Aus der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock

Direktor (k):

Univ.- Prof. Dr. med. Jan Däbritz

Der Einfluss einer Enzyminduktion auf die Ammoniakentgiftung im Kolon nach Gabe von resistenter Stärke, gemessen anhand der Exkretion der Abbauprodukte von Lactose-[$^{15}N_2$]ureid

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von:

Anne-Sophie Tröndle

aus Konstanz

Rostock, 2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002919

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

Gutachter:

Prof. Dr. med. Markus M. Lerch, Universität Greifswald, Gastroenterologie

Prof. Dr. med. Georg Lamprecht, Universität Rostock, Gastroenterologie

Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Wutzke, Uni Rostock, Ernährungsmedizin

Jahr der Einreichung: 2020

Jahr der Verteidigung: 2020

Für meine Eltern.

Und Heidi.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....7

1.1 Prä-, Pro- und Synbiotika 7
1.1.1 Bedeutung.....7
1.1.2 Definitionen 8
1.1.3 Vorausgehende Präbiotikastudien 10

1.2 Stärke.....12
1.2.1 Stärke biochemisch 12
1.2.2 Resistente Stärke 12
1.2.3 Typen resistenter Stärke 13

1.3 Weiterer theoretischer Hintergrund.....14
1.3.1 Stabile Isotope.....14
1.3.2 Tracerprinzip.....15
1.3.3 Glycosylureide.....16
1.3.4 Enzyminduktion.....19
1.3.5 Stickstoffstoffwechsel, Ammoniakmetabolismus und die Rolle der Kolonbakterien.....19

2 Zielstellung.....21

3 Material und Methodik.....22

3.1 Verwendetes Stärkegemisch 22
3.1.1 Kartoffelfaserstärke.....22
3.1.2 Markerbsenstärke.....22
3.1.3 Maisstärke.....22

3.2 Lactose-[$^{15}N_2$]ureid als Tracersubstanz.....23

3.3 Unmarkiertes Lactoseureid als Enzyminduktor 24

3.4 Analysentechnik.....25

3.5 Messmethode Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie.....27

3.6 Berechnungen und Statistik.....28

3.7 Probanden.....30

3.8 Studiendesign.....32

3.9 Probandenernährung.....35

3.10 Probengewinnung, -aufarbeitung, -messung..... 36
3.10.1 Renale ^{15}N-Exkretion und Gesamt-N-Exkretion.....36
3.10.2 Renale $^{15}NH_3$-Exkretion.....37
3.10.3 Fäkale ^{15}N-Exkretion.....39
3.10.4 ^{15}N-Häufigkeit im Fibrinogen, im proteinfreien Überstand und im Sediment des Blutplasmas.....39

4 Ergebnisse.....42

4.1 Renale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion.....42
4.2 Renale Gesamt-N-Exkretion in Gramm.....45
4.3 Renale kumulative prozentuale $^{15}NH_3$-Exkretion über 24h 47
4.4 Fäkale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion.....50
4.5 Kumulative prozentuale Gesamt-^{15}N-Exkretion im Stuhl und Urin 53
4.6 ^{15}N-Häufigkeit im Fibrinogen, im proteinfreiem Überstand und im Sediment des Blutplasmas 54

5 Diskussion.....57

6 Zusammenfassung.....65

7 Literaturverzeichnis.....67

8 Thesen.....75

9 Selbstständigkeitserklärung.....77

10 Tabellarischer Lebenslauf.....78

11 Danksagung.....80

12 Anhang.....81

12.1 Übersicht des Ablaufs der Tracereinnahme und Probengewinnung anhand des Instruktionsblattes für die Probanden.....81

1 Einleitung

In der heutigen Zeit haben die Ernährung, die körperliche Leistungsfähigkeit und die Gesundheit im Alltag einen hohen Stellenwert. Hiermit korrelierend werden in kommerziellen Zusammenhängen verstärkt die Begriffe Superfoods, Functional Foods sowie Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Entsprechende Produkte lassen sich in variierender Form und großer Vielfalt in Apotheken, Drogerie- und Supermärkten finden.

Gleichzeitig sind Darmerkrankungen wie beispielsweise die oft mit dem westlichen Lebensstil verknüpfte Divertikulose, der Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, aber auch Nahrungsmittelunverträglichkeiten wie die Zöliakie, in ihrer Prävalenz gestiegen. [1-4]

Der griechische Arzt Hippokrates postulierte bereits 300 Jahre vor Christus: „Der Tod sitzt im Darm“ und forderte: „Lasst Nahrung eure Medizin sein und Medizin eure Nahrung.“ [5] Heute weiß man, auch dank Übersichtsarbeiten beispielsweise von Macfarlane oder Cummings et al. [6-8], dass der Darm und die Ernährung tatsächlich eine immense Rolle spielen, wenn es um Gesundheit, um Leistungsfähigkeit und um das Wohlbefinden des Menschen geht. [9]

1.1 Prä-, Pro- und Synbiotika

1.1.1 Bedeutung

Funktionelle Lebensmittel (engl. functional food), denen keine einheitliche Definition zu teil wird, sind Produkte, die neben ihrem Ernährungs- und Genusszweck auch gesundheitsfördernde Effekte haben sollen. Beispiele sind Prä-, Pro- und Synbiotika oder auch Lebensmittel, denen Pro- und Präbiotika zugesetzt sind. [10] Funktionelle Lebensmittel erzielten in Deutschland seit den 1990er-Jahren bis einschließlich 2009 stetig ansteigende Umsätze [11], wird ihnen doch eine präventive, gar therapeutische Wirkung bei einer Vielzahl von Erkrankungen nachgesagt. [5-9]

Für einige Prä- und Probiotika hat man bereits positive Effekte nachgewiesen, darunter die Reduktion von Verstopfung [12], die Senkung des Cholesterinspiegels [13], eine Reduzierung des Dickdarmkrebsrisikos [14,15], positive Aus-

wirkungen auf das Immunsystem [16,17], sowie eine verbesserte Darmflora bei Kleinkindern. [7,18]

Eine aktuelle Studie zeigt beispielweise zudem einen positiven Einfluss einer Präbiotikasupplementation bei polyzystischem Ovar. [19] Auch für viele weitere speziell den Darm betreffende Krankheiten, wie sie in der Einleitung erwähnt wurden, wird der Effekt von Prä-, Pro- und Synbiotika nach wie vor erforscht, erhofft man sich doch schlussendlich aussagen zu können, dass sie diesen Krankheiten vorbeugen, sie im Krankheitsfall gar heilen. [14,20,21]

Menschen mit Depressionen und anderen die Psyche betreffende Erkrankungen, könnten womöglich ebenfalls von Präbiotika profitieren. [22] Diese Erkenntnis ergibt sich aus einer Vielzahl an Studien der letzten Jahre, die sich mit dem Darm, seinem autonomem Nervensystem und der Verknüpfung zum zentralen Nervensystem beschäftigen. [22-24] Sie deduzieren, dass das intestinale Mikrobiom und damit einhergehend die Nahrungsaufnahme für das Wohlbefinden, die mentale Gesundheit und die Leistungsfähigkeit des Menschen mit entscheidend ist. [25]

Insbesondere für die Präbiotika ergeben sich jedoch immer wieder widersprüchliche Ergebnisse. So zeigte beispielsweise eine klinische Studie von Kazemi et al. 2018, die die Auswirkung einer Supplementation von Pro- vs. Präbiotika vs. Placebo auf eine Depression untersuchte, zwar positive Effekte nach Einnahme eines Probiotikums, nicht jedoch nach Einnahme eines Präbiotikums. [26]

Es zeigt sich, auf dem Gebiet der Ernährungsmedizin gilt es hinsichtlich der positiven gesundheitlichen Effekte von Prä-, Pro- und Synbiotika noch weitergehend zu forschen beziehungsweise viel Erforschtes zu validieren.

1.1.2 Definitionen

Während Probiotika (lat. pro = für, gr. bios = das Leben) vorwiegend lebende, nicht pathogene Mikroorganismen wie zum Beispiel Bakterien sind, die die Gesundheit ihres Wirts präventiv, sowie therapeutisch positiv beeinflussen können [5,10,27], sind Präbiotika (aus dem Griechischen pre = vor; bios = das Leben) definitionsgemäß nach Gibson und Roberfroid:

„Nicht verdaubare Lebensmittelbestandteile, die ihren Wirt günstig beeinflussen, indem sie das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder mehrerer Bakterienarten im Dickdarm gezielt anregen und somit die Gesundheit des Wirts verbessern.“ [28] Um eine Substanz als Präbiotikum einzustufen, stellen die folgenden drei Kriterien eine genauere Definition auf: [29]

1. Unverdaubarkeit für Enzyme des oberen Gastrointestinaltrakts
2. Fermentation durch Kolonbakterien
3. Selektive Stimulation des Wachstums und/oder der Aktivität potentiell positiver Bakterien

Probiotika, die sich, für jedermann käuflich im Handel finden lassen, sind beispielsweise mit Milchsäurebakterien aus den Gattungen Lactobacillus und Bifidobakterium angereicherte Joghurts. Des Weiteren können auch einige *E. coli*-Stämme oder die Hefe *Saccharomyces boulardii* als weitere Beispiele für probiotische Erzeugnisse bezogen werden. [5,30]

Zu den wichtigsten Präbiotika zählen die bereits in ihrer Wirkung überprüften Kohlenhydrate Inulin, Lactulose, Raffinose sowie Fructane, Oligofructose und resistente Stärke. [5,7,10,31,32] Sie kommen in einer Vielzahl von Lebensmitteln natürlich vor.

Tabelle 1: Natürliches Vorkommen von Kohlenhydraten mit präbiotischer Wirkung [5,10,32]

Präbiotikum	Vorkommen
Inulin	Chicorée, Artischocken, Schwarzwurzeln, Spargel, Topinambur, Pastinaken
Oligofructose	Roggen, Hafer, Zwiebeln, Knoblauch, Bananen, Tomaten, Spargel
Resistente Stärke	Erkaltete, gekochte Kartoffeln oder Reis, Haferflocken, Bohnen, Linsen, Erbsen, Gerste, Hirse, Weißbrot
Raffinose	Erbsen, Bohnen, Zuckerrohr, Zuckerrüben
Fructane	Zwiebeln, Rüben

Lactulose kommt nicht natürlich vor, sondern es handelt sich bei ihr um ein Disaccharid aus D-Galactose und Fructose, das industriell durch Isomerisierung aus Lactose gewonnen, kommerziell vertrieben und vorallem als Laxans eingesetzt wird. [5]

Neben den jeweiligen Effekten einer Supplementation entweder mit Probiotikum oder mit Präbiotikum, werden auch Effekte einer kombinierten Gabe erforscht. Werden Pro- und Präbiotika kombiniert verabreicht, bezeichnet man sie dementsprechend als Synbiotika. [5,15,21,32]

1.1.3 Vorausgehende Präbiotikastudien

Die Arbeitsgruppe Ernährung der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock, welcher die Studie, die die Grundlage dieser Dissertation bildet, entstammt, untersucht seit etwa 15 Jahren den Effekt der Supplementation von Probiotika und anderer die Nahrung ergänzende Stoffe auf verschiedene gastrointestinale Parameter. Während zunächst mit *Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus casei,* der Substanz L-Carnitin [33-35] und anderen Zusätzen gearbeitet wurde, untersucht man seit geraumer Zeit verschiedene Effekte bei Supplementation

von Präbiotika. Häufig, wie auch in dieser Studie, wurde resistente Stärke, im Folgenden mit RS abgekürzt, als Präbiotikum verwendet.

Tabelle 2: Übersicht vorausgehender Studien unter Verwendung des Präbiotikums RS [36-38]

Untersucher	Studie
Wutzke KD, Lotz M, Zipprich C	The effect of pre- and probiotics on the colonic ammonia metabolism in humans as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide
Wutzke KD, Scholübbers D	The metabolic effect of resistant starch and yoghurt on the renal and faecal nitrogen and ammonia excretion in humans as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide
Wutzke KD, Tisztl M, Salewski B, Glass Ä	Dietary fibre-rich resistant starches promote ammonia detoxification in the human colon as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide

Des Weiteren wurden der Einfluss von RS auf die Fettsäureoxidation und den respiratorischen Quotienten [39], sowie in aktuelleren Studien der Einfluss von RS auf die orozökale Transitzeit (OZTZ), die Wasserstoff- und Methangeneration sowie die Körperzusammensetzung untersucht.

Auf die Ergebnisse der oben gelisteten vorausgehenden Studien und die daraus resultierenden Erkenntnisse wird im Kapitel Diskussion dieser Dissertation vermehrt eingegangen.

Nachfolgestudien beschäftigen sich bereits mit der direkten Auswirkung einer Supplementation von Polysacchariden auf die Mikrobiota des Darmes sowie auf die OZTZ.

1.2 Stärke

1.2.1 Stärke biochemisch

Stärke ist ein Polysaccharid aus den Bestandteilen Amylose und Amylopektin. Bei Vorhandensein reiner 1,4-α-glycosidischer Bindungen zwischen D-Glucosemolekülen spricht man von Amylose. Amylose macht etwa 20-30% der pflanzlichen Stärke aus. Finden sich zusätzlich 1,6-α-glycosidische Bindungen spricht man von Amylopektin, das etwa 70-80% der pflanzlichen Stärke ausmacht und ihr die stark verzweigte Struktur verleiht. [40]

Stärke dient, wie auch das tierische Glycogen, als zellulärer Kohlenhydratspeicher. [5]

Stärke unterscheidet sich nicht nur durch unterschiedliche prozentuale Vorkommen von Amylose und Amylopektin in unterschiedlichen Pflanzen, sondern auch durch ihre Verdaubarkeit, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.2.2 Resistente Stärke

Bei RS handelt es sich um Stärke, die gegen die Verdauung im Dünndarm resistent ist. Das heißt sie wird nicht hydrolysiert, verdaut oder resorbiert, da dem Menschen die entsprechenden Enzyme dafür fehlen.

Sie zählt daher zu den Ballaststoffen und steht somit unverdaut der Mikrobiota des Dickdarms als energielieferndes Substrat zur Verfügung. [5,40,41]

Die Begriffe Mikrobiom und Mikrobiota bezeichnen allgemein die Gesamtheit aller Mikroorganismen der Erde, enger gefasst beziehen sich diese beiden synonym verwendeten Begriffe auf die Gesamtheit aller Mikrolebewesen des menschlichen Körpers, wovon der Großteil im Magen-Darm-Trakt und dort vorallem im Kolon angesiedelt ist. [42]

Erst im Dickdarm kann die dortige Mikrobiota die RS, die ihre bevorzugte Energiequelle ist, durch Fermentation aufspalten und z.B. in kurzkettige Fettsäuren (KKFS) umwandeln, wodurch es den Dickdarmzellen möglich wird sie zu resorbieren. [5,29] Die Effekte dieses Abbaus sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: Effekte des RS- Abbaus auf den Kolonmetabolismus [29,43-47]

direkt	indirekt
Entstehung KKFS wie bspw. Butyrat	Entstehung wertvoller Energieträger
→ Senkung des pH- Wertes und der Entzündungsmarker im Darm	→ Wachstum der bakteriellen Masse
→ Senkung der Aktivität bakterieller Proteasen	→ Positive Veränderung der Zusammmensetzung der Darmbesiedlung
→ Reduktion der Spaltung nicht verdaubarer Proteine	→ Vermehrte Inkorporation des entstehenden Ammoniaks in Bakterien
→ Reduktion der Ammoniakentstehung im Kolon	→ Ausscheidung durch den Fäzes
→ Verbesserung der Integrität der Dickdarmschleimhaut	→ Reduktion der Ammoniakaufnahme über die Darmwand
→ Verbesserung der Barriere-Funktion des GIT zur Umgebung	→ Reduktion der renalen Ammoniakausscheidung
→ **Detoxifizierender Effekt**	→ **Detoxifizierender Effekt**

1.2.3 Typen resistenter Stärke

Man unterscheidet vier Arten von RS. Typ 1 zeichnet sich durch Einschluss der Stärke in intakte Zellverbände aus. Die Stärke ist somit für Verdauungsenzyme unzugänglich. Sie kann physikalisch z.B. durch Kauen oder auch chemisch aufgeschlossen werden und normal verdaut werden.

