human fecal bacteria: cell wall polysaccharide disappearance and short-chain fatty acid production during in vitro fermentation and water-holding capacity of unfermented residues.
Journal of Nutrition. 123(5):860-9
- Brandtzaeg P. Halstensen TS. Kett K. Krajci P. Kvale D. Rognum TO. Scott H. Sollid LM. (1989)
Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes.
Gastroenterology. 97(6):1562-84
- Bucher O. Wartenberg H. (1991)
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
Verlag H. Huber, Bern, Stuttgart, Toronto
- Buendia B. Santa-Maria A. Courvalin JC. (1999)
Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis.
Journal of Cell Science. 112 (Pt 11):1743-53
- Campbell JM. Fahey GC Jr. Wolf BW. (1997)
Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats.
Journal of Nutrition. 127(1):130-6
- Cherrington CA. Hinton M. Pearson GR. Chopra I (1991)
Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation.
Journal of Applied Bacteriology. 70(2):161-5
- Clarke AR. Purdie CA. Harrison DJ. Morris RG. Bird CC. Hooper ML. Wyllie AH. (1993)
Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways.
Nature 362(6423):786-7
- Claus R. & Gimenez T. (1977)
Diurnal rhythm of 5α androst- 16 en- 3- one and testosterone in peripheral plasma of boars.
Acta endocrinol (Copenhagen) 84, 200- 206
- Claus R. Raab S. (1999)
Influences on skatole formation from tryptophan in the pig colon.
Advances in Experimental Medicine & Biology. 467:679-84
- Claus R. Mentschel J. Blazey B. Munz O. (2001)
Preliminary studies on epidermal growth factor (EGF) immunoreactivity in goblet cells of the small intestine by a species- specific antiserum in healthy piglets and piglets with diarrhoea.
Journal of animal and feed sciences 10: 309- 315
- Claus R. Losel D. Lacorn M. Mentschel J. Schenkel H. (2003)
Effects of butyrate on apoptosis in the pig colon and its consequences for skatole formation and tissue accumulation.
Journal of Animal Science. 81(1):239-48
- Cole JW. McKalen A. (1961)
Observations of cell renewal in human rectal mucosa in vivo with thymidine-H3.
Gastroenterology 41: 122-5
- Colucci WS. (1996)
Apoptosis in the heart.
New England Journal of Medicine. 335(16):1224-6

- Columbano A. (1995)
Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo.
J Cell Biochem. 58 181-90
- Cummings JH. Pomare EW. Branch WJ. Naylor CP. Macfarlane GT. (1987)
Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood.
Gut. 28(10):1221-7
- Cummings JH. (1997)
The large intestine in nutrition and diseases.
Danone Chair Monograph, 1- 155 Brussels
- Cummings JH. Macfarlane GT. (1997)
Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism.
Jpen: Journal of Parenteral & Enteral Nutrition. 21(6):357-65
- DeCosse JJ. Miller HH. Lesser ML. (1989)
Effect of wheat fiber and vitamins C and E on rectal polyps in patients with familial adenomatous polyposis.
Journal of the National Cancer Institute. 81(17):1290-7
- Duvall E. Wyllie AH. (1986)
Death and the cell.
Immunology Today. 7: 115-119
- Earnshaw WC. Martins LM. Kaufmann SH. (1999)
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis.
Annual Review of Biochemistry. 68:383-424
- Eastwood GL. (1977)
Gastrointestinal epithelial renewal.
Gastroenterology. 72(5 Pt 1):962-75
- Engelhardt W. (1995)
Absorption of short chain fatty acids from the large intestine.
In: Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids. eds. Cummings JH. Rombeau JL. Sakata T.
Cambridge University 149-170
- Evans-Storms RB. Cidlowski JA. (1995)
Regulation of apoptosis by steroid hormones.
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 53(1-6):1-8
- Faisant N. Planchot V. Kozlowski F. Pacouret MP. Colonna P. Champ M. (1995)
Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch.
Sciences des Aliments 15: 83- 89
- Farrow SN. White JH. Martinou I. Raven T. Pun KT. Grinham CJ. Martinou JC. Brown R. (1995)
Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K.
Nature. 374(6524):731-3
- Farrow SN. and Brown N. (1996)
New members of bcl-2 family and their protein partners.
Curr. Opin.. Gen. Dev. 6, 45-49
- Finlay CA. Hinds PW. and Levine AJ. (1989)
The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation.
Cell 57: 1083-93

- Finnie IA. Dwarakanath AD. Taylor BA. Rhodes JM. (1995)
Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate.
Gut. 36(1):93-9
- Garrett WM. Guthrie HD. (1999)
Expression of bcl-2 and 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase protein during oocyte and follicle development in fetal and post-natal pig ovaries.
Reproduction, Fertility, & Development. 11(7-8):463-70
- Gavrieli Y. Sherman Y. Ben – Sasson SA. (1992)
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DANN fragmentation.
J Cell Biol 119: 493-501
- Gibson PR. Moeller I. Kagelari O. Folino M. Young GP. (1992)
Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro.
Journal of Gastroenterology & Hepatology. 7(2):165-72
- Gibson GR. Roberfroid MB. (1995)
Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.
Journal of Nutrition. 125(6):1401-12
- Gibson GR. & Macfarlane GT. (1995)
Human colonic bacteria: Role in nutrition, physiology and pathology.
Boca Raton, FL: CRC Press
- Goodlad RA. (1981)
Some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep.
Quarterly Journal of Experimental Physiology. 66(4):487-99
- Gordon JI. (1989)
Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice.
Journal of Cell Biology. 108(4):1187-94
- Govers MJ. Gannon NJ. Dunshea FR. Gibson PR. Muir JG. (1999)
Wheat bran affects the site of fermentation of resistant starch and luminal indexes related to colon cancer risk: a study in pigs.
Gut. 45(6):840-7
- Graham H. Aman P. (1982)
The pig as a model in dietary fibre digestion studies.
Scandinavian Journal of Gastroenterology. 22: 55-61
- Gross A. McDonnell JM. Korsmeyer SJ. (1999)
BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis.
Genes & Development. 13(15):1899-911
- Gunin AG. Nikolaev DV. (2000)
Two-month glucocorticoid treatment increases proliferation in the stomach and large intestine of rats.
Digestion. 61(3):151-6
- Haake AR. Polakowska RR.(1993)
Cell death by apoptosis in epidermal biology.
Journal of Investigative Dermatology. 101(2):107-12
- Hague A. Manning AM. Hanlon KA. Huschtscha LI. Hart D. Paraskeva C. (1993)
Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer.
International Journal of Cancer. 55(3):498-505

- Hague A. Diaz GD. Hicks DJ. Krajewski S. Reed JC. Paraskeva C. (1997a)
bcl-2 and bak may play a pivotal role in sodium butyrate-induced apoptosis in colonic epithelial cells;
however overexpression of bcl-2 does not protect against bak-mediated apoptosis.
International Journal of Cancer. 72(5):898-905
- Hague A. Singh B. Paraskeva C. (1997b)
Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro
debate.
Gastroenterology. 112(3):1036-40
- Hague A. Hicks DJ. Bracey TS. Paraskeva C. (1997c)
Cell-cell contact and specific cytokines inhibit apoptosis of colonic epithelial cells: growth factors
protect against c-myc-independent apoptosis.
British Journal of Cancer. 75(7):960-8
- Hall PA. Watt FM. (1989)
Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity.
Development 106: 619-633
- Hall PA. Coates PJ. Ansari B. Hopwood D. (1994)
Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis.
Journal of Cell Science. 107 (Pt 12):3569-77
- Hass R. Busche R. Luciano L. Reale E. Engelhardt WV. (1997)
Lack of butyrate is associated with induction of Bax and subsequent apoptosis in the proximal colon of
guinea pig.
Gastroenterology. 112(3):875-81
- Helmrath MA. Shin CE. Erwin CR. Warner BW. (1998)
The EGF EGF-receptor axis modulates enterocyte apoptosis during intestinal adaptation.
Journal of Surgical Research. 77(1):17-22
- Hengartner MO. (2000)
The biochemistry of apoptosis.
Nature. 407(6805):770-6
- HSU YT. Wolter KG. Youle RJ. (1997)
Cytosol- to- membrane redistribution of Bax and Bcl-X-L during apoptosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3668-3672
- Hsu YT. Youle RJ. (1997)
Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family.
J Biol Chem. 272(21):13829-34.
- Ijiri K. Potten CS. (1987)
Further studies on the response of intestinal crypt cells of different hierarchical status to eighteen
different cytotoxic agents.
British Journal of Cancer. 55(2):113-23
- Jacobasch G. Schmiedl D. Kruschewski M. Schmehl K. (1999)
Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases.
International Journal of Colorectal Disease. 14(4-5):201-11
- Jass JR. (1985)
Diet, butyric acid and differentiation of gastrointestinal tract tumours.
Medical Hypotheses. 18(2):113-8
- Jurgensmeier JM. Xie Z. Deveraux Q. Ellerby L. Bredesen D. Reed JC. (1998)
Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(9):4997-5002

- Kagnoff MF. (1987)
Immunology of the digestive system.
In: Physiology of the gastrointestinal tract, 1699-1728
New York: Raven Press
- Kelekar A. Thompson CB. (1998)
Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis.
Trends in Cell Biology. 8(8):324-30
- Kerr JF. Wyllie AH. Currie AR. (1972)
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
British Journal of Cancer. 26(4):239-57
- Kerr JF. (1993)
Definition of apoptosis and overview of its incidence.
In: The Cellular and Molecular Biology of Apoptosis, Martin Lavin and Dianne Watters (eds.) harwood academic publishers, Camberwell, Paris, Berlin, Reading, Shinjuku-ku, Amsterdam, Langhorne, 1-15
- Kiess W. Gallaher B. (1998)
Hormonal control of programmed cell death/apoptosis.
European Journal of Endocrinology. 138(5):482-91
- Kim YS. Tsao D. Siddiqui B. Whitehead JS. Arnstein P. Bennett J. Hicks J. (1980)
Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells.
Cancer. 45(5 Suppl):1185-92
- Kirchgessner M. (1997)
Tierernährung
Verlags Union Agrar, DLG Verlag Frankfurt, 10. neubearbeitete Auflage
- Kluck RM. Bossy-Wetzel E. Green DR. Newmeyer DD. (1997)
The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science. 275(5303):1132-6
- Knudsen KE. Jensen BB. Hansen I. (1993)
Oat bran but not a beta-glucan-enriched oat fraction enhances butyrate production in the large intestine of pigs.
Journal of Nutrition. 123(7):1235-47
- Knudson CM. Korsmeyer SJ. (1997)
Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death.
Nat Genet. 16(4):358-63
- Koch T. Berg R. (1990)
Lehrbuch der Veterinär- Anatomie.
Gustav Fischer Verlag, Jena, 4. Auflage
- Konishi H. Steinbach G. Hittelman WN. Fujita K. Lee JJ. Gliber GA. Levin B. Andreeff M. Goodacre AM. Terry NH. (1996)
Cell kinetic analysis of intact rat colonic crypts by confocal microscopy and immunofluorescence.
Gastroenterology. 111(6):1493-500
- Kothakota S. Azuma T. Reinhard C. Klippel A. Tang J. Chu K. McGarry TJ. Kirschner MW. Kohts K. Kwiatkowski DJ. Williams LT. (1997)
Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis.
Science. 278(5336):294-8
- Krammer PH. (2000)
CD95's deadly mission in the immune system.
Nature. 407(6805):789-95