RS Typ 2 ist für Verdauungsenzyme im Rohzustand aufgrund der Komplexität ihrer Struktur mit vielfachen Verzweigungen unzugänglich.

Durch Erhitzen entfaltet sie jedoch diese komplexe Struktur und die Stärke kann anschließend verdaut werden. Die Temperatur, die für den Vorgang der Entfaltung notwendig ist, ist von Lebensmittel zu Lebensmittel unterschiedlich.

Dieser Vorgang ist irreversibel.

RS Typ 3 nennt sich retrogradierte Stärke oder auch umkehrbare Stärke. Sie kann wie Typ 2 durch Erhitzen zu verdaubarer Stärke werden. Beim Erhitzen und anschließendem Abkühlen (z.B. Einfrieren) von kohlenhydratreichen Speisen entsteht jedoch erneut die im Dünndarm schlecht verdaubare RS Typ 3. Die durch diese Retrogradation vorliegende komplexe kristalline Struktur ist für Verdauungsenzyme, allen voran für die α-Amylase, unzugänglich.

Oft lässt sich in der Literatur eine weitere RS, nämlich die RS Typ 4, finden. Hierbei handelt es sich jedoch um eine repolymerisierte bzw. chemisch modifizierte Stärke, die im eigentlichen Sinne nicht zu den RS gezählt werden sollte, da sie nicht natürlichen Ursprungs ist. [5,47-51]

Tabelle 4: Quellen für die resistenten Stärken Typ 1-3 [51]

Typen	RS Typ 1	RS Typ 2	RS Typ 3
Quellen	Getreidekörner, Saaten, Samen Hülsenfrüchte	Unreife Bananen, ungekochte Kartoffeln, amylosereiche Maissorten, Kartoffelmehl, Kochbananenmehl	Gekochte und abgekühlte Kartoffeln (z.B.-Kartoffelsalat), gekochter und abgekühlter Reis (z.B. in Sushi)

1.3 Weiterer theoretischer Hintergrund

1.3.1 Stabile Isotope

Bei Isotopen (gr. isos = gleich, gr. topos = Platz) handelt es sich um zu einem chemischen Element gehörenden Atome (Nuklide) mit gleicher Protonen- bzw. Ordnungszahl, jedoch unterschiedlicher Neutronenzahl und damit einhergehend unterschiedlicher Masse. Sie besitzen den gleichen Platz im Periodensystem der Elemente. Für den in dieser Studie verwendeten Stickstoff gilt: Stickstoff an sich hat die Massenzahl 14 und wird mit ^{14}N gekennzeichnet. Andere Isotope des Stickstoffes sind z.B. ^{15}N.

In der vorliegenden Studie wurde das stabile Isotop ^{15}N verwendet. Stabile Isotope nennen sich stabil, da sie nicht radioaktiv sind und folglich nicht zerfallen. Sie werden medizin-diagnostisch vielseitig verwendet und können aufgrund ihrer Stabilität auch bei Kindern und Schwangeren unbedenklich eingesetzt werden. [52,53] Eine Auswahl an Einsatzmöglichkeiten folgt:

Tabelle 5: Einsatz stabiler Isotope in der Diagnostik [54]

Beispiel	Verwendetes Isotop + Tracersubstanz
Atemgastest zur Verifizierung einer *Helicobacter-pylori*-Infektion	^{13}C- Harnstoff
Atemgastest zur Bestimmung der orozökalen Transitzeit	Lactose-[^{13}C]ureid
Diagnostik der Mukoviszidose	1,3-Distearyl-2[^{13}C]octanoylglycerol
Untersuchung des Proteinmetabolismus	^{15}N-Glycin

1.3.2 Tracerprinzip

Sowohl radioaktive als auch stabile Isotope werden vielfältig in der Forschung, Diagnostik und Therapie als Tracer eingesetzt.

Analog zum Tracerprinzip in der Nuklearmedizin werden Tracer (deutsch: Spur) auch in der Ernährungsforschung eingesetzt. Ziel dabei ist es metabolische Abläufe möglichst nicht invasiv zu untersuchen. [55] Dabei werden anhand von applizierten Tracersubstanzen, die, anders als in der Nuklearmedizin, mit einem stabilen Isotop markiert sind, Stoffwechselwege verfolgt und spezifische Fragestellungen beantwortet. [52]

Im Körper verhalten sich die jeweiligen Isotope dem Mutternuklid biochemisch identisch und die jeweilige Physiologie bleibt unbeeinflusst. [54]

1.3.3 Glycosylureide

Glycosylureide (GU), wie das in der vorliegenden Studie verwendete Lactoseureid (LU), sind Produkte, die durch Kondensation aus Harnstoff und einem Kohlenhydratanteil z.B. Glucose, Lactose, Cellobiose etc. entstehen.

Sie können durch Synthese mit stabilen Isotopen als Tracersubstanz zum Nachvollziehen verschiedener Stoffwechselprozessen im Intestinaltrakt dienen, da die molekulare Bindung zwischen dem Kohlenhydrat- und dem Harnstoffanteil nicht durch eine enzymatische Metabolisierung im Dünndarm gespalten wird. [56]

Ein erstes Verfahren zur Synthese der GU beschrieb bereits Schoorl Anfang des 19. Jahrhunderts. [57] Das Verfahren wurde wie durch Hoffmann 1932 beschrieben weiter modifiziert. [58]

Vielfältige Untersuchungen zu den (bio)chemischen Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der unterschiedlichen GU und der Möglichkeit ihres Einsatzes unter Bindung an stabile Isotope als Tracer für Stoffwechselprozesse, führte die Arbeitsgruppe um Heine bzw. Wutzke an der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock durch und fand beispielsweise heraus, dass erst im Colon caecum die Abspaltung des Kohlenhydratanteils vom Harnstoff erfolgt und dass diese Reaktion durch das Enzym Glucoseureid-Hydrolase des Bakteriums *Clostridium innocuum* [59] katalysiert wird, was den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Metabolisierung der GU darstellt. Diese spezifische Fähigkeit des *Clostridium innoccum* wurde entdeckt, nachdem man lange davon ausgegangen war, dass Glycosylureide durch die Allantoin-Aminohydrolase von Darmbakterien wie *Pseudomonas aeruginosa, E. coli* und *Staphylococcus aureus* gespalten werden. [60] Der Nachweis des Enzyms Glucoseureid-Hydrolase gelang bisher einzig bei *Clostridium innocuum*. Jedoch ist nicht ausgeschlossen, dass auch andere intestinale Bakterien diese enzymatische Fähigkeit besitzen. [59]

Anschließend wird die entstandene Glucose verstoffwechselt und der Harnstoff weiter abgebaut.

Nach der Spaltung des Harnstoffs durch das Enzym Urease von Bakterienarten wie beispielsweise *Klebsiella* oder *Bacteroides* [56,59,61] werden dann die Stoffwechselendprodukte CO_2 und NH_3 freigesetzt. [56]

Die Erfassung der renalen und fäkalen ^{15}N-Stickstoffexkretion ist durch die Markierung des GU mit [$^{15}N_2$]-Harnstoff, die Gewinnung von Stuhl- und Harnproben, die akribische Aufarbeitung dieser und anschließende Elementaranalyse sowie massenspektrometrische Isotopenhäufigkeitsmessung möglich. [62] Weitere Informationen dazu finden sich in den sich anschließenden Kapiteln.

Der eben beschriebene Metabolismus der GU ist in der folgenden Grafik am Beispiel des Lactose-[$^{15}N_2$]ureids (^{15}N-LU), das in dieser Studie als Tracersubstanz benutzt wird, dargestellt. Für unmarkiertes LU erfolgt der Metabolismus analog zur nachfolgenden Grafik:

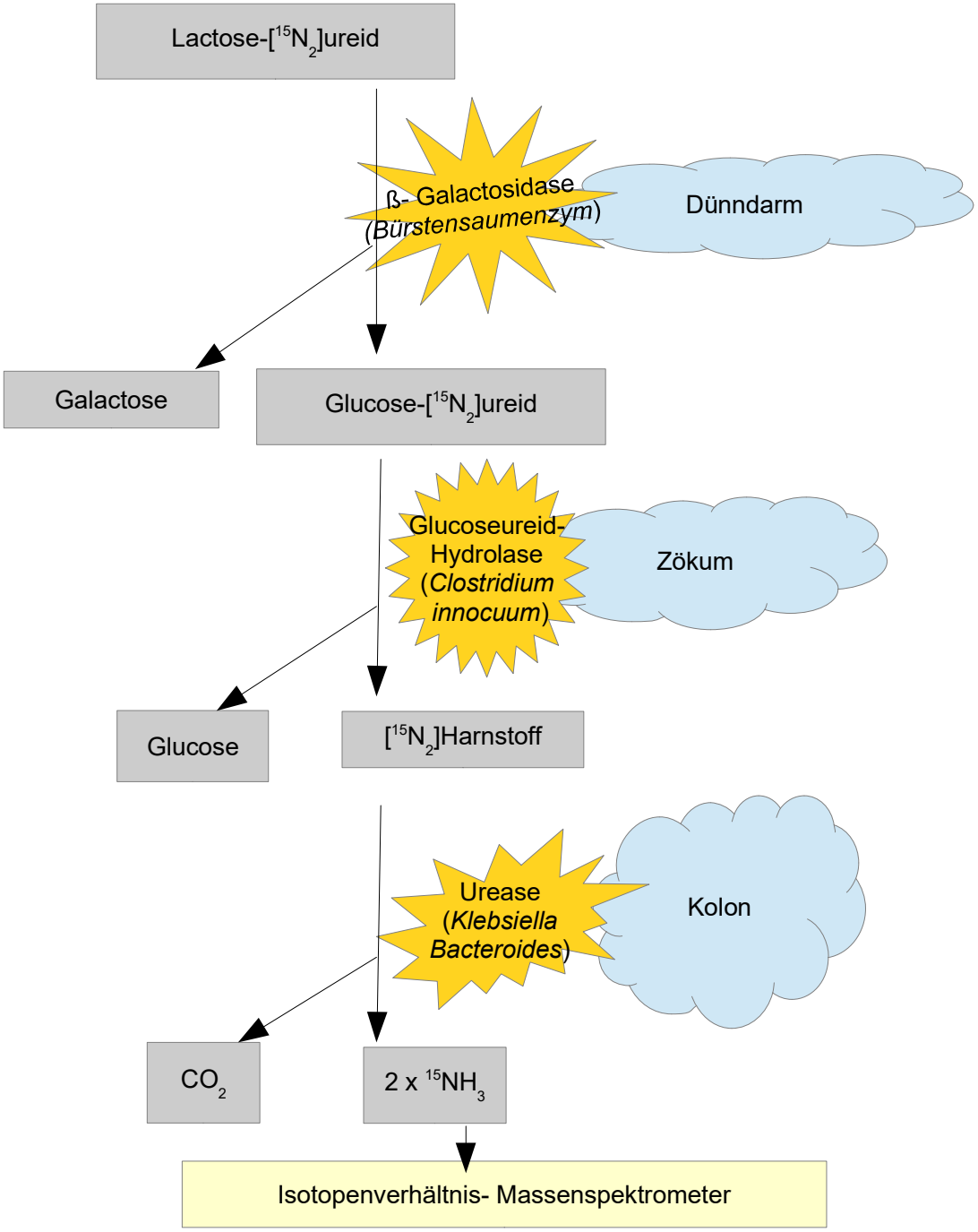

Abbildung 1: Grafische Darstellung des Abbaus des ^{15}N-LU im Gastrointestinaltrakt [63,69]

1.3.4 Enzyminduktion

Der Begriff Enzyminduktion beschreibt die vermehrte Neusynthese und die damit einhergehende Konzentrationserhöhung eines Enzyms. Zugrunde liegt eine vermehrte Genexpression in Anwesenheit bestimmter Substanzen (Induktoren). [64] Folge dieser Konzentrationserhöhung ist, in der hier beschriebenen Applikation von unmarkiertem LU, die allmählich verstärkt einsetzende Metabolisierung von ^{15}N-LU. Wird diese durch das entsprechende unmarkierte LU selbst ausgelöst, spricht man von Eigeninduktion. Löst ein anderes GU beispielsweise Cellobioseureid oder Glucoseureid wie bei Wutzke et al. 2010 beschrieben bzw. nachgewiesen, die verstärkte Metabolisierung aus, bezeichnet man dies als Fremdinduktion. [65]

Die Induktion des Enzyms Gucoseureid-Hydrolase bei der Metabolisierung des ^{15}N-LU ist durch die jeweilige Substanz als Eigeninduktion in mehreren Studien [65,66] geprüft und hinsichtlich der Anwendung des ^{15}N-LU als Tracer, was die Bestimmung der OZTZ betrifft, als effektiv bewertet worden. [56]

In dieser Studie wird die Induktion des Enzyms durch die unmarkierte Substanz LU bei Verwendung von ^{15}N-LU als Tracersubstanz in Bezug auf die Ammoniakentgiftung im Kolon untersucht.

1.3.5 Stickstoffstoffwechsel, Ammoniakmetabolismus und die Rolle der Kolonbakterien

Stickstoff (N_2) ist ein elementares Makromolekül, da er Hauptbestandteil von beispielsweise Proteinen, Nucleotiden und vielen weiteren Verbindungen ist. Aufnahme und Ausscheidung dieser Verbindungen sind beim Menschen genau geregelt. Während die Aufnahme z.B. aus der Nahrung sowie aus endogenen Reservoirs wechselnden Mengen unterworfen ist, wird vor allem über den Aminosäurenabbau die Stickstoffhomöostase gesichert.

So besteht bei einem Menschen mit einem Körpergewicht von 70kg ein Aminosäurenpool von etwa 70-100g freier Aminosäuren, der in ständigem Austausch mit den Körperproteinen steht.

Organische stickstoffhaltige Verbindungen, wie beispielsweise Proteine und

Peptide, die das Kolon erreichen, werden dort unter der Entstehung von Ammoniak und anderer teils toxischer Metabolite fermentiert.

Ammoniak (NH_3) bzw. Ammonium (NH_4^+) ist bereits in geringen Konzentrationen eine toxische Substanz. Es schädigt das Darmepithel und entwickelt nach Absorption in den Blutkreislauf neurotoxische Wirkungen, weswegen ein Teil des anfallenden Ammoniaks im Körper entgiftet werden und direkt oder indirekt nach Einbau in weniger toxische Verbindungen augeschieden werden muss.

Gleichzeitig ist diese stickstoffhaltige Verbindung Quelle für die Aminosäuren- und Proteinsynthese von intestinalen Bakterien und damit ein wichtiger Wachstumsfaktor dieser. [40]

Soweit das entstehende Ammoniak nicht für bakterielle Synthesen oder anderweitige Reaktionswege benötigt wird, erfolgt in der Leber, da diese eine enzymatische Ausstattung für die Bildung von Harnstoff besitzt, die Umwandlung von Ammoniak in Harnstoff. Dies geschieht in einer zyklischen Reaktionsfolge, die sich Harnstoffzyklus nennt. Hierauf wird in der Diskussion nochmals explizit eingegangen.