- Kripke SA. Fox AD. Berman JM. Settle RG. Rombeau JL. (1989)
Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short chain fatty acids.
Journal of Parenteral and Enteral Nutrition . 13: 109-116
- Kuerbitz SJ. Plunkett BS. Walsh WV. Kastan MB. (1992)
Wild type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89(16): 7491-5
- Lajtha LG. (1979a)
Stem cell concepts.
Differentiation 14: 23-34
- Lajtha LG. (1979b)
Haemopoietic stem cells: Concepts and definitions.
Blood cells 5: 447-455
- Lane DP. (1992)
Cancer. p53, guardian of the genome.
Nature 358(6381): 15-6
- Lane DP. Crawford LV. (1979)
T antigen is bound to the host protein in SV40- transformed cells.
Nature 278 (5701): 261-3
- Langkamp-Henken B. Glezer JA. Kudsk KA. (1992)
Immunologic structure and function of the gastrointestinal tract.
Nutrition in Clinical Practice. 7(3):100-8
- Le Blay G. Michel C. Blottiere HM. Cherbut C. (1999)
Enhancement of butyrate production in the rat caecocolonic tract by long-term ingestion of resistant potato starch.
British Journal of Nutrition. 82(5):419-26
- Lewin D. Weinstein WM. (1996)
Cell death--where is thy sting?
Gut. 39(96):883-4
- Li P. Allen H. Banerjee S. Franklin S. Johnston C. McDowell J. Paskind M. Rodman L. Salfeld J. (1995)
Mice deficient in IL- 1 beta- converting enzyme are defective in production of mature IL- 1 beta and resistant to endotoxic shock.
Cell 80: 401-411
- Liebich HG. (1998)
Der Verdauungsapparat.
In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere; 3. Auflage; Schattauer; Stuttgart, New York
- Lifshitz S. Schwartz B. Polak-Charcon S. Benharroch D. Prinsloo I. Lamprecht SA. (1998)
Extensive apoptotic death of rat colonic cells deprived of crypt habitat.
Journal of Cellular Physiology. 177(3):377-86
- Lifshitz S. Lamprecht SA. Benharroch D. Prinsloo I. Polak-Charcon S. Schwartz B. (2001)
Apoptosis (programmed cell death) in colonic cells: from normal to transformed stage.
Cancer Letters. 163(2):229-38
- Lipkin M. Sherlock P. Bell B. (1963)
Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man.
Gastroenterology 45: 405-17
- Liu X. Kim CN. Yang J. Jemmerson R. Wang X. (1996)
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.
Cell. 86(1):147-57

- Liu X. Zou H. Slaughter C. Wang X. (1997)
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.
Cell. 89(2):175-84
- Loeffler M. Birke A. Winton D. Potten C. (1993)
Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt.
Journal of Theoretical Biology. 160(4):471-91
- Löffler K. (1991)
Anatomie und Physiologie der Haustiere. 8. Auflage
UTB Ulmer Stuttgart
- Lowe SW. Schmitt EM. Smith SW. Osborne BA. Jacks T. (1993)
p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes.
Nature 362(6423): 847-9
- Macfarlane GT. Macfarlane S. (1995)
Proteolysis and amino acid fermentation.
Role in nutrition, physiology, and pathology. 75- 100, London, CRC Press
- Martin LJM. Dumon HJW. Champ MMJ. (1998)
Production of short chain fatty acids from resistant starch in a pig model.
J. Sci. Food. Agric. 77: 71- 80
- Mandal M. Wu X. Kumar R. (1997)
Bcl-2 deregulation leads to inhibition of sodium butyrate-induced apoptosis in human colorectal carcinoma cells.
Carcinogenesis. 18(1):229-32
- Mandal M. Olson DJ. Sharma T. Vadlamudi RK. Kumar R. (2001)
Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-Jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells.
Gastroenterology. 120(1):71-8
- Martin LJM. Dumon HJM. Champ MMJ. (1998)
Production of short chain fatty acids from resistant starch in a pig model.
J Sci Food Agric 77: 71-80
- Mathers JC. (1998)
Nutrient regulation of intestinal proliferation and apoptosis.
Proceedings of the Nutrition Society. 57(2):219-23
- Mathews MB. Bernstein RM. Franza BR Jr. Garrels JI. (1984)
Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin.
Nature. 309(5966):374-6
- McIntyre A. Gibson PR. Young GP. (1993)
Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model.
Gut. 34(3):386-91
- Mentschel J. Leiser R. Muelling C. Pfarrer C. Claus R. (2002)
Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis.
Arch Animal Nutrition; 55(2):85-102.
- Migliorati G. Nicoletti I. Nocentini G. Pagliacci MC. Riccardi C. (1994)
Dexamethasone and interleukins modulate apoptosis of murine thymocytes and peripheral T-lymphocytes.
Pharmacological Research. 30(1):43-52