Um auf die Rolle der Bakterien des Kolons zu kommen, hatten vorhergehende Studien bereits erfolgreich zum Gewinn neuer Erkenntnisse über den Stickstoffstoffwechsel im Kolon und diesbezüglich über den Effekt der Präbiotika und die Bedeutung der Kolonbakterien beigetragen. [36-38]

Anhand der Messung der Degradationsprodukte von GU wurde festgestellt, dass die für das Bakterienwachstum benötigte Stickstoffmenge von der verfügbaren Energie aus der Kohlenhydrat- bzw. Präbiotikafermentation abhängig ist und dass bei resultierendem Anstieg der bakteriellen Masse eine vermehrte Inkorporation von Ammoniak in Bakterien und damit eine fäkale Ausscheidung und luminale Reduktion möglich ist.

Ferner wurde herausgefunden, dass sich durch eine Enzyminduktion die OZTZ, die indirekt proportional zur fäkalen Ammoniakausscheidung ist, genauer bestimmen lässt. Für die Ammoniakentgiftung selbst konnte bisher keine signifikante Auswirkung einer Enzyminduktion festgestellt werden. Eine Studie von de Preter et al. aus dem Jahre 2006 hatte die Notwendigeit einer Enzyminduktion bei Untersuchung des Ammoniakstoffwechsels verneint. [68] Dies soll nun verifiziert bzw. widerlegt werden.

2 Zielstellung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Auswirkungen der Supplementation eines Gemisches aus resistenter Maisstärke, resistenter Markerbsenstärke und resistenter Kartoffelfaserstärke bei vorhergehender Induktion durch unmarkiertes Lactoseureid auf die NH_3-Entgiftung im Kolon, auf die renale ^{15}N-Gesamtexkretion, die $^{15}NH_3$-Exkretion sowie die ^{15}N-Inkorporation im löslichen Überstand des Blutplasmas anhand des Abbaus von markiertem Lactose-[$^{15}N_2$]ureid im Kolon des Erwachsenen.

Als Arbeitshypothese gingen wir der Frage nach ob und in welchem Umfang eine Enzyminduktion zu einer vermehrten fäkalen ^{15}N-Exkretion bzw. im Umkehrschluss zu einer verminderten renalen ^{15}N-Exkretion von Stickstoff und Ammoniak unter einer Supplementation von RS führt.

3 Material und Methodik

3.1 Verwendetes Stärkegemisch

In dieser Studie wurde mit einem Gemisch aus drei verschiedenen Arten von RS gearbeitet, nämlich Kartoffelfaserstärke (KFS), Markerbsenstärke (MES) sowie Maisstärke (MS). Diese unterschieden sich in ihrer prozentualen Zusammensetzung hinsichtlich ihres gesamten Stärkegehaltes, den darin vorkommenden Typen RS, dem Ballaststoffgehalt, sowie in ihrem Gehalt an Proteinen, Kohlenhydraten, Fett und Wasser.

Alle Stärken sind kommerziell verfügbar und werden u.a. in der Back- und Fleischwarenindustrie verwendet. [54,69] Sie wurden jede für sich vom Hersteller in Eimern geliefert und für die Studiendurchführung manuell zu je 3,33g mit der Waage MC1 LC 2200 P (Sartorius, Göttingen, Deutschland) abgewogen und in Portionsgrößen zu je 10g abgefüllt. Den Probanden wurde die entsprechende Stückzahl vor dem jeweiligen Phasenbeginn ausgehändigt. Die nachfolgenden Abschnitte geben weitere Informationen zu den jeweiligen Stärken.

3.1.1 Kartoffelfaserstärke

Die KFS wurde von der Firma Emsland Group GmbH in Emlichheim bezogen. Sie hat einen Anteil von 12% einer Typ 1 RS und einen hohen Ballaststoffgehalt von 60%. An Ballaststoffen enthält sie überwiegend Zellulose, wenig Hemizellulose, zusätzlich Xylose, Arabinose, Pektin und Lignin. [69]

3.1.2 Markerbsenstärke

Von der Firma Emsland Group GmbH in Emlichheim wurde ebenfalls die MES bezogen. Sie hat einen hohen Anteil an RS Typ 2 (70%), jedoch einen sehr geringen Gesamtballaststoffgehalt von weniger als 1%. [69]

3.1.3 Maisstärke

Als dritte Komponente des Gemisches bezog man von der Firma Ingredion, Hamburg die MS. Auch diese hat einen hohen Gehalt an RS Typ 2 (70% pro Trockenmasse) und gleichzeitig einen hohen Gesamtballaststoffgehalt von über 60% pro Trockenmasse. [69]

3.2 Lactose-[$^{15}N_2$]ureid als Tracersubstanz

^{15}N-LU wurde im Forschungslabor für Ernährungsmedizin der Universitätskinder- und Jugendklinik synthetisiert. Die Grundsubstanzen Lactose und [$^{15}N_2$]-Harnstoff wurden von den Firmen Merck, Darmstadt, Deutschland bzw. Campro Scientific, Berlin, bezogen. Im Rahmen eines Drittmittelprojekts mit letztgenannter Firma wurde diese Studie auch durchgeführt.

Die Synthese erfolgte wie im folgenden Abschnitt beschrieben:

Es wurden 50g Lactose in 100ml bzw. 25g [$^{15}N_2$]-Harnstoff (95Atom-% ^{15}N) in 25ml Aquadest. bei 90°C gelöst. Anschließend wurden beide Substanzen gemischt. Das Gemisch musste anschließend abkühlen. Der pH-Wert des Gemisches wurde mittels 1 N Salzsäure auf 1,6 gebracht. Nun wurde das Gemisch für neun Tage unter pH-Wert-Kontrolle im Wasserbad bei konstant 42°C belassen. Nach Ablauf dieser neun Tage wurde das Gemisch, weiterhin unter pH-Wert- Kontrolle, im Kühlschrank auf 4°C abgekühlt. ^{15}N-LU kristallisierte hierbei auf dem Boden des Gefäßes aus. Es konnte somit der Bodensatz vom löslichen Anteil getrennt werden. Der erhaltene kristalline Feststoff konnte getrocknet und abgewogen werden. Um den Anteil von freiem Harnstoff auf maximal 0,05% zu senken, wurde eine dreimalige Umkristallisierung mittels Aquadest. und Ethanol vorgenommen. Aus den anfänglich im Kapitel genannten Substanzmengen konnten somit ca. 90g ^{15}N-LU synthetisiert werden.

Zur Bestimmung der renalen und fäkalen Exkretion von Stickstoff- und Ammoniak wurde die ^{15}N-LU-Dosis auf das am Morgen der Tracereinnahme ermittelte Körpergewicht des jeweiligen Probanden berechnet und während des Frühstücks eingenommen. Berechnet wurde die notwendige Dosierung nach der Formel:

Dosis = 5,7mg ^{15}N-LU x kg Körpergewicht (KG) **(1)**

Dies entspricht einer reinen ^{15}N-Dosis von 0,4mg/kg KG pro Tracereinnahme. Beim Abwiegen der Tracersubstanz wurde die Waage MC1 AC 210 P (Sartorius, Göttingen, Deutschland) verwendet.

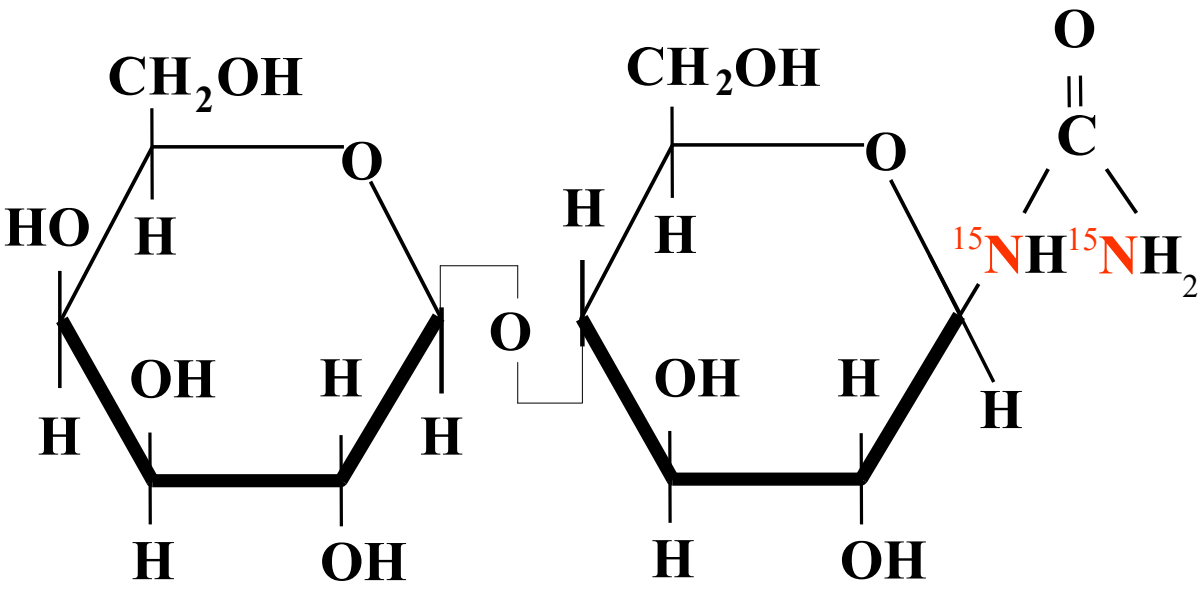

Abbildung 2: Strukturformel von Lactose-[$^{15}N_2$]ureid

3.3 Unmarkiertes Lactoseureid als Enzyminduktor

Einen Tag vor der Tracereinnahme der beiden Phasen mit Induktion (Phase III und IV), erhielten die Probanden um 12:00, 16:00 und 20:00 Uhr eine Dosis von 200mg unmarkiertem Lactoseureid zur Induktion des Enzyms Glucose-Ureid-Hydrolase des Bakteriums *Clostridium innocuum*.

Dieses wurde, wie auch das ^{15}N-LU, im Forschungslabor für Ernährungsmedizin der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock hergestellt. Einzelheiten zu Funktion, Struktur und Metabolisierung sind vorhergehenden Kapiteln zu entnehmen.

3.4 Analysentechnik

Die im Elemetaranalysator zu untersuchenden Proben können sowohl im festen als auch im flüssigen Aggregatzustand vorliegen. Die Proben werden zunächst unter Verwendung von Chromium(VI)-oxid bei 900°C verbrannt. Die hier zu analysierenden Proben lagen alle im festen Aggregatzustand vor. Bei ihrer Verbrennung entstanden Stickstoff (N_2), Wasser (H_2O), Kohlendioxid (CO_2) und verschiedene Stickstoffoxide (NO_x). Letztere wurden anschließend mittels Kupfer bei 600°C zu N_2 reduziert. Im Rahmen der Elementaranalyse konnte somit die Gesamt-Stickstoff-Konzentration ermittelt werden. Zur Bestimmung der Häufigkeit der Stickstoffisotope ^{14}N und ^{15}N wurde das entstandene Stickstoffgas direkt mit Helium als Trägergas in das unten ausführlicher beschriebenen Massenspektrometer geleitet.

Die Ergebnisse wurden, wie in nachfolgenden Kapiteln beschrieben, berechnet und als KPE dargestellt. Die Ergebnisse, die die Analyse des Citratplasmas lieferte, wurden als Häufigkeiten in At-%-exz dargestellt. [69]

Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten analytischen Instrumente und der Messinstrumente:

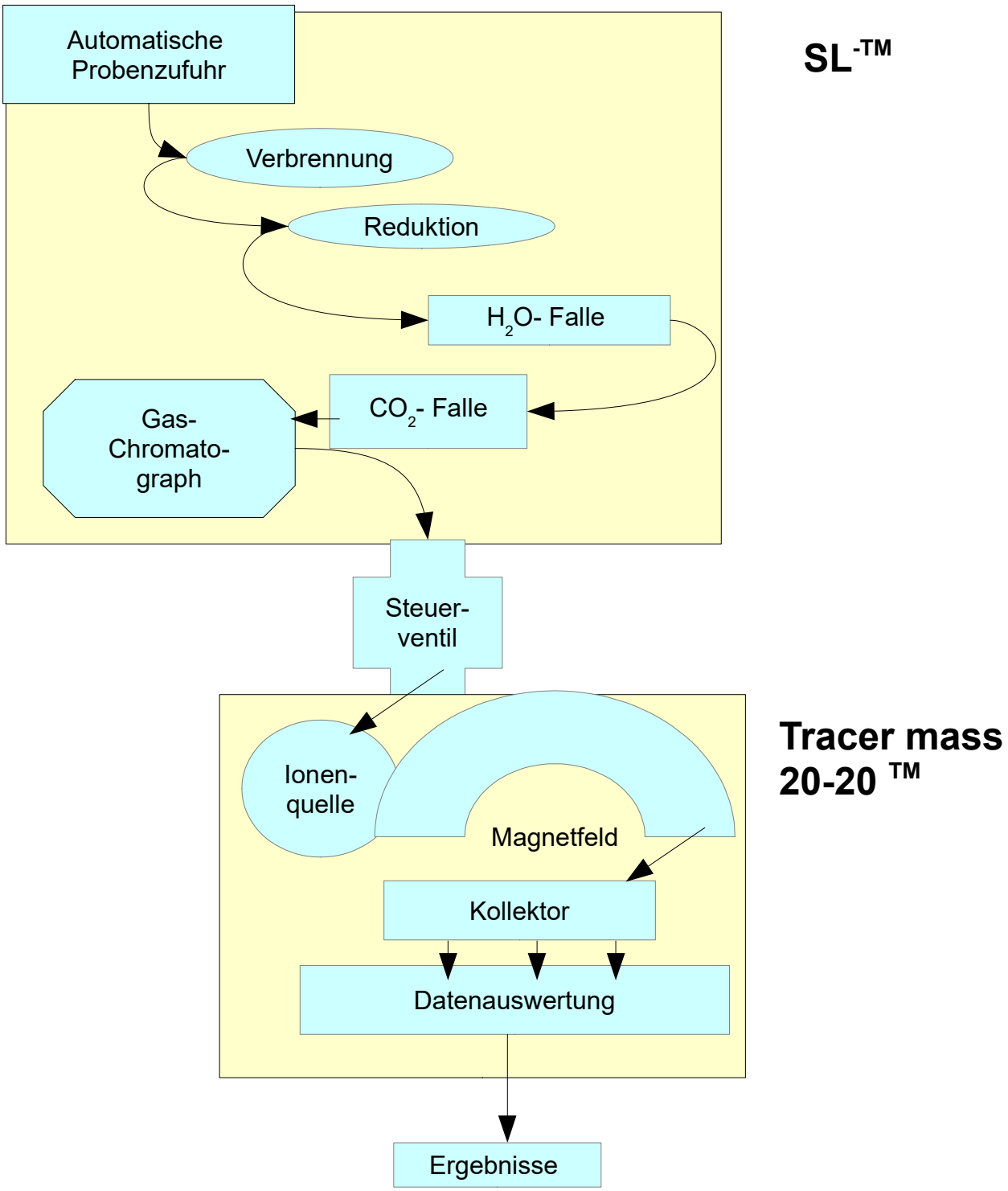

Abbildung 3: Probenverarbeitung anhand einer schematischen Grafik des verwendeten Elementaranalysators (SL^{TM}) und des nachgeschalteten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers (Tracer mass 20-20^{TM}) [69]

3.5 Messmethode Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie

Im Rahmen der zugrunde liegenden Studie kam das Gerät Tracer Mass 20-20™ der Firma Europa Scientific, Crewe, UK zur Anwendung. Es arbeitet nach dem CF-IRMS-Verfahren (continous flow-isotope ratio mass spectrometry). [58]

Mit ihm ist die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie, eine spezielle Form der Massenspektrometrie möglich. Die Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie misst das Verhältnis von Haupt- zu Nebenisotop, d.h. in diesem Fall von Stickstoff ^{14}N zu ^{15}N. Es wird hierzu je ein Standardwert benötigt. Das Isotopenverhältnis wird in Bezug zu diesem als Atomprozent-Exzess (At-%-exz.) bezeichnet. Harnstoff p.a., Merck, Darmstadt, wird hier für Stickstoff als Referenz verwendet. [69]

Die den Elementaranalysator passierenden Proben werden der Hochvakuum-Kammer automatisch über ein Einlassventil zugeführt.