- Miller ER. Ullrey DE. (1987)
The pig as a model for human nutrition.
Annual Review of Nutrition. 7:361-82, 1987
- Morales MD. Escarpa A. Gonzales MC. De Henares A. (1997)
Simultaneous determination of resistant and digestible starch in foods and food products.
Starch 49: 448- 453
- Moss SF. Agarwal B. Arber N. Guan RJ. Krajewska M. Krajewski S. Reed JC. Holt PR. (1996a)
Increased intestinal Bak expression results in apoptosis.
Biochemical & Biophysical Research Communications. 223(1):199-203
- Moss SF. Scholes JV. Holt PR. (1996b)
Abnormalities of epithelial apoptosis in multistep colorectal neoplasia demonstrated by terminal deoxyuridine nick end labeling.
Digestive Diseases & Sciences. 41(11):2238-47
- Nagata S. (2000)
Apoptotic DNA fragmentation.
Experimental Cell Research. 256(1):12-8
- Nijweide PJ. Burger EH. Feyen JH. (1986)
Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation.
Physiological Reviews. 66(4): 855-86
- Oberhammer F. Wilson JW. Dive C. Morris ID. Hickman JA. Wakeling AE. Walker PR. Sikorska M. (1993)
Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation.
EMBO J 12, 3679
- O'Brien DP. Williams JL. Erwin CR. Warner BW. (2001)
Epidermal growth factor receptor signaling induces the expression of bcl-2 family members bax and bcl-w.
Surgical Forum. 52: 11-12
- Pedersen PL. (1999)
Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview.
J Bioenerg Biomembr; 31(4):291-304
- Pellicer EM. Sundblad A. (1994)
Antigen retrieval by microwave oven with buffer of citric acid.
Medicina. 54(2):129-32
- Penman ID. Liang QL. Bode J. Eastwood MA. Arends MJ. (2000)
Dietary calcium supplementation increases apoptosis in the distal murine colonic epithelium.
Journal of Clinical Pathology. 53(4):302-7
- Pereira MA. (1999)
Prevention of colon cancer and modulation of aberrant crypt foci, cell proliferation, and apoptosis by retinoids and NSAIDs.
Advances in Experimental Medicine & Biology. 470:55-63
- Phillips J. Muir JG. Birkett A. Lu ZX. Jones GP. O'Dea K. Young GP. (1995)
Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans.
American Journal of Clinical Nutrition. 62(1):121-30
- Potten CS. Allen TD. (1977)
Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa.
Journal of Ultrastructure Research. 60(2):272-7

- Potten CS. Loeffler M. (1990)
Stem cells: attributes, cycles, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the crypt.
Development 110: 1001-1020
- Potten CS. (1992)
The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice.
Cancer & Metastasis Reviews. 11(2):179-95
- Potten CS. Li YQ. O'Connor PJ. Winton DJ. (1992)
A possible explanation for the differential cancer incidence in the intestine, based on distribution of the cytotoxic effects of carcinogens in the murine large bowel.
Carcinogenesis. 13(12):2305-12
- Potten CS. Merritt A. Hickman J. Hall P. Faranda A. (1994)
Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications.
International Journal of Radiation Biology. 65(1):71-8
- Prohaszka L. Jayarao BM. Fabian A. Kovacs S. (1990)
The role of intestinal volatile fatty acids in the Salmonella shedding of pigs.
Zentralblatt Fuer Veterinaermedizin Reihe B. 37(8):570-4
- Que FG, Gores GJ. (1996)
Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist.
Gastroenterology;110(4):1238-43
- Que FG. Gores GJ. (1997)
Apoptosis and the gastrointestinal system.
Adv Pharmacol; 41:409-28.
- Raab S. (1998)
Einfluß nutritiver Faktoren auf die endokrine und parakrine Steuerung von Proliferation, Funktion und Apoptose im Darm von Schweinen.
Dissertation Uni. Hohenheim
- Ravagnan L. Roumier T. Kroemer G. (2002)
Mitochondria, the killer organelles and their weapons.
Journal of Cellular Physiology. 192(2):131-7
- Reed JC. (1997)
Double identity for proteins of the Bcl-2 family.
Nature. 387(6635):773-6
- Resnicoff M. Abraham D. Yutanawiboonchai W. Rotman HL. Kajstura J. Rubin R. Zoltick P. Baserga R. (1995)
The insulin-like growth factor I receptor protects tumor cells from apoptosis in vivo.
Cancer Research. 55(11):2463-9
- Ro S. Rannala B. (2001)
Methylation patterns and mathematical models reveal dynamics of stem cell turnover in the human colon.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98(19):10519-21
- Roberfroid M. Gibson GR. Delzenne N. (1993)
The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value.
Nutrition Reviews. 51(5):137-46
- Rodriguez J. Lazebnik Y. (1999)
Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme.
Genes & Development. 13(24):3179-84
- Roediger WEW. (1980)
Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man.
Gut. 21: 793- 798

- Roediger WEW. (1995)
The place of short chain fatty acids in colonocyte metabolism in health and ulcerative colitis.
In: Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids, edited by Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, Cambridge Univ. Press 337pp
- Rogel A. Popliker M. Webb CG. Oren M. (1985)
p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors.
Molecular & Cellular Biology 5(10): 2851-5
- Roland N. Nugon-Baudon L. Andrieux C. Szyliet O. (1995)
Comparative study of the fermentative characteristics of inulin and different types of fibre in rats inoculated with a human whole faecal flora.
British Journal of Nutrition. 74(2):239-49
- Romeis (1989)
Mikroskopische Technik
Hrsg. P.Böck
Urban & Schwarzenberg: München, Wien, Baltimore; Neubearb. Auflage
- Ruckebusch Y. Phaneuf LP. Dunlop R. (1991)
The Digestive System, 191-289
In: Physiology of small and large animals
BC. Decker, Hamilton- Philadelphia
- Sakahira H. Enari M. Nagata S. (1998)
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.
Nature. 391(6662):96-9
- Sakata T. Tamate H. (1979)
Rumen epithelium cell proliferation accelerated by propionate and acetate.
Journal of Dairy Science. 62(1):49-52
- Sakata T. Yajima T. (1984)
Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract.
Quarterly Journal of Experimental Physiology. 69(3):639-48
- Sakata T. (1987)
Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors.
British Journal of Nutrition. 58(1):95-103
- Sato T. Hanada M. Bodrug S. Irie S. Iwama N. Boise LH. Thompson CB. Golemis E. Fong L. Wang HG. (1994)
Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91(20):9238-42
- Sattler M. Liang H. Nettesheim D. Meadows RP. Harlan JE. Eberstadt M. Yoon HS. Shuker SB. Chang BS. Minn AJ. Thompson CB. Fesik SW. (1997)
Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis.
Science. 275(5302):983-6
- Saura- Calixto F. Goni I. Bravo L. Manas E. (1993)
Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues.
J. Food Sci. 58 (3): 642-43
- Scaffidi C. Fulda S. Srinivasan A. Friesen C. Li F. Tomaselli KJ. Debatin KM. Krammer PH. Peter ME. (1998)
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.
EMBO Journal. 17(6):1675-87
- Scheppach W. Bartram P. Richter A. Richter F. Liepold H. Dusel G. Hofstetter G. Ruthlein J. Kasper H. (1992)
Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro.
Journal of Parenteral & Enteral Nutrition. 16(1):43-8