Durch Elektronenbestrahlung wird der Stickstoff ionisiert. Die erzeugten Ionen werden mittels einer elektrische geladenen Platte durch eine angelegte Spannung beschleunigt. Die resultierende Geschwindigkeit (v) der Ionen wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$\mathbf{v} = \left[\frac{(\mathbf{g \times U \times 2})}{\mathbf{m}} \right]^{0,5} \qquad \textbf{(2)}$$

g = Ladung

U = Spannung

m = Masse

v = Geschwindigkeit

Ein elektromagnetisches Linsensystem bündelt die Ionen in einem Strahl, welcher in ein starkes Magnetfeld geleitet wird. Dort werden die Ionen entsprechend ihrer Ladung (g) und Geschwindigkeit (v) durch die wirkende Lorenzkraft entsprechend nachfolgender Formel abgelenkt:

F = g x **v** x **B** **(3)**

F = Lorenzkraft

g = Ladung

v = Geschwindigkeit

B = magnetische Induktion

Es entstehen ensprechende Kurvenverläufe. Schwere, langsamere Moleküle werden weniger abgelenkt als leichte, schnellere. Die unterschiedliche Ablenkung bewirkt ein nach Massen getrenntes Auftreffen der Ionen auf selektiv platzierten Kollektoren, woraus ein Strom erzeugt wird. Dieser wird dann über einen Verstärker in ein Signal umgewandelt. [62] Das Isotopenverhältnis des schwereren zum leichteren Ion kann schlussendlich aus diesen Signalen berechnet werden.

3.6 Berechnungen und Statistik

Die indiviuell zu verwendende ^{15}N-Dosis berechnet sich aus dem Körpergewicht (KG) des Probanden multipliziert mit der festgelegten Dosis von 0,4mg ^{15}N/kg KG nach der Formel:

Dosis (D) = KG x **0,4mg ^{15}N/kg KG** **(4)**

Aus dem Produkt des gemessenen ^{15}N-Atom-%-Exzess-Wertes der jeweiligen Probe, dem Volumen des Urin bzw. der Masse [m] des Stuhls, der Stickstoffkonzentration der Probe [C_N] und dem Faktor 15 geteilt durch 1400 plus Atomexzess der Probe berechnete sich die ^{15}N-Exkretion [E] des renalen Stickstoffs, des renalen Ammoniakstickstoffs sowie des über den Stuhl ausgeschiedenen Stickstoffs. Die Formel sieht wie folgt aus:

$$E = \frac{15 \times \text{At-\%-exz.}_{\text{Probe}} \times V \times C_N}{1400 + \text{At-\%}_{\text{Probe}}} \qquad (5)$$

Die KPE ergibt sich anschließend aus der renalen ^{15}N oder $^{15}NH_3$- oder der fäkalen ^{15}N-Exkretion multipliziert mit 100 und dividiert durch die Dosis. [69]

$$KPE = \frac{(E \times 100)}{D} \qquad (6)$$

Zur Speicherung und anschließenden Analyse aller Daten wurde das auf Windows basierende statistische Softwarepaket IBM SPSS statistical package 25.0 verwendet. Im ersten Schritt erfolgte eine deskriptive Auswertung für kontinuierliche und kategoriale Variablen.

Kontinuierliche Variablen wurden mittels Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD), Minimum (Min), Maximum (Max) und Anzahl der verfügbaren Observationen (n) beschrieben. Für die kategorialen Variablen wird für die einzelnen Ausprägungen die absolute und relative Häufigkeit angegeben.

Für die sich anschließende Testauswahl wurde bezüglich der Prüfung auf Normalverteilung der Variablen zunächst der Kolmogorov-Smirnov-Test bzw. bei

n = 23 der Shapiro-Wilks-Test herangezogen.Bei nur teilweise gegebener Normalverteilung schloss sich der Kruskall-Wallis- Test für alle vier Messreihen à vier Phasen an. Statistische Vergleiche zwischen den einzelnen Phasen einer Messreihe wurden für kontinuierliche Variablen mit dem Mann-Whitney-U-Test durch paarweises Nachtesten realisiert. Unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur wurden Anpassungen des Signifikanzniveaus durchgeführt. So wurde beispielsweise das Signifikanzniveau für Paarvergleiche zwischen den jeweiligen Werten der vier Phasen einer Messreihe auf p* = 0,05/6 = 0,008 gesenkt.

Für kategoriale Merkmale wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt.

Graphische Darstellungen wurden mit Open Office Draw, tabellarische Übersichten mittels Open Office Calc realisiert.

3.7 Probanden

An der vorliegenden Studie nahmen insgesamt 23 Probanden teil. Es handelte sich um neun Männer und 14 Frauen. Das Gewicht lag zwischen 50 und 110kg mit 69kg als Mittelwert. Das Alter der Probanden variierte zu Studienbeginn zwischen 22 und 35 Jahren mit 23,6 Jahren als Mittelwert. Zwei der Probanden ernährten sich ausschließlich vegetarisch.

Ausschlusskriterien waren ein Alter über 65 oder unter 18 Jahren, eine den Stoffwechsel betreffende Erkrankung wie z.B. Diabetes mellitus, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Antibiotikaeinnahme in den letzten drei Monaten, sowie anderweitige Medikamenteneinnahme oder operative Eingriffe mit Einfluss auf die gastrointestinale Passage.

Die Probanden waren angehalten, insbesondere während der Tage der Induktion, Tracergabe sowie Probensammlung, auf den Konsum von Alkohol zu verzichten.

Für den gesamten Studienzeitraum galt, dass die Probanden ihr Gewicht möglichst halten und ihre körperliche Aktivität weder verringern noch erhöhen sollten.

Eine detaillierte Auflistung der anonymisiert behandelten Daten der Probanden findet sich in der diesem Kapitel folgenden Tabelle.

Jeder Studienteilnehmer wurde in Schriftform über die Studie informiert und hatte vor Beginn der Studie eine Unterschrift zu leisten, die sein Einverständnis mit der Teilnahme an der Studie bestätigte.

Ethikkomissionsbescheid

Unter der Registirierungsnummer II HV11/2006, Amendment vom 16.06.2011, Votum vom 04.07.2011 erteilte die Ethikommisson der medizinischen Fakultät der Universität Rostock ihren positiven Bescheid zur Durchführung der hier vorliegenden Studie.

Tabelle 6: Übersicht der Daten der in der Studie eingeschlossenen Probanden:

Probanden	Geschlecht [m/w]	Alter zu Studienbeginn [Jahre]	Gewicht [kg]	Vegetarier [ja/nein]
1	w	26	58	nein
2	w	22	80	nein
3	m	26	94	nein
4	m	22	110	nein
5	w	23	50	nein
6	w	22	67	nein
7	w	30	69	nein
8	m	35	89	nein
9	w	24	56	nein
10	w	22	70	nein
11	m	22	63	nein
13	m	25	74	nein
14	w	22	76	nein
15	m	29	91	nein
16	w	28	66	ja
17	m	22	80,5	nein
18	w	22	64	nein
19	w	25	62	nein
20	m	23	76	nein
21	w	23	53	nein
22	m	22	80	nein
23	w	29	59	ja

3.8 Studiendesign

Die Studie erstreckte sich über einen Zeitraum von 75 Tagen. Diese 75 Tage wurden aufgeteilt in je vier Phasen. Eine Phase umfasste 15 Tage. An jede Phase schloss sich ein sogenanntes Wash-out, eine Auswaschphase, die je aus fünf Tagen bestand, an.

In den Phasen mussten die Probanden, die randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt worden waren, zweimal über einen Zeitraum von 15 Tagen, zu den drei regelmäßigen Mahlzeiten pro Tag, ein Gemisch aus insgesamt 10g MES, KFS und MS zu sich nehmen. Die je zwei Phasen der Stärkeeinnahme sowie der regulären Diät unterschieden sich dadurch, dass am Vortag der Verabreichung der Tracersubstanz in den Phasen III und IV dreimal (um 12:00,16:00 und 20:00 Uhr) mit einer Dosis von 200mg unmarkiertem LU induziert wurde.

Die Phasenabfolge unterschied sich somit bei beiden Gruppen und ergab sich wie folgt:

Gruppe 1 :

I. Leerphase (LP), welche aus der normalen, regelrechten, täglichen Diät bestand,

II. Stärkephase (SP): Zur regelrechten Diät erfolgt die Einnahme des Stärkegemisches zu den Hauptmahlzeiten,

III. Leerphase (s.I.) plus Induktion: Induktion mit Lactoseureid am Tag vor der Tracereinnahme (LP + Ind.)

IV. Stärkephase (s.II.) plus Induktion: Induktion mit Lactoseureid am Tag vor der Tracereinnahme (SP + Ind.).

Für Gruppe 2 gestaltete sich die Reihenfolge der Phasen wie folgt:

I. SP (s.o.),

II. LP (s.o.),

III. SP + Ind. (s.o.), sowie

IV. LP + Ind. (s.o)

Am 13., 33., 53. und 73. Tag der Studie wurde den Probanden vor dem gemeinsamen Frühstück eine venöse Blutprobe abgenommen.

Zusammen mit dem Frühstück wurde exakt um 8:00 Uhr die Tracersubstanz ^{15}N-LU verabreicht.

Urin und Stuhl wurden danach entsprechend den vorhandenen Protokollen über einen Zeitraum von 48 bzw. 72h gesammelt. Eine zweite venöse Blutprobe wurde sechs Stunden nach Applikation des ^{15}N-LU abgenommen.

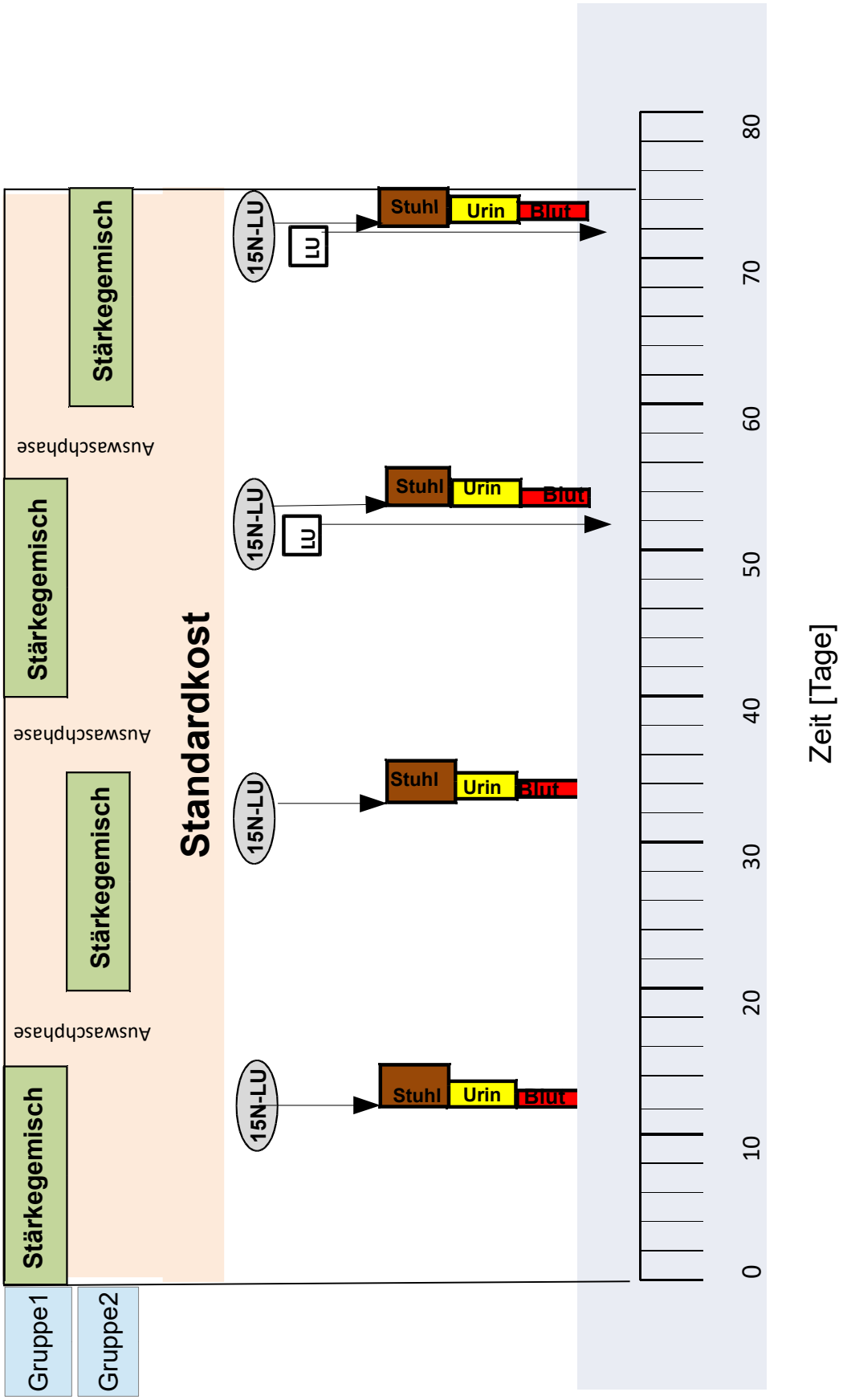

Abbildung 4: Schema des Studienablaufs

3.9 Probandenernährung

Die Probanden waren angehalten sich über den ganzen Studienzeitraum hinweg ausgewogen entsprechend der Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) mit vollwertiger Mischkost zu ernähren. Das bedeutete sich mit begrenzten Fettmengen (30-35%) und mehr als 50% der Energiezufuhr in Form von Kohlenhydraten sowie 15% Energiezufuhr aus Proteinen zu ernähren. Dies wurde anamnestisch vor Studienbeginn für jeden Probanden, insbesondere auch für die Vegetarier, sichergestellt.

In den beiden Stärkephasen (SP, SP+Ind.) wurde zu jeder Hauptmahlzeit (Frühstück, Mittagessen, Abendessen) 10g eines Stärkegemisches aus KFS, MES, MS eingenommen. Das Gemisch durfte mit Flüssigkeiten wie Wasser, Milch oder lauwarmem Tee zu sich genommen werden. Es war darauf zu achten, dass möglichst die exakten 10g eingenommen wurden und dass nicht etwa Reste des Stärkegemisches in der Dose haften blieben.

An den vier Tagen der Tracereinnahme erhielt jeder Teilnehmer ein standardisiertes Frühstück, bestehend aus einem Weizenbrötchen, 10g Streichfett, 50g Käse und 35g Marmelade sowie einer Tasse Tee. Das Frühstück wurde gegen 7:50 Uhr begonnen und die Einnahme des Tracers erfolgte, auf eine Ecke des mit Marmelade bestrichenen Anteils des Brötchens gestreut, mit einem Bissen exakt um 8:00 Uhr. Dadurch wurde sichergestellt, dass die gesamte Menge der Tracersubstanz punktuell eingenommen wurde. Nach dem Frühstück wurden die Patienten nochmals exakt zur Urin-Sammelphase instruiert. Sie sollten zunächst alle zwei Stunden den Urin sammeln und möglichst auf große Trinkmengen verzichten. Wasser oder Tee waren zur Sicherstellung der Harnproduktion schluckweise erlaubt. Außerdem wurde ihnen für den gleichen Tag ein standardisiertes Mittagessen, bestehend aus Spaghetti der Marke Combino des Discounters Lidl, Deutschland sowie einem Glas Bolognesesauce mit Rindfleisch der Marke Combino des Discounters Lidl, Deutschland, ausgehändigt. Die Vegetarier erhielten Tomaten-Basilikum-Sauce der Marke Combino, Lidl, Deutschland.

Das Mittagessen durfte nach der zweiten Blutentnahme ab 14:00 Uhr und damit sechs Stunden nach Tracergabe eingenommen werden.

Das Abendessen durften die Probanden wieder individuell gestalten.

3.10 Probengewinnung, -aufarbeitung und Messung

3.10.1 Renale ^{15}N-Exkretion und Gesamt-N-Exkretion

Jeder Proband wurde vor Studienbeginn mit einem Messbecher und einem Messzylinder zum Auffangen der Urinproben und zur genauen Bestimmung des Probenvolumens anhand einer den Messgefäßen aufgedruckten Skala mit Abständen von 2ml ausgestattet. Außerdem erhielt jeder ein Instruktionsblatt (s. 12 Anhang) mit den genau vorgegebenen Sammelzeitpunkten, sowie ein Protokoll, in welchem die Volumina und die genauen Uhrzeiten eingetragen wurden. Nach Messung der Volumina wurde eine Menge von ca. 25ml in ein eigens vorbereitetes Urinproberöhrchen umgefüllt. Die Urinproberöhrchen, die je mit 10 Tropfen 1N Salzsäure zur Konservierung des Harnstofffes angesäuert waren, waren dem Patienten ebenfalls in enstprechender Stückzahl ausgehändigt worden. Diese wurden nach Befüllung ebenfalls mit Datum, Uhrzeit, Volumen der Gesamtprobe und Namen, entsprechend den Eintragungen im Urin-Protokoll beschriftet. Der Rest des aufgefangenen Urinvolumens konnte über die Toilette entsorgt werden. Die gesicherte Urinprobe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

Vor Tracergabe war pro Phase eine Urinprobe als Leerwert abzugeben. Nach der Tracereinnahme gestaltete sich die Sammelphase wie folgt: Der Urin war insgesamt 48h lang zu sammeln. Davon sollte möglichst viermal im Abstand von zwei Stunden direkt nach Tracereinnahme, das heißt um 10:00, 12:00, 14:00 und 16:00 Uhr eine Probe gesichert werden. Anschließend möglichst zweimal im weiteren Abstand von vier Stunden, das bedeutete um 20:00 und um 24:00 Uhr. Danach erfolgte die Probensammlung ad libitum mit zwingend notwendiger Probenasservierung nach 24h und 48h post-Tracereinnahme.

Stets einen Tag vor Aufarbeitung der Urinproben wurden diese zum Auftauen in einen Kühlschrank mit ca. 8°C Temperatur gestellt. Alternativ ließ man die Proben vier Stunden bei Raumtemperatur auftauen. Es wurde eine Liste mit der genauen Probenbezeichnung etc. geführt. Eppendorfröhrchen wurden entsprechend dieser Liste beschriftet. Die Eppendorfröhrchen wurden mit je 1ml Harn aus den entsprechenden Proben befüllt. Sie wurden in die Zentrifuge HERMLE Z 160- M, Wehingen, Deutschland gegeben und drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Vom flüssigen Anteil des Überstandes wurden 25µl auf Zinnscheiben der IVA Analysentechnik GmbH & Co.KG, Meerbusch, Deutschland mit dem Durchmesser 28mm aufgetragen und auf einer Wärmeplatte bei 25 Watt und 50°C getrocknet.

Danach wurden die Zinnscheiben samt aufgetragenem kristallisiertem Anteil mit Hilfe von Pinzetten zu Kügelchen gerollt und zunächst entsprechend einer für die Elementanalyse angefertigten Messliste in Eppendorfröhrchen als Aufbewahrungsbehälter einsortiert. Aus diesen konnten sie bei vorhandener Kapazität im SL^{TM} und im Tracer mass 20-20^{TM,} SerCon, Crewe, U.K. analysiert werden.

Hierbei wurde die N-Konzentration bzw. ^{15}N-Häufigkeit gemessen und die kumulative prozentuale Exkretion, im Folgenden als KPE abgekürzt, des ^{15}N über 48h berechnet.

3.10.2 Renale $^{15}NH_3$-Exkretion

Die renale $^{15}NH_3$-Exkretion sollte für die ersten 24h nach Tracereinnahme bestimmt werden. Es wurden die entsprechenden Urinproben laut Protokoll und Beschriftung verwendet. Zunächst wurden 5ml Urin in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Es erfolgte die Zugabe von 5ml eigens dafür hergestellter gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung. Ein Stopfen mit Auffangeinsatz war zuvor vorbereitet worden. Sofort nach Zugabe der Kaliumcarbonat-Lösung wurde der Kolben mit einem entsprechend dafür gefertigtem Glasstopfen mit Auffangeinsatz verschlossen. Für einen luftdichten Abschluss sorgte die Präparation des Stopfens mit Vaseline. In den Einsatz des Stopfens war zuvor 1ml Borsäure der Firma Morphisto, Frankfurt am Main, mit Tashiro-Indikator gegeben worden. Da nach Zugabe der Kaliumcarbonatlösung das K_2CO_3 sofort $^{15}NH_3$ aus der Probe verdrängt, war hier auf ein schnelles Einsetzen und akurates Verschließen zu achten, um keine verfälschten Werte des schnell flüchtigen $^{15}NH_3$ zu erhalten. Das $^{15}NH_3$ verband sich mit Borsäure zu ^{15}N-Ammoniumborat. Die im Herstellerzustand rosafarbene Indikatorlösung wurde zunehmend farblos und zeigte somit einen pH-Wert im alkalischen Bereich an. Eine Inkubationszeit von 24h wurde eingehalten, da dieser Vorgang einige Stunden benötigte.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das im Stopfeneinsatz befindliche ^{15}N-

Ammoniumborat in eine Abdampfschale überführt und solange mit 0,1 molarer HCl an einer Bürette titriert bis der Indikator in einem sauren pH-Wertebereich lag und folglich zur Farbe Rosa umschlug. Der gemessene Wert, an welchem der Farbumschlag erfolgte, wurde in einem Titrationsprotokoll notiert und es wurden 0,5ml 0,1 molarer Salzsäure dazugegeben um ein saures Milieu herzustellen. Die Abdampfschale samt Inhalt wurde auf eine Wärmeplatte gestellt und der Flüssigkeitsanteil bei 50°C zum Verdampfen gebracht. Da dieser Vorgang einige Stunden Zeit in Anspruch nahm, wurden die Proben erst am darauffolgenden Tag weiter bearbeitet.

Das rückständige festförmige ^{15}N-Ammoniumborat musste am Folgetag in der Abdampfschale mit Aquadest resuspendiert werden. Dabei wurde die Menge des benötigten Aquadest mit der folgenden Formel berechnet:

Aquadest in ml = Titrationswert x 1,4 (7)

Der verwendete Multiplikationsfaktor 1,4 ergab sich hierbei aus dem Titrationsfaktor der Salzsäure bzw. dem Molekulargewicht von Stickstoff.

Außer der berechneten Menge Aquadest wurde je ein Tropfen 0,1 molarer Salzsäure hinzugefügt um erneut ein saures Milieu zu schaffen und das Sediment vollständig in Lösung zu bringen. Von dieser Suspension wurden 100µl auf Zinnplättchen pipettiert und auf der Wärmeplatte getrocknet. Nach Überführung in einen festen Aggregatzustand wurden die Zinnplättchen zu Kugeln gerollt und aufbewahrt bis sie nach Gabe in den SL ™ und das Tracer Mass 20-20 ™ analysiert und gemessen wurden. Nährere Informationen hierzu fanden sich in den Kapiteln 3.4, 3.5 und 3.6 dieser Dissertation.

Die N-Konzentration bzw. ^{15}N-Häufigkeit wurde gemessen und die KPE des $^{15}NH_3$ über 24h berechnet.

3.10.3 Fäkale ^{15}N- Exkretion

Für die Stuhlproben wurde in Anbetracht des sehr individuellen Defäkationsverhalten des einzelnen Menschen eine Sammelperiode von 72h post-Tracereinnahme vereinbart. Jeder Stuhl wurde separat in einem etwa 6g schwerem Kordelzugbeutel aus Plastik aufgefangen und auf einer handelsüblichen Küchenwaage abgewogen. Das Stuhlvolumen wurde im dafür ausgehändigten Stuhlprotokoll notiert. Nach Homogenisierung der Fäzes durch manuelles Kneten des Beutels wurde eine haselnussgroße Portion mit Hilfe eines kleinen Löffels, der Teil des im Klinikalltag gängigen Stuhlprobenröhrchens ist, gewonnen. Der Rest des Stuhlvolumens wurde über die Toilette verworfen, der Plastikbeutel wurde im Hausmüll entsorgt. Die archivierte Stuhlprobe wurde beschriftet und ebenfalls bei - 20°C bis zur Weiterbearbeitung tiefgefroren.

Die Stuhlproben wurden am Vorabend der Weiterbearbeitung für den Auftauprozess über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Nach dem Auftauen wurden pro Probe je ca. 6-8mg Stuhl in doppelter Ausführung auf zwei Zinnplättchen des Durchmessers 28mm eingewogen (MC1AC210 P, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Diese Proben wurden ebenfalls auf einer Wärmeplatte bzw. unter einer Wärmelampe getrocknet und zu Kügelchen gerollt. Nach Applikation in die Messinstrumente Elementaranalysator und Massenspektrometer wurden die Proben analysiert und erneut die N-Konzentration bzw ^{15}N-Häufigkeit gemessen. Somit konnte die KPE des ^{15}N über 72h berechnet werden.

3.10.4 ^{15}N-Häufigkeit im Fibrinogen, im proteinfreiem Überstand und im Sediment des Blutplasmas

An den Tagen der Tracereinnahme wurde jedem Teilnehmer eine Blutprobe vor Tracereinnahme (gegen 7:45 Uhr) und eine weitere Probe sechs Stunden nach Tracereinnahme (gegen 14:00 Uhr) abgenommen. Bei jedem Teilnehmer wurden somit insgesamt acht Blutentnahmen durchgeführt.

Nach sorgfältiger Desinfektion des Hautareals wurde per Flügelkanüle eine venöse Blutprobe in die S-Monovette® 10ml, Citrat 3,2% (1:10), 92x16mm, grün der Firma Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland entnommen. Im direkten Anschluss wurde die Monovette samt Probe bei 6000U/min für 10min in

der Zentrifuge der Firma HERMLE Z 300, Wehingen, Deutschland zentrifugiert. Das überstehende Blutplasma wurde mit einer Pipette abgenommen und folglich ohne Sediment in ein separates Röhrchen gegeben, welches sorgfältig beschriftet und anschließend bei -20°C tiefgefroren wurde und so bis zur Weiterbearbeitung gelagert wurde.

Vor dem Fraktionieren des Citratplasmas mussten drei Lösungen bereitgestellt werden: Eine Calcium-Chlorid-Lösung, wozu man 1,23g Calcium-Chlorid-Hexahydrat in 250ml Aquadest löste, eine Natrium-Wolframat-Lösung, wozu man 10g Natriumwolframat zu 100ml Aquadest hinzufügte und eine apothekenfertige 1,5 molare Schwefelsäure-Lösung. Eine physiologische Kochsalz-Lösung wurde zusätzlich bereitgestellt. Es schlossen sich drei Phasen zum Fraktionieren des Citratplasmas an: Die erste Phase hatte das Ziel das Fibrinogen zu separieren. Hierzu wurde das Wasserbad auf 37°C erwärmt. Für die zu bearbeitenden Proben wurden Spitzröhrchen beschriftet und mit der Multipette 50ml-Combitip mit Adapter wurden je 2,5ml Natriumchlorid-Lösung, 2,5ml Calciumchlorid-Lösung und 3ml Citratplasma vorpipettiert. Dieser Ansatz wurde im Wasserbad für 1h inkubiert. Danach wurde er für 10min in die Tiefkühltruhe gestellt. Zum Verdichten des Fibrinogens wurde das Konglomerat mit Ösen von der Gefäßwand gelöst und das Röhrchen für 10min mit 5000 U/min zentrifugiert.

Mit den Ösen wurde das Fibrinogenkonglomerat nochmals verdichet und anschließend im einem kleinen Plastikgefäß aufgefangen. Der Rest des Plasmas wurde zurückgegossen. Der abgetropfte Fibrinogenpfropfen wurde in ein Eppendorf-Hütchen separiert und mit maximaler Umdrehungszahl für 10 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Plama-Überstand dem Restplasma im Spitzröhrchen hinzugefügt. Das Fibrinogen-Sediment wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß zweimalig mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Das übrig gebliebene linsenförmige Fibrinogenkonglomerat wurde auf Zellstoff von den NaCl-Resten befreit und in zwei etwa gleich große Einzelproben von etwa 0,01g Gewicht aufgeteilt. Diese Proben wurden auf Zinnplättchen des Durchmessers 21mm aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurden auch diese Proben, entsprechend den übrigen Proben, gerollt und im Dual-Mode im Massenspektrometer gemessen.

In der zweiten Phase ging es darum Sediment bzw. Albumine und Globuline, sowie Überstand bzw. die proteinfreie Fraktion zu gewinnen.

Es wurden 0,5ml der Natriumwolframat-Lösung mit 4ml des Restplasma-Gemisches vermengt und eine 1,5 molare Schwefelsäurelösung tröpfchenweise dazu pipettiert, wodurch Proteine ausgefällt wurden. Nach der Fällung sollte das Gemisch für ca. 5min ruhen, bevor es anschließend über 10min bei 4000U/min zentrifugiert wurde.

Danach konnte der proteinfreie Überstand aufgefangen werden und anschließend auf Zinnplättchen getrocknet werden. Nach der Trocknung wurden die Zinnplättchen erneut zu Kügelchen gerollt und im SL™ und dem Tracer mass 20-20™ analysiert. Es wurden die N-Konzentration bzw. die ^{15}N-Häufigkeit gemessen.

Die dritte Phase diente der Separation des Sediments. Das in den vorhergehenden Phasen übrig gebliebene Sediment wurde zweimalig mit Aquadest gewaschen und anschließend auf den Zinnplättchen getocknet. Auch diese Plättchen wurden nach Trocknung des Sediments zu kleinen Kügelchen gerollt und entsprechend den vorherigen Konzentrationen und Häufigkeiten analysiert.