- Scheppach W. (1994)
Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function.
Gut. 35(1 Suppl):S35-8
- Schnabel E. Beck M. Bolduan G. (1990)
Extent and effect of fermentation in the large intestine of swine. 2. Extent of fermentation, pattern of volatile fatty acids and in vitro formation rate.
Arch. Tierernährung. (11-12): 1037-45
- Shayan P. Gerlach C. Hugel FU. Kay G. Campell JD. Gerdes J. Ahmed JS. (1999)
The proliferation- associated nuclear protein Ki-67 in the bovine system.
Parasitology Research. 85 (8-9): 613-20
- Simon O. (1995)
Verdauung durch körpereigene Enzyme.
In: Nutztierernährung; Abel HJ, Flachowsky G, Jeroch H, Molnar S (eds.)
Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 206-217
- Simonian PL. Grillot DA. Nunez G. (1997)
Bak can accelerate chemotherapy-induced cell death independently of its heterodimerization with Bcl-XL and Bcl-2.
Oncogene. 15(15):1871-5
- Sirotkin AV. Makarevich AV. (2002)
Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system.
Animal Reproduction Science. 70(1-2):111-26
- Smith JG. Yokoyama WH. German JB. (1998)
Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression.
Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 38(4):259-97
- St Clair EG. Anderson SJ. Oltvai ZN. (1997)
Bcl-2 counters apoptosis by Bax heterodimerization-dependent and -independent mechanisms in the T-cell lineage.
Journal of Biological Chemistry. 272(46):29347-55
- Steel GG. (1977)
Growth kinetics of tumours.
Clarendon Press Oxford: 351pp
- Stennicke HR. Deveraux QL. Humke EW. Reed JC. Dixit VM. Salvesen GS. (1999)
Caspase-9 can be activated without proteolytic processing.
Journal of Biological Chemistry. 274(13):8359-62
- Strater J. Koretz K. Gunthert AR. Moller P. (1995)
In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis.
Gut. 37(6):819-25
- Susin SA. Zamzami N. Castedo M. Hirsch T. Marchetti P. Macho A. Daugas E. Geuskens M. Kroemer G. (1996)
Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease.
Journal of Experimental Medicine. 184(4):1331-41
- Susin SA. Lorenzo HK. Zamzami N. Marzo I. Snow BE. Brothers GM. Mangion J. Jacotot E. Costantini P. Loeffler M. Larochette N. Goodlett DR. Aebersold R. Siderovski DP. Penninger JM. Kroemer G. (1999)
Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.
Nature. 397(6718):441-6

- Tamate H. McGilliard AD. Jacobson NL. Getty R. (1962)
Effects of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf.
Journal of Dairy Science 45, 408- 420
- Tangerman A. Nagengast FM. (1996)
A gas chromatographic analysis of fecal short chain fatty acids, using the direct injection method.
Anal. Biochem. 236: 1-8
- Thompson CB. (1995)
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 10;267(5203): 1456-62
- Thornberry NA. Lazebnik Y.(1998)
Caspases: enemies within.
Science. 281(5381):1312-6
- Thompson JS. (1998)
Somatostatin analogue predisposes enterocytes to apoptosis.
Journal of Gastrointestinal Surgery. 2(2):167-73
- Topping DL. Illman RJ. Clarke JM. Trimble RP. Jackson KA. Marsono Y. (1993)
Dietary fat and fiber alter large bowel and portal venous volatile fatty acids and plasma cholesterol but not biliary steroids in pigs.
Journal of Nutrition. 123(1):133-43
- Topping DL. Clifton PM. (2001)
Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides.
Physiological Reviews. 81(3):1031-64
- Vaux DL. Cory S. Adams JM. (1988)
Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.
Nature. 335(6189):440-2
- Velazquez OC. Lederer HM. Rombeau JL. (1996)
Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia.
Digestive Diseases & Sciences. 41(4):727-39
- Wakiyama H. Cowan DB. Toyoda Y. Federman M. Levitsky S. McCully JD. (2002)
Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis.
European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 21(3):424-33
- Walker RP. Weaver VM. Lach B. Leblanc J. Sikorska M. (1994)
Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis.
EXP Cell Res. 213(1): 100-6
- Wang GQ. Gastman BR. Wieckowski E. Goldstein LA. Gambotto A. Kim TH. Fang B. Rabinovitz A. Yin XM. Rabinowich H. (2001)
A role for mitochondrial Bak in apoptotic response to anticancer drugs.
Journal of Biological Chemistry. 276(36):34307-17
- Wang S. Miura M. Jung YK. Zhu H. Li E. Yuan J. (1998)
Murine caspase 11, an ICE- interacting protease, is essential for the activation of ICE.
Cell 92: 501-509
- Wei MC. Lindsten T. Mootha VK. Weiler S. Gross A. Ashiya M. Thompson CB. Korsmeyer SJ. (2000)
tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c.
Genes & Development. 14(16):2060-71