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der vier Versuchsreihen LP ohne Induktion, LP mit Induktion, SP ohne Induktion, SP mit Induktion wurden ermittelt. Eine Testung auf siginifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2, die die Phasen in unterschiedlicher Reihenfolge durchliefen, fiel negativ aus, sodass auf eine getrennte Darstellung der Ergebnisse der getesteten Parameter verzichtet wurde. Zur Ermittlung der Parameter renale ^{15}N-Exkretion, renale $^{15}NH_3$-Exkretion sowie renale Gesamt-N-Exkretion lagen in allen vier Phasen Werte aller 23 Probanden vor. Lediglich in der Phase LP mit Induktion des Parameters fäkale ^{15}N-Exkretion lagen nur 22 Werte vor, da ein Proband für diese Phase keine Stuhlproben abgeben konnte.

4.1 Renale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion

Die Ergebnisse der renalen ^{15}N-Exkretion der vier verschiedenen Phasen der Studie sind in der Tabelle 7 ersichtlich. In Tabelle 8 finden sich die Ergebnisse des Signifikanztests. Die berechneten Mittelwerte sind als grafische Übersicht in Abbildung 5 ersichtlich.

Tabelle 7: Ergebnisse der renalen ^{15}N-Exkretion

Probanden	LP ohne Ind.	LP mit Ind.	SP ohne Ind.	SP mit Ind.
1	42,00	38,81	28,05	49,79
2	34,80	48,00	39,25	34,30
3	52,06	60,89	56,21	45,71
4	58,10	42,40	49,00	61,33
5	34,59	45,57	22,21	50,64
6	35,90	38,41	37,95	32,40
7	33,04	45,87	28,14	20,35
8	36,03	29,38	31,74	41,18
9	35,17	40,00	35,85	40,53
10	23,17	40,29	21,04	21,55
11	34,24	45,05	29,45	43,29
12	35,65	40,64	25,66	29,97
13	40,56	33,90	34,41	34,42
14	33,50	19,08	26,70	31,39
15	69,22	53,12	44,27	33,53
16	54,06	27,29	32,04	28,71
17	33,50	39,66	20,05	30,99
18	47,66	50,28	24,05	39,74
19	29,82	22,20	28,39	18,09
20	37,54	33,61	22,24	19,43
21	29,18	29,16	25,55	18,98
22	41,67	45,91	27,10	21,17
23	37,91	29,08	31,45	21,43
MW	**39,54**	**39,07**	**31,34**	**33,43**
SD	**10,44**	**10,09**	**9,11**	**11,74**
Min	23,17	19,08	20,05	18,09
Max	69,22	60,89	56,21	61,33

Tabelle 8: Signifikanztest im paarweisen Vergleich

Vergleich	p
LP ohne Induktion vs. LP mit Induktion	0,767
LP ohne Induktion vs. SP ohne Induktion	0,002
LP ohne Induktion vs. SP mit Induktion	0,049
LP mit Induktion vs. SP ohne Induktion	0,006
LP mit Induktion vs. SP mit Induktion	0,093
SP ohne Induktion vs. SP mit Induktion	0,560

Eine graphische Übersicht zeigt Abbildung 5:

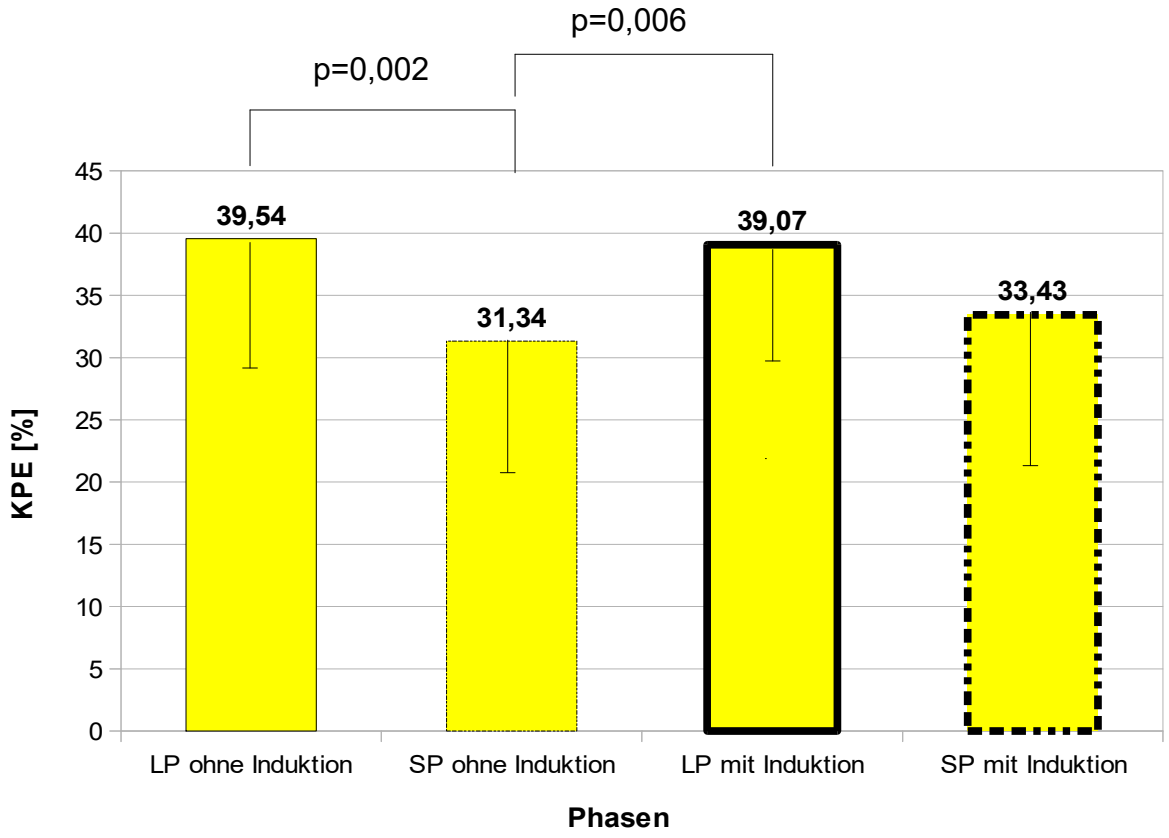

Abbildung 5: Renale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion in den Leer- und Stärkephasen mit und ohne Induktion

Die KPE [%] des ^{15}N-Isotops des Stickstoffs über 48h beträgt

für die LP ohne Ind. 39,54 ± 10,44%,

für die LP mit Ind. 39,07 ± 10,09%,

für die SP ohne Ind. 31,34 ± 9,11% und

für die SP mit Ind. 33,43 ± 11,74%.

Der Mann-Whitney-U-Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen LP ohne Induktion und SP ohne Induktion mit p = 0,002 und zwischen LP mit Induktion und SP ohne Induktion mit p = 0,006. Für die restlichen Vergleiche jedoch, insbesondere nicht für die relevanten Vergleiche von LP ohne Induktion mit LP mit Induktion bzw. SP ohne Induktion mit SP mit Induktion, ergaben sich keine Signifikanzen.

4.2 Renale Gesamt-N-Exkretion in Gramm

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Endwerte der renalen Gesamtstickstoff-Exkretion innerhalb 48h in der Maßeinheit Gramm. In Abbildung 6 findet sich die zugehörige graphische Übersicht.

Tabelle 9 : Endergebnisse der renalen Gesamtstickstoff-Exkretion

Probanden	LP ohne Ind.	LP mit Ind.	SP ohne Ind.	SP mit Ind.
1	13,78	14,49	19,48	14,53
2	20,23	26,52	21,45	18,87
3	22,31	30,45	17,35	30,54
4	32,30	17,88	38,33	36,75
5	14,50	17,62	7,94	14,72
6	18,53	18,79	25,09	18,92
7	15,64	11,34	13,27	11,16
8	21,28	23,88	27,56	21,61
9	12,26	11,35	10,50	15,15
10	12,57	19,54	14,85	16,47
11	13,73	23,31	14,95	23,08
12	19,62	18,21	20,52	20,92
13	19,74	30,35	29,34	27,52
14	14,80	8,02	11,10	13,60
15	36,35	28,34	25,83	18,95
16	18,53	12,10	18,06	14,63
17	21,53	21,58	19,69	20,84
18	22,56	27,41	18,15	22,73
19	12,22	7,68	12,45	13,12
20	19,69	22,30	18,24	16,15
21	12,44	9,27	9,81	12,43
22	20,11	21,66	22,94	13,85
23	15,88	18,01	14,24	13,50
MW	**18,72**	**19,13**	**18,75**	**18,70**
SD	**6,05**	**6,99**	**7,20**	**6,31**
Min	12,22	7,68	7,94	11,16
Max	36,35	30,45	38,33	36,75

In allen paarweisen Vergleichen fiel eine Testung auf signifikante Differenzen negativ aus.

Eine graphische Übersicht zeigt Abbildung 6:

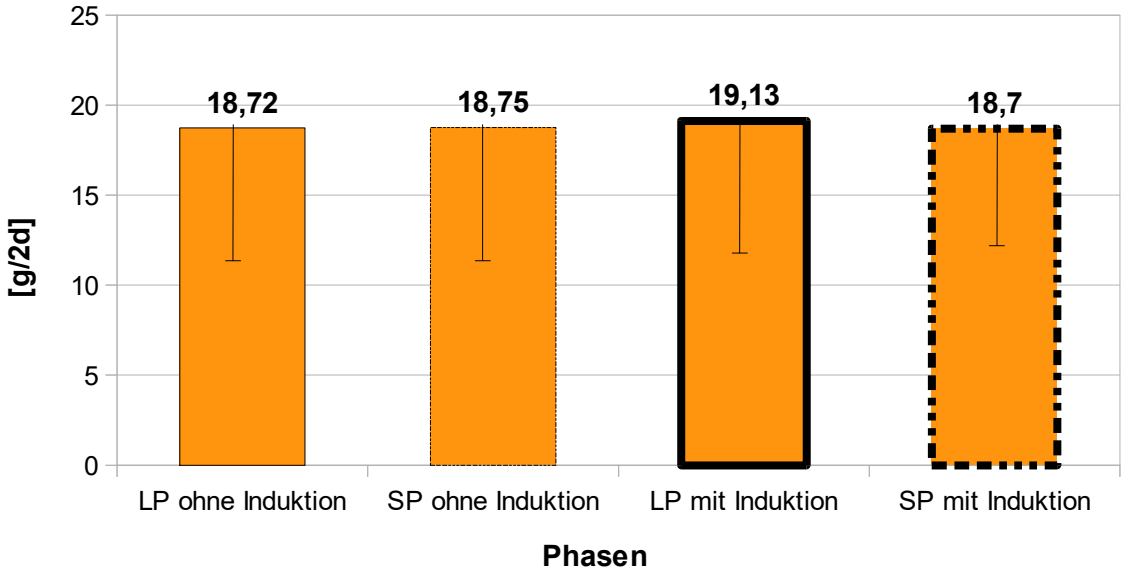

Abbildung 6: Renale Gesamtstickstoffexkretion in g/2d in den Leer- und Stärkephasen mit und ohne Induktion

4.3 Renale kumulative prozentuale $^{15}NH_3$-Exkretion über 24h

Eine detaillierte tabellarische Übersicht über die Endwerte der kumulativen prozentualen Exkretion des $^{15}NH_3$ über 24h nach Tracereinnahme ist nachfolgend in Tabelle 10 dargestellt:

Tabelle 10: Ergebnisse der prozentualen renalen ^{15}N-Ammoniakexkretion

Probanden	LP ohne Ind.	LP mit Ind.	SP ohne Ind.	SP mit Ind.
1	0,14	0,31	0,03	0,23
2	0,02	0,04	0,02	0,09
3	0,03	0,06	0,03	0,04
4	0,07	0,11	0,07	0,11
5	0,01	0,16	0,02	0,04
6	0,06	0,06	0,05	0,05
7	0,11	0,08	0,11	0,09
8	0,08	0,07	0,06	0,05
9	0,07	0,21	0,08	0,11
10	0,12	0,11	0,04	0,05
11	0,05	0,08	0,05	0,04
12	0,16	0,19	0,05	0,08
13	0,10	0,07	0,08	0,07
14	0,09	0,05	0,05	0,08
15	0,08	0,15	0,05	0,12
16	0,32	0,13	0,05	0,05
17	0,03	0,09	0,02	0,03
18	0,11	0,07	0,04	0,24
19	0,16	0,28	0,11	0,08
20	0,09	0,15	0,07	0,07
21	0,13	0,10	0,07	0,01
22	0,13	0,05	0,04	0,04
23	0,13	0,05	0,09	0,04
MW	**0,10**	**0,12**	**0,06**	**0,08**
SD	**0,06**	**0,07**	**0,03**	**0,06**
Min	0,01	0,04	0,02	0,01
Max	0,32	0,31	0,11	0,24

Die kumulative prozentuale Exkretion des $^{15}NH_3$ über 24h nach Tracereinnahme gemessen ergibt

für die Leerphase ohne Induktion 0,10 ± 0,06 %,

für die Leerphase mit Induktion 0,12 ± 0,07 %,

für die Stärkephase ohne Induktion 0,06 ± 0,03 %, und

für die Stärkephase mit Induktion 0,08 ± 0,06 %.

Tabelle 11: Signifikanztest der Phasen im paarweisen Vergleich

Vergleich	p
LP ohne Ind. vs. LP mit Ind.	0,644
LP ohne Ind. vs. SP ohne Ind.	0,004
LP ohne Ind. vs. SP mit Ind.	0,110
LP mit Ind. vs. SP ohne Ind.	0,001
LP mit Ind. vs. SP mit Ind.	0,029
SP ohne Ind. vs. SP mit Ind.	0,183

Beim Vergleich der Leerphase ohne Induktion mit der Stärkephase ohne Induktion konnte ein signifikanter Unterschied von p=0,004 festgestellt werden. Der paarweise Vergleich der Leerphase ohne Induktion mit den anderen Phasen lieferte keine Signifikanz. Auch der jeweilige Vergleich der Phasen ohne Induktion mit der jeweiligen Phase mit Induktion lieferte keinen signifikanten Unterschied.

Es war lediglich zu beobachten, dass die KPE der Phasen mit Induktion leicht höher lag als in der jeweils zuzuordnenden Phase ohne Induktion und das ebenfalls der Vergleich von LP mit Induktion und SP ohne Induktion eine Signifikanz lieferte.