- Wimalasena J. Meehan D. Cavallo C. (1991)
Human epithelial ovarian cancer cell steroid secretion and its control by gonadotropins.
Gynaecologic Oncology. 41(1):56-63
- Wolf BB. Green DR. (1999)
Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.
Journal of Biological Chemistry. 274(29):20049-52
- Wolter KG. Hsu YT. Smith CL. Nechushtan A. Xi XG. Youle RJ.(1997)
Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis.
Journal of Cell Biology. 139(5):1281-92
- Wright NA. Alison MR. (1984)
The biology of epithelial cell populations.
Vol.1 Clarendon from Oxford pp.536
- Wyllie AH. Kerr JF. Currie AR. (1980)
Cell death: the significance of apoptosis.
International Review of Cytology. 68:251-306
- Xia Z. Dickens M. Raingeaud J. Davis RJ. Greenberg ME. (1995)
Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis.
Science. 270(5240):1326-31
- Yanahira S. Morita M. Aoe S. Suguri T. Takada Y. Miura S. Nakajima I. (1997)
Effects of lactitol-oligosaccharides on calcium and magnesium absorption in rats.
Journal of Nutritional Science & Vitaminology. 43(1):123-32
- Yang E. Korsmeyer SJ. (1996)
Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death.
Blood. 88(2):386-401, 1996 Jul
- Yang J. Liu X. Bhalla K. Kim CN. Ibrado AM. Cai J. Peng TI. Jones DP. Wang X. (1997)
Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.
Science. 275(5303):1129-32
- Yin XM. Olivai ZN. Korsmeyer SJ. (1994)
BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax.
Nature 369, 321-323
- Younes H. Deminge C. Behr S. Remesy C. (1995)
Resistant starch exerts a lowering effect on plasma urea by enhancing urea N transfer into the large intestine.
Nutrition Research 15 (8): 1199-1210
- Young GP. Gibson PR. (1991)
Contrasting effects of butyrate on proliferation and differentiation of normal and neoplastic cells.
In: Short Chain Fatty Acids: Metabolism and Clinical Importance, ed. JL Rombeau, J.H. Cummings & T Sakata 50-5. Columbus, OH: Ross Laboratories
- Young GP. Gibson PR. (1995)
Butyrate and the human cancer cell.
Physiol. Clin. Aspects Short-Chain Fatty Acids 319-35
- Yuan J. Shaham S. Ledoux S. Ellis HM. Horvitz HR. (1993)
The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme.
Cell 75: 641-652

- Zamzami N. Susin SA. Marchetti P. Hirsch T. Gomez-Monterrey I. Castedo M. Kroemer G. (1996)
Mitochondrial control of nuclear apoptosis.
Journal of Experimental Medicine. 183(4):1533-44
- Zeifang A. (2000)
Einfluss des Splitweaning auf die pulsatile LH- Freisetzung und das Wiederingangkommen des Zyklus nach dem Absetzen bei der Sau.
Diss. med. vet. Uni. München
- Zha H. Reed JC. (1997)
Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells.
Journal of Biological Chemistry. 272(50):31482-8
- Zörnig M. Hueber A. Baum W. Evan G. (2001)
Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.
Biochimica et Biophysica Acta. 1551(2): F1-37

9 Anhang

Kryptentiefe in Anzahl der Zellen (Mittelwerte \pm SEM)

colon proximal				colon distal			
K	RS	RE	Sig.	K	RS	RE	Sig.
65,79 \pm 2,0	78,1 \pm 1,3		***	69,8 \pm 2,1	81,1 \pm 2,2		**
	78,1 \pm 1,3	83,9 \pm 2,0	*		81,1 \pm 2,2	79,5 \pm 2,1	ns
65,79 \pm 2,0		83,9 \pm 2,0	***	69,8 \pm 2,1		79,5 \pm 2,1	**

Mitotische Zellen (% \pm SEM), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
15,4 \pm 0,9	15,7 \pm 0,9	ns	16,5 \pm 1,1	17,8 \pm 1,2	ns
15,4 \pm 0,9			16,5 \pm 1,1		ns
	15,7 \pm 0,9			17,8 \pm 1,2	ns

Mitotische Zellen (% \pm SEM), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
15,7 \pm 0,9	21,7 \pm 0,8	***	17,8 \pm 1,2	18,3 \pm 0,6	ns
15,7 \pm 0,9			17,8 \pm 1,2		ns
	21,7 \pm 0,8			18,3 \pm 0,6	**

Apoptotische Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
0,9 \pm 0,08	0,55 \pm 0,06	**	1,1 \pm 0,15	0,53 \pm 0,09	*
0,9 \pm 0,08			1,1 \pm 0,15		ns
	0,55 \pm 0,06			0,53 \pm 0,09	ns

Apoptotische Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
0,55 \pm 0,06	0,45 \pm 0,07	ns	0,53 \pm 0,09	0,44 \pm 0,04	ns
0,55 \pm 0,06			0,53 \pm 0,09		ns
	0,45 \pm 0,07			0,44 \pm 0,04	ns

Bak positive Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
1,7 \pm 0,2	5,3 \pm 0,8	***	3,7 \pm 0,6	5,1 \pm 0,8	ns
1,7 \pm 0,2			3,7 \pm 0,6		**
	5,3 \pm 0,8			5,1 \pm 0,8	ns

Bak positive Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
5,3 \pm 0,8	3,5 \pm 0,6	ns	5,11 \pm 0,8	5,4 \pm 0,9	ns
5,3 \pm 0,8			5,11 \pm 0,8		ns
	3,5 \pm 0,6			5,4 \pm 0,9	ns

Bcl-2 positive Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
3,4 \pm 0,3	6,0 \pm 0,4	***	2,8 \pm 0,3	5,6 \pm 0,5	**
3,4 \pm 0,3			2,8 \pm 0,3		**
	6,0 \pm 0,4			5,6 \pm 0,5	ns

Bcl-2 positive Zellen pro Hemikrypte (Mittelwerte \pm SEM), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
6,0 \pm 0,4	6,3 \pm 0,3	ns	5,6 \pm 0,5	5,4 \pm 0,2	ns
6,0 \pm 0,4			5,6 \pm 0,5		ns
	6,3 \pm 0,3			5,4 \pm 0,2	ns

EGF positive Zellen (% \pm SEM), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
33,8 \pm 1,2	37,6 \pm 1,8	ns	33,8 \pm 1,2	39,8 \pm 2,8	*
33,8 \pm 1,2			33,8 \pm 1,2		ns
	37,6 \pm 1,8			39,8 \pm 2,8	ns

EGF positive Zellen (% \pm SEM), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
37,6 \pm 1,8	36,8 \pm 1,0	ns	39,8 \pm 2,8	42,1 \pm 1,3	ns
37,6 \pm 1,8			39,8 \pm 2,8		ns
	36,8 \pm 1,0			42,1 \pm 1,3	***

EGF positiv gefärbte Mucusfläche der Gobletzellen ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$), Vergleich K, RS

colon proximal			colon distal		
K	RS	Sig.	K	RS	Sig.
12 \pm 1	23 \pm 2	***	12 \pm 1	20 \pm 2	**
12 \pm 1			12 \pm 1		ns
	23 \pm 2			20 \pm 2	ns

EGF positive gefärbte Mucusfläche der Gobletzellen ($\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$), Vergleich RS, RE

colon proximal			colon distal		
RS	RE	Sig.	RS	RE	Sig.
23 \pm 1,9	19,9 \pm 1,9	ns	20 \pm 2	19 \pm 1,8	ns
23 \pm 1,9			20 \pm 2		ns
	19,9 \pm 1,9			19 \pm 1,8	ns

Anteil KI-67 positiver Zellen ($\% \pm \text{SEM}$) in den Kompartimenten, colon proximal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
80,9 \pm 1,7	16,11 \pm 1,5		***	51,2 \pm 2,6	40,2 \pm 2,0		*
	16,11 \pm 1,5	2,9 \pm 0,6	***		40,2 \pm 2,0	8,5 \pm 1,5	***
80,9 \pm 1,7		2,9 \pm 0,6	***	51,2 \pm 2,6		8,5 \pm 1,5	***

Anteil KI-67 positiver Zellen ($\% \pm \text{SEM}$) in den Kompartimenten, colon distal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
76,8 \pm 2,5	18,4 \pm 2,2		***	48,9 \pm 1,7	41,2 \pm 1,3		*
	18,4 \pm 2,2	4,7 \pm 1,0	***		41,2 \pm 1,3	9,7 \pm 1,2	***
76,8 \pm 2,5		4,7 \pm 1,0	***	48,9 \pm 1,7		9,7 \pm 1,2	***

Anteil KI-67 positiver Zellen ($\% \pm \text{SEM}$) in den Kompartimenten, colon proximal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
51,2 \pm 2,6	40,1 \pm 2,0		*	48,0 \pm 1,9	40,1 \pm 1,1		*
	40,1 \pm 2,0	8,5 \pm 1,5	***		40,1 \pm 1,1	11,6 \pm 1,6	***
51,2 \pm 2,6		8,5 \pm 1,5	***	48,0 \pm 1,9		11,6 \pm 1,6	***

Anteil KI-67 positiver Zellen (% \pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
48,9 \pm 1,7	41,2 \pm 1,3		*	56,4 \pm 2,1	35,2 \pm 1,3		***
	41,2 \pm 1,3	9,7 \pm 1,3	***		35,2 \pm 1,3	8,2 \pm 1,2	***
48,9 \pm 1,7		9,7 \pm 1,3	***	56,4 \pm 2,1		8,2 \pm 1,2	***

Anzahl TUNEL positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
0,16 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01		ns	0,21 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02		*
	0,17 \pm 0,01	0,54 \pm 0,04	***		0,09 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	**
0,16 \pm 0,02		0,54 \pm 0,04	***	0,21 \pm 0,03		0,24 \pm 0,02	ns

Anzahl TUNEL positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
0,39 \pm 0,05	0,15 \pm 0,02		***	0,23 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01		*
	0,15 \pm 0,02	0,57 \pm 0,04	***		0,10 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	*
0,39 \pm 0,05		0,57 \pm 0,04	*	0,23 \pm 0,04		0,19 \pm 0,01	ns

Anzahl TUNEL positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
0,21 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02		*	0,23 \pm 0,03	0,07 \pm 0,02		***
	0,09 \pm 0,02	0,24 \pm 0,02	**		0,07 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	ns
0,21 \pm 0,03		0,24 \pm 0,02	ns	0,23 \pm 0,03		0,15 \pm 0,02	ns

Anzahl TUNEL positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
0,23 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02		*	0,17 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01		ns
	0,10 \pm 0,02	0,19 \pm 0,03	*		0,11 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	ns
0,23 \pm 0,03		0,19 \pm 0,03	ns	0,17 \pm 0,02		0,14 \pm 0,02	ns

Anzahl Bak positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
$0,57 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,04$		**	$2,00 \pm 0,23$	$0,41 \pm 0,16$		***
	$0,22 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,13$	***		$0,41 \pm 0,16$	$2,83 \pm 0,52$	***
$0,57 \pm 0,09$		$0,90 \pm 0,13$	*	$2,00 \pm 0,23$		$2,83 \pm 0,52$	ns

Anzahl Bak positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
$1,14 \pm 0,21$	$0,61 \pm 0,15$		*	$2,17 \pm 0,37$	$0,69 \pm 0,19$		***
	$0,61 \pm 0,15$	$1,90 \pm 0,39$	**		$0,69 \pm 0,19$	$2,24 \pm 0,30$	***
$1,14 \pm 0,21$		$1,90 \pm 0,39$	ns	$2,17 \pm 0,37$		$2,24 \pm 0,30$	ns

Anzahl Bak positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
$2,00 \pm 0,23$	$0,41 \pm 0,16$		***	$1,00 \pm 0,16$	$0,33 \pm 0,10$		**
	$0,41 \pm 0,16$	$2,87 \pm 0,52$	***		$0,33 \pm 0,10$	$2,18 \pm 0,45$	***
$2,00 \pm 0,23$		$2,87 \pm 0,52$	ns	$1,00 \pm 0,16$		$2,18 \pm 0,45$	**