Die nachfolgende graphische Abbildung (Abb. 7) zeigt die Mittelwerte der $^{15}NH_3$-KPE:

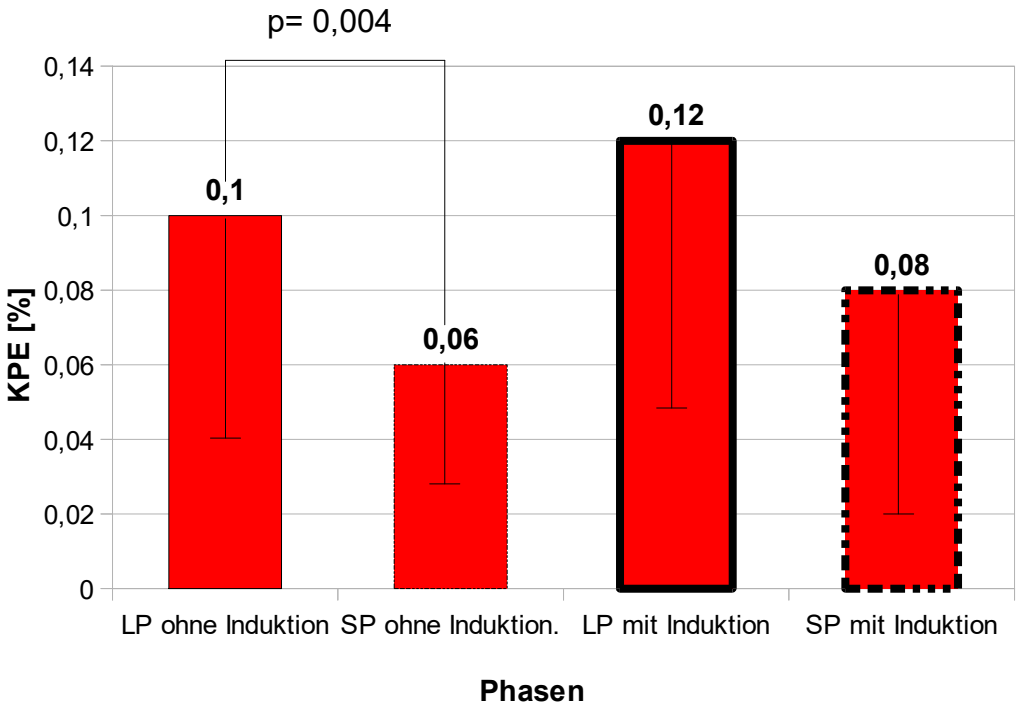

Abbildung 7: Renale kumulative prozentuale $^{15}NH_3$-Exkretion in den Leer- und Stärkephasen mit und ohne Induktion

4.4 Fäkale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion

Tabelle 12 zeigt in detaillierter Übersicht die Endwerte der fäkalen ^{15}N-Exkretionen, die einer erheblichen interindividuellen Variabilität unterliegen. Abbildung 8 zeigt eine grafische Übersicht über die errechneten Mittelwerte der fäkalen ^{15}N-Exkretionen.

Tabelle 12: Ergebnisse der fäkalen ^{15}N-Exkretion

Probanden	LP ohne Ind.	LP mit Ind.	SP ohne Ind.	SP mit Ind.
1	21,26	17,33	87,06	11,9
2	27,34	1,37	7,73	6,08
3	13,33	4,29	11,36	5,44
4	11,16	-	0,00	0,00
5	75,82	9,47	13,82	5,69
6	0,03	0,07	18,88	3,09
7	6,72	9,17	8,94	73,99
8	2,48	0,00	33,29	5,18
9	11,75	13,56	27,76	55,09
10	32,09	24,08	0,60	34,62
11	23,16	16,42	31,91	16,22
12	26,82	25,42	11,28	72,49
13	61,93	18,81	64,50	41,69
14	0,05	0,00	0,05	5,54
15	0,00	11,61	44,82	40,29
16	2,39	5,64	4,47	17,43
17	27,66	35,24	69,78	8,90
18	24,21	23,76	41,24	19,10
19	6,18	17,04	44,25	40,78
20	29,36	44,47	34,50	46,88
21	41,17	36,07	53,33	49,73
22	24,56	17,41	48,15	12,46
23	14,70	8,88	22,20	7,55
MW	**21,05**	**15,46**	**29,56**	**25,22**
SD	**19,24**	**12,33**	**24,10**	**22,92**
Min	0,00	0,00	0,00	0,00
Max	75,82	44,47	87,06	73,99

Die KPE des ^{15}N im über 72h gesammelten Stuhl ergibt Endwerte

von 21,05 ± 19,24% für die LP ohne Induktion,

von 15,46 ± 12,33% für die LP mit Induktion,

von 29,56 ± 24,20% für die SP ohne Induktion,

von 25,22 ± 22,92% für die SP mit Induktion.

Der Signifikanztest ließ keine signifikanten Differenzen erkennen.

Es zeichnet sich lediglich eine geringe Zunahme der KPE in den Phasen der Stärkeeinnahme (SP ohne Induktion, SP mit Induktion) gegenüber den Leerphasen ab. Des Weitereren ist zu beobachten, dass in den Phasen der Induktion (LP mit Induktion, SP mit Induktion) im Vergleich mit den jeweiligen Phasen ohne Induktion (LP ohne Induktion, SP ohne Induktion) die KPE leicht absank.

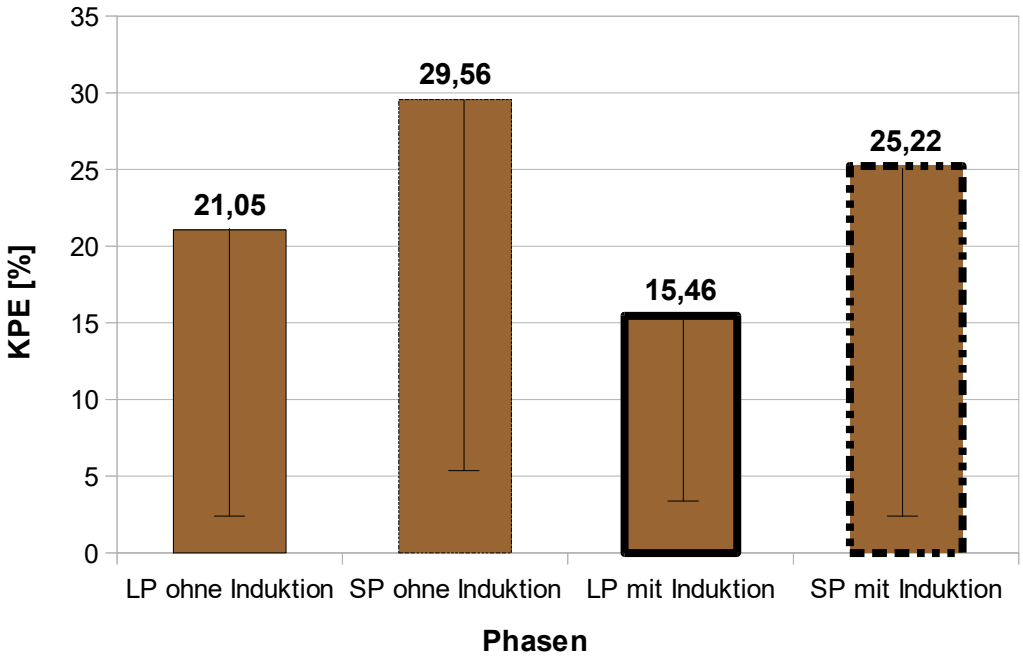

Abbildung 8: Fäkale kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion in den Leer- und Stärkephasen ohne und mit Induktion

4.5 Kumulative prozentuale ^{15}N-Exkretion im Stuhl und Urin

Addiert man die KPE des Stuhls über 72h und die KPE des Urins über 48h ergibt sich die Gesamt-^{15}N-Exkretion. Die ermittelten Mittelwerte der Gesamt ^{15}N-Exkretion betragen für die Phasen

LP ohne Induktion 60,59 ± 18,94%

LP mit Induktion 54,53 ± 15,72%

SP ohne Induktion 60,90 ± 23,60%

SP mit Induktion 58,65 ± 20,05%.

Sie sind in der folgenden Abbildung (Abb. 9) graphisch dargestellt:

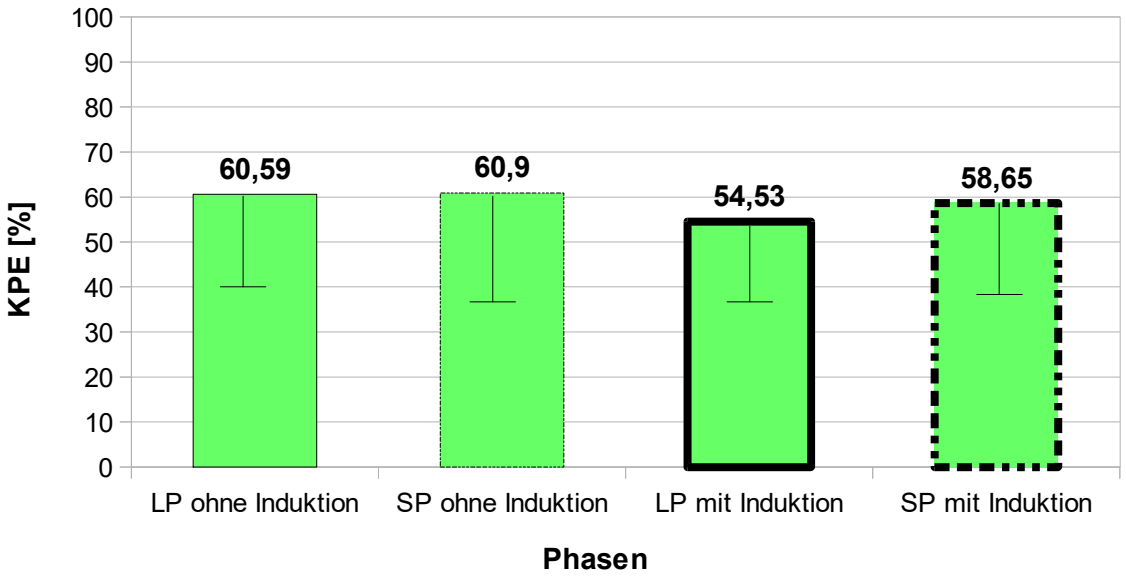

Abbildung 9: Gesamt ^{15}N-Exkretion

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ist nicht erkennbar.

4.6 ^{15}N-Häufigkeit im Fibrinogen, im proteinfreien Überstand und im Sediment des Blutplasmas

Der Überschuss an markiertem Stickstoff im schwefelsäurelöslichen Überstand des Blutplasmas im Vergleich zum Leerwert der entsprechenden Phase beträgt

für die LP ohne Induktion 0,0317 ± 0,0085 At-%-exz,

für die SP ohne Induktion 0,0303 ± 0,0118 At-%-exz,

für die LP mit Induktion 0,0405 ± 0,0193 At-%-exz,

für die SP mit Induktion 0,0376 ± 0,0187 At-%-exz.

Die nachfolgende Tabelle (Tab.13) listet die Endwerte auf:

Tabelle 13: Ergebnisse der ^{15}N-Häufigkeit in Atomprozent-Exzess im proteinfreien Überstand

Probanden	LP ohne Ind.	LP mit Ind.	SP ohne Ind.	SP mit Ind.
1	Wert nicht messbar	0,0428	0,0258	0,0951
2	0,0322	0,0473	0,0480	0,0387
3	0,0425	0,0521	0,0620	0,0367
4	0,0540	0,0791	0,0385	0,0422
5	0,0283	0,0736	0,0572	0,0483
6	0,0289	0,0140	0,0234	0,0206
7	0,0291	0,0723	0,0400	0,0438
8	0,0291	0,0279	0,0207	0,0409
9	0,0398	0,0639	0,0314	0,0656
10	0,0215	0,0225	0,0233	0,0254
11	0,0387	0,0330	0,0362	0,0348
12	0,0239	0,0192	0,0217	0,0434
13	0,0403	0,0244	0,0239	0,0155
14	0,0164	0,0332	0,0293	0,0281
15	0,0338	0,0654	0,0294	0,0333
16	0,0287	0,0230	0,0217	0,0203
17	0,0353	0,0225	0,0192	0,0349
18	0,0262	0,0501	0,0259	0,0683
19	0,0240	0,0387	0,0318	0,0227
20	0,0361	0,0264	0,0247	0,0417
21	0,0271	0,0418	0,0218	0,0212
22	0,0387	0,0370	0,0199	0,0281
23	0,0234	0,0223	0,0213	0,0159
MW	**0,0317**	**0,0405**	**0,0303**	**0,0376**
STD	**0,0085**	**0,0193**	**0,0118**	**0,0187**
Min.	0,0164	0,0140	0,0192	0,0155
Max.	0,0540	0,0791	0,0620	0,0951

Im paarweisen Vergleich zwischen den Phasen zeigten sich keine signifikanten Differenzen.

Analog zu Vorgängerstudien ist weder im Fibrinogen, noch im Sediment ^{15}N relevant nachzuweisen. Auf eine tabellarische Übersicht der hier ermittelten Endwerte wurde daher verzichtet.

Eine graphische Übersicht der Mittelwerte ist in Abbildung 10 zu sehen:

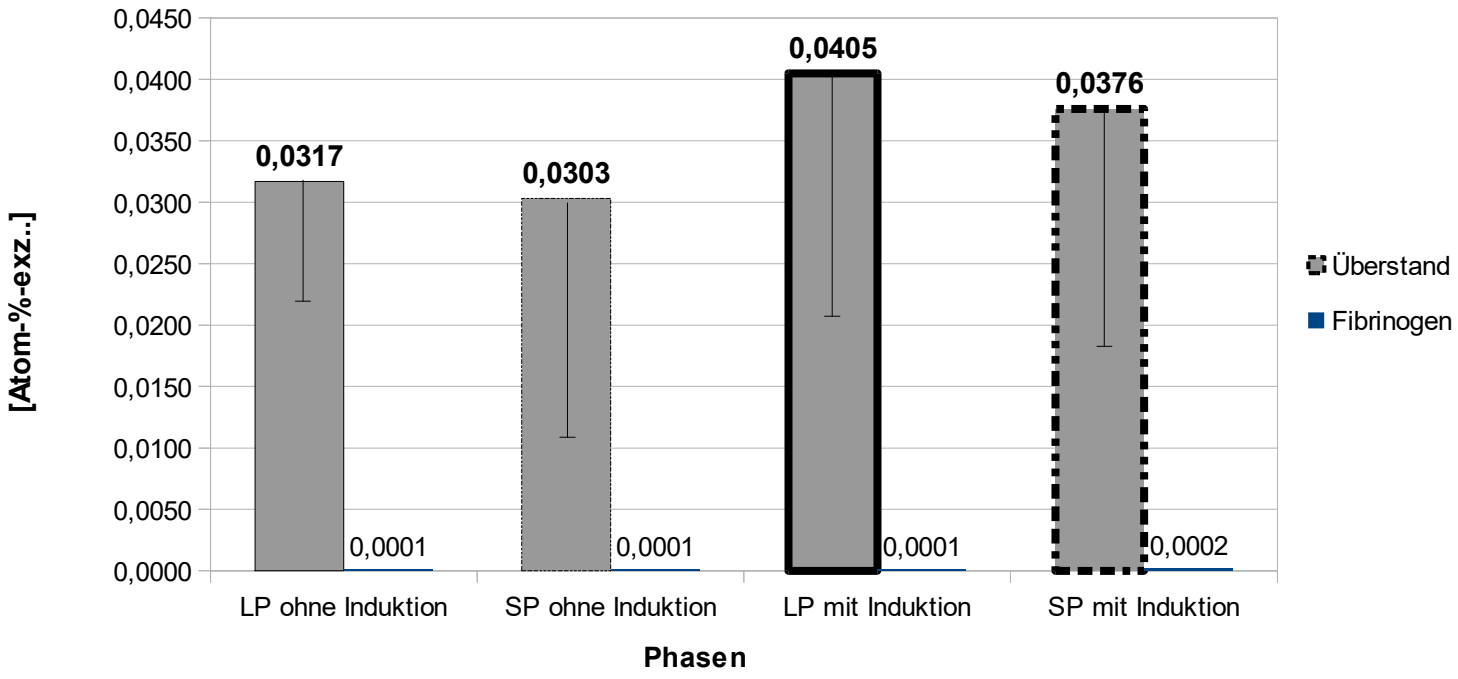

Abbildung 10: ^{15}N-Häufigkeit im Fibrinogen, im Überstand und im Sediment des Blutplasmas in Atom-%-Exzess in den Leer- und Stärkephasen ohne und mit Induktion

5 Diskussion

In den Vorgängerstudien von Wutzke et al. [36-38], die sich im Kapitel 1.1.3 gelistet finden, wurden bereits einschlägige Ergebnisse erzielt. So konnte 2010 für die Präbiotika KFS und MES aufgezeigt werden, dass die Bildung von Ammoniak im Kolon unter ihrer Supplementation reduziert wird und damit einhergehend die renale Stickstoffexkretion sinkt. [36] Ferner konnte festgestellt werden, dass ^{15}N-LU in jener Studie, wie bereits mehrfach in Studien postuliert, als potenter Biomarker dient, um eine bekannte Dosis an ^{15}N in Form von $^{15}NH_3$ in das Kolon zu transportieren, um dort den Ammonikametabolismus zu erforschen. [36,67,70,71,72] Des Weiteren konnte unter Betrachtung der verschiedenen Urinfraktionen dargestellt werden, dass der Hauptanteil des ^{15}N zwischen 6h und 24h ausgeschieden wird [72] und dass der Anteil in der 0-6h-Fraktion auf die Glucose-[$^{15}N_2$]ureidabsorption im Dünndarm zurückzuführen ist [56].