Anzahl Bak positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
$2,17 \pm 0,37$	$0,69 \pm 0,19$		***	$2,43 \pm 0,40$	$0,55 \pm 0,13$		***
	$0,69 \pm 0,19$	$2,24 \pm 0,30$	***		$0,55 \pm 0,13$	$2,41 \pm 0,43$	***
$2,17 \pm 0,37$		$2,24 \pm 0,30$	ns	$2,43 \pm 0,40$		$2,41 \pm 0,43$	ns

Anzahl Bcl-2 positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
$1,32 \pm 0,19$	$0,82 \pm 0,09$		*	$2,33 \pm 0,23$	$1,10 \pm 0,12$		***
	$0,82 \pm 0,09$	$1,20 \pm 0,13$	**		$1,10 \pm 0,12$	$2,63 \pm 0,25$	***
$1,32 \pm 0,19$		$1,20 \pm 0,13$	ns	$2,33 \pm 0,23$		$2,63 \pm 0,25$	ns

Anzahl Bcl-2 positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
1,49 \pm 0,23	0,50 \pm 0,08		**	1,98 \pm 0,23	0,90 \pm 0,17		***
	0,50 \pm 0,08	0,82 \pm 0,12	*		0,90 \pm 0,17	2,72 \pm 0,33	***
1,49 \pm 0,23		0,82 \pm 0,12	**	1,98 \pm 0,23		2,72 \pm 0,33	ns

Anzahl Bcl-2 positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
2,33 \pm 0,28	1,10 \pm 0,12		**	2,17 \pm 0,15	0,96 \pm 0,09		***
	1,10 \pm 0,12	2,63 \pm 0,25	***		0,96 \pm 0,09	3,14 \pm 0,28	***
2,33 \pm 0,28		2,63 \pm 0,25	ns	2,17 \pm 0,15		3,14 \pm 0,28	*

Anzahl Bcl-2 positiver Zellen (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
1,98 \pm 0,23	0,90 \pm 0,17		***	2,22 \pm 0,06	0,84 \pm 0,10		***
	0,90 \pm 0,17	2,72 \pm 0,33	***		0,84 \pm 0,10	2,37 \pm 0,19	***
1,98 \pm 0,23		2,72 \pm 0,33	ns	2,22 \pm 0,06		2,37 \pm 0,19	ns

Fläche EGF gefärbter Mucusblasen in μm^2 (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
13,22 \pm 1,32	11,63 \pm 1,38		ns	20,71 \pm 2,34	25,51 \pm 2,55		ns
	11,63 \pm 1,38	13,18 \pm 1,47	*		25,51 \pm 2,55	26,60 \pm 2,56	ns
13,22 \pm 1,32		13,18 \pm 1,47	ns	20,71 \pm 2,34		26,60 \pm 2,56	ns

Fläche EGF gefärbter Mucusblasen in μm^2 (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, Kontrolle und RS

Kontrolle				RS			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
12,14 \pm 1,24	12,89 \pm 1,49		ns	14,84 \pm 2,09	21,63 \pm 2,51		**
	12,89 \pm 1,49	12,33 \pm 1,86	ns		21,63 \pm 2,51	27,77 \pm 2,10	*
12,14 \pm 1,24		12,33 \pm 1,86	ns	14,84 \pm 2,09		27,77 \pm 2,10	***

Fläche EGF gefärbter Mucusblasen in μm^2 (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon proximal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
20,71 \pm 2,34	25,51 \pm 2,55		ns	16,99 \pm 1,85	21,57 \pm 3,00		ns
	25,51 \pm 2,55	26,63 \pm 2,56	ns		21,57 \pm 3,00	23,53 \pm 3,05	ns
20,71 \pm 2,34		26,63 \pm 2,56	ns	16,99 \pm 1,85		23,53 \pm 3,05	ns

Fläche EGF gefärbter Mucusblasen in μm^2 (\pm SEM) in den Kompartimenten, colon distal, RS und RE

RS				RE			
Basis	Mitte	Öffnung	Sig.	Basis	Mitte	Öffnung	Sig.
14,84 \pm 2,09	21,63 \pm 2,51		**	17,17 \pm 1,97	18,30 \pm 1,83		ns
	21,63 \pm 2,51	27,77 \pm 2,19	*		18,30 \pm 1,83	25,69 \pm 2,37	**
14,84 \pm 2,09		27,77 \pm 2,19	***	17,17 \pm 1,97		25,69 \pm 2,37	***

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig, lediglich unter Benützung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen, angefertigt wurde und daß wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ich versichere, daß nicht bereits früher oder gleichzeitig ein Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens unter Vorlage der hier eingereichten Dissertation gestellt wurde.

Stuttgart Hohenheim, 1. Mai 2004

Danksagung

Vor allem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Claus für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit die Ergebnisse der Arbeit auch vor internationalem Fachpublikum zu präsentieren, die ständige Bereitschaft zur Diskussion sowie die wissenschaftlichen Anregungen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Schenkel möchte ich ebenfalls für die ständige Bereitschaft zur Diskussion als auch für die Hilfe bei der Konzeption der Futterrationen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H.J. Schlüsener und Herrn Dr. M.H. Deininger für die Unterstützung meiner Arbeit als auch die Möglichkeit am Institut für Hirnforschung in Tübingen zu arbeiten, ebenso wie Herrn Prof. Dr. R. Leiser für die Einarbeitung in die immunocytochemischen Methoden und seine fachliche Beratung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. M. Lacorn und Frau Dorothea Lösel für die zahlreichen Hilfestellungen bedanken.

Bei Frau Helga Hägele möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der Immunocytochemie und bei Frau Stefanie Mayer für die Mithilfe bei den analytischen Methoden bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn W. Dunne und Herrn M. Meccellem für die gute Betreuung der Versuchstiere.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken, welche zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, welche mir durch ihren Weitblick und durch ihre ständige Unterstützung diese Ausbildung ermöglicht haben.