2013 wurde unter synbiotischer Gabe von Pro- und Präbiotikum untersucht, ob dieses metabolische Zusammenspiel eine gesteigerte saccharolytische Aktivität und umgekehrt eine verringerte proteolytische Aktivität der kolonalen Miktobiota, sprich einen stärkeren detoxifizierenden Effekt, einhergehend mit einem größeren gesundheitlichen Benefit für den Wirt zur Folge habe, was bejaht werden konnte. Außerdem zog man in dieser Studie erstmals die kumulative prozentuale Ammoniakexkretion als Parameter der Entgiftungsleistung heran. [37]

2015 setzte man in der Fragestellung nach der Entgiftungsleistung des Kolons bei der Auswahl der Präbiotika das Augenmerk auf den Ballaststoffgehalt der RS. [38] Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei Gabe ballaststoffreicher resistenter Stärken die Stickstoffbildung im Kolon reduziert wird [38,69]

Zur Wirkung der Supplementation von Prä- und Probiotika sowohl auf ihren positiven Effekt hinsichtlich der Ammoniakdetoxifikation als auch den positiven Effekt einer Induktion auf die Genauigkeit der Bestimmung der OZTZ wurden [56,60,62] ebenfalls repräsentative Studien durchgeführt und valide Ergebnisse erzielt. Nun galt es in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Studie bestehende Ergebnisse weiter zu validieren und herauszuarbeiten, inwieweit ein Einfluss der Enzyminduktion auf den Ammoniakstoffwechsel unter Gabe von resistenter Stärke besteht. Es galt die Studie von de Preter et al. aus dem Jahre 2006 zu verifizieren bzw. zu widerlegen. Diese hatte gezeigt, dass eine Indukti-

on mit unmarkiertem LU nicht erforderlich ist. [68]

Neben der Notwendigkeit der Induktion für eine präzisere Bestimmung der OZTZ mit [^{13}C]-Lactoseureid hatten Wutzke et al. 1997 zusätzlich auch eine Verschiebung des Maximums der ^{15}N-Anhäufung des renal ausgeschiedenen Ammoniaks und Harnstoffs bei vorausgehender Induktion beobachtet, [60] was von de Preter et al. ebenfalls nicht verifiziert werden konnte. [68]

Wenn man das bisher Erwähnte zusammenfasst, finden sich in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur bereits Studien, die den Effekt von RS auf die Ammoniakentgiftung [36-38], sowie auch die Möglichkeit der Enzyminduktion des Kolonmetabolismus untersuchen. [68] Die Kombination von Präbiotikasupplementation und Enzyminduktion hinsichtlich ihres Effekts im Kolon stellte jedoch ein Novum dar.

Die vorliegende Studie erstreckte sich über einen Zeitraum von 75 Tagen. Somit stellte es eine Herausforderung dar, Probanden zu finden, die den im Kapitel 3.7 beschriebenen Kriterien entsprachen und den Studienablauf über diesen Zeitraum hinweg in ihren Alltag integrieren konnten. Da die vier Phasen als unabhängige Stichproben bewertet werden mussten, ergab sich dieser relativ lange Zeitraum. Sowohl unter regulärer individueller Diät als auch unter zusätzlicher Supplementation von RS wurde die Ammoniakdetoxifikation mit und ohne Induktion durch LU untersucht. Die Ammoniakdetoxifikation geschieht wie bereits erwähnt in einem Ablauf an Reaktionsfolgen, der sich Harnstoffzyklus nennt. In seinem Verlauf geschieht folgendes: Die Carbamylphosphat-Synthetase synthetisiert in den Mitochondrien der Hepatozyten die Bildung von Carbamylphosphat aus Ammoniak und Bicarbonat unter Verbrauch von zwei Molekülen Adenosintriphosphat.

Die Carbamyl-Gruppe wird dann unter Freisetzung von Phosphat auf Ornithin übertragen. Beteiligt ist an dieser Reaktion, die ebenfalls im Mitochondrium stattfindet, das Enzym Ornithin-Transcarbamylase. Das somit entstandene Citrullin wird daraufhin aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert.

Durch Aspartat geschieht die Einschleusung einer weiteren Aminogruppe. Das Enzym Argininosuccinat-Synthetase verbindet Aspartat und Citrullin unter ATP-Verbrauch zu Argininosuccinat. Es werden ein Molekül AMP, ein Molekül Wasser sowie ein Diphophat abgespalten.

Argininosuccinat wird anschließend in Fumarat und Arginin durch die Argininosuccinase gespalten. Aus letzterem wird hydrolytisch Harnstoff abgespalten. Ornithin wird in dieser durch die Arginase bewirkten Reaktion wieder freigesetzt und in die Mitochondrien retransportiert.

Ammoniak wird unter anderem auf diese Weise detoxifiziert, denn der entstehende Harnstoff eignet sich deutlich besser zur Ausscheidung, da er nicht toxisch und ungeladen ist und leichter durch biologische Membranen diffundieren kann. Harnstoff kann über den Urin ausgeschieden werden.

Eine Reaktion, bei welcher in der Leber selbst ein erheblicher Anteil an Ammoniak entsteht, ist die oxidative Desaminierung. Sie ist neben der Transaminierung ein zweiter Weg, wie aus einer Aminosäure eine α-Ketosäure entstehen kann, worunter immer Ammoniak anfällt. Dieser Ammoniak kann erneut im Harnstoffzyklus wie oben beschrieben umgewandelt und ausgeschieden werden.

Ein weitere Möglichkeit der Detoxifizierung bzw. der Umwandlung und des Transports von Ammoniak ist die Rückreaktion der oxidativen Desaminierung, also eine Übertragung auf α-Ketoglutarsäure unter Bildung von Glutamat, katalysiert durch das Enzym Glutamatdehydrogenase und Coenzym NAD+.

Eine dritte Möglichkeit der Detoxifizierung von Ammoniak bildet die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak durch die Glutaminsynthetase unter Verbrauch eines Moleküls ATP. Glutamin ist die Aminosäure mit der höchsten Konzentration im Blut. Da sie ihre Aminogruppe aus der Amidgruppe am gamma-C-Atom leicht wieder abspalten kann, spielt sie im Stoffwechsel eine große Rolle als Aminogruppendonator beispielsweise bei der Biosynthese von Aminozuckern, bei der Purin- und Pyrimidinsynthese, bei der NAD+ Synthese und bei der zytoplasmatischen Carbamoylsynthese. Das in der Niere befindliche Enzym Glutaminase spaltet Glutamin in Glutamat und Ammonium, woraufhin Ammonium (NH_4^+) mit dem Harn ausgeschieden werden kann. [40]

Um optimale Steady-state-Bedingungen bezüglich der Mikrobiota zu erreichen wurde ein Supplementationszeitraum von 15 Tagen für das Stärkegemisch festgelegt, da er sich in vorausgehenden Studien [36-38,68,69,72] als praktikabel erwiesen hatte. Zwischen den Phasen mit und ohne Supplementation bzw. Induktion wurden je fünf Tage Auswaschphase integriert. Diese sollten garantie-

ren, dass die ^{15}N-Markierungen im Körper zwischen den Phasen wieder nahezu auf die natürliche Häufigkeit absinken. Bezüglich der Stärkesupplementation in Gruppe 1 und 2 verglichen wir außerdem, ob sich signifikante Unterschiede bei unterschiedlicher Phasenabfolge ergeben. Wir stellten die Hypothese auf, dass möglicherweise die Stärkesupplementation über die Stärkeeinnahme von 15 Tagen hinaus eine nachfolgende Leerphase in ihren Ergebnissen beeinflussen könne. Studien wie beispielweise von David et al. 2015 zeigen jedoch, dass die intestinale Mikrobiota als hochdynamisches Ökosystem sehr schnell auf sich ändernde Bedingungen wie z.B. die Nährstoffzufuhr reagieren kann. [73]

Entsprechend dieser Studie blieben signifikante Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2, welche die Phasen I- IV (s. Kapitel 3.8) in unterschiedlicher Reihenfolge durchliefen, aus.

Für die Markierungen im Blut schien die Auswaschphase von fünf Tagen zu kurz, stehen die ^{15}N-markierten Aminosäuren doch in ständigem Austausch mit Körperproteinen [40] und die Halbwertszeit dieser ist deutlich länger, als dass durch ein fünftägiges wash-out eine vollständige Clearance der ^{15}N-Markierungen zu erreichen sei. Auf eine Verlängerung der Auswaschphase zu Gunsten des Abbaus der markierten Körperproteine wurde jedoch verzichtet, um den Studienzeitraum im Sinne der Probandencompliance nicht über die 75 Tage hinaus zu verlängern. Das Probandenkollektiv war hinsichtlich des Alters sowie hinsichtlich des Körpegewichts als homogen zu bezeichnen. Alle Probanden nahmen über den gesamten Studiezeitraum hinweg und an allen vier Phasen und Testungen teil.

Als Präbiotikum wurde ein Stärkegemisch aus KFS, MES und MS supplementiert. Das Stärkegemisch wurde als Supplement anstelle der Verabreichung einer einzelnen Sorte Stärke bevorzugt. Es war nachgewiesen worden, dass die verschiedenen Typen RS aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung vor allem an Ballaststoff die Ammoniakentgiftung in unterschiedlichem Maße fördern. [38] Das Stärkegemisch wurde anamnestisch gut vertragen und führte nur in Einzelfällen zu Magen-Darmbeschwerden wie etwa Völlegefühl. Von einer Mehrzahl der Probanden wurde eine vermehrte Flatulenz rückgemeldet. Die Flatulenz führten wir auf das erhöhte Angebot an Ballaststoffen und dessen Einfluss auf die Mikrobiota des Darmes zurück. Von einer Vielzahl der Proban-

den wurde die Einnahme der Stärke, sowohl hinsichtlich einer trockenen, gar staubigen Konsistenz, als auch des schlechten Geschmacks wegen als unangenehm beschrieben.

Die Degradationsprodukte des Laktoseureidabbaus wurden erneut mit Hilfe des Biomarkers ^{15}N-LU gemessen. Einige Vorteile wurden bereits zu Beginn dieser Diskussion erläutert. ^{15}N-LU gilt als besonders geeignet, da nach dem Erreichen des Kolons kaum interindividuelle Unterschiede bei der wie in Kapitel 1.3.3 dargestellten Metabolisierung bestehen. [69] Verschiedene renale ^{15}N-Exkretionsprofile resultieren aus den verschiedenen, individuellen orozökalen Transitzeiten der Studienteilnehmer. [42] Nach oraler Gabe von ^{15}N-LU und dem damit verbundenen Transport von ^{15}N in den Dickdarm wird das ^{15}N-Isotop überwiegend über den Urin als [$^{15}N_2$]-Harnstoff, [^{15}N ^{14}N]Harnstoff und $^{15}NH_3$ wie in vorhergehenden Kapiteln beschrieben, ausgeschieden. Diese Degradationsprodukte wurden im Elementaranalysator zu N_2 verbrannt und massenspektrometrisch auf ihre ^{15}N-Anreicherung gemessen. Ein geringer Anteil von unverdautem ^{15}N-LU, der mit den Fäzes ausgeschieden wird, ist jedoch nicht auszuschließen. [68]

Wie bereits weiter oben beschrieben, kann bereits ein kleiner Teil des aufgenommen ^{15}N-LU, das von den Bürstensaumenzyme im Dünndarm zu Glucose-[$^{15}N_2$]ureid und Galactose gespalten wird [63], als Glucose-[$^{15}N_2$]ureid über die Darmwand resorbiert werden, was schlussendlich zu ^{15}N-Markierungen im Blut und Urin führt. Dies scheint vorallem in der frühen Urinfraktion 0-6h bzw. in der Blutprobe 6h nach Tracereinnahme der Fall zu sein. Diese frühe Fraktion spiegelt die Dünndarmaktivität wider. [65,74,75]

Ziel dieser Studie war jedoch nicht die Zeit des Anstiegs der ^{15}N-Exkretion zu bestimmen, weshalb wir in der Ergebnisdarstellung auf die Darstellung der einzelnen Urinfraktionen verzichteten. Dennoch zeigte sich bei Durchsicht der detaillierten Ergebnistabellen, dass die höchsten Werte der ^{15}N-Exkretion zwischen 6h und 24h nach Tracereinnahme erreicht wurden. Dies geht konform mit Ergebnissen von de Preter et al. 2006 und Morrison et al. 2003, die herausfanden, dass nur diese Fraktion den [$^{15}N_2$]-Harnstoff enthält, der tatsächlich durch die bakterielle Zersetzung der Tracersubstanz entsteht. [68,74] Unterschiede zwischen den Phasen mit Induktion und ohne Induktion waren nicht zu beob-

achten, weder was die Anreicherung des ^{15}N in den Urinfraktionen angeht, noch was die endgültigen Exkretionswerte nach 48h Sammelperiode angeht. Im Unterschied zu de Preter et al. 2006 verlängerten wir die Sammelperiode auf 48h. Obwohl die höchsten Exkretionen zwischen 0-24h erreicht werden, weiß man, dass ein nicht unerheblicher Anteil von bis zu 10% der verabreichten Dosis sich in der 24-48h Fraktion wiederfindet. [77] Dies konnte hier verifiziert werden.

Präbiotika födern die saccharolytische Aktivität guter Darmkeime wie beispielsweise der probiotischen Bifidobakterien sowie Lactobazillen. Im Gegensatz dazu hemmen sie die proteolytische Aktivität pathogener Keime. Eine Supplementation mit RS sollte die Aktivität der apathogenen Darmkeime verstärken.

Clostridium innocuum gehört zu den saccharolytischen Clostridien und zeigt keine Urease-Aktivität. [77,78] Die Enzyminduktion sollte gezielt die Glucoseureid-Hydrolase-Aktivität von *Clostridium inoccum* weiter verstärken.

Als Enzyminduktor wurde unmarkiertes LU eingesetzt, das auch bereits zur Bestimmung der OZTZ mit [^{13}C]-LU für die Induktion gedient hatte, wobei unterschiedliche GU verwendet werden können. [74] Eine Dosis von dreimal 200mg LU hatte sich bereits als ausreichend erwiesen. [62]

Die Ansäuerung des Kolons durch die Fermentation der unverdaubaren RS zu KKFS reduziert die enzymatische Spaltung des ^{15}N-LU und damit die Entstehung von Ammoniak. Außerdem wird weniger Ammoniak über die Darmwand aufgenommen und stattdessen von der gesteigerten bakteriellen Masse inkorporiert und über die Fäzes augeschieden, was sich in einer deutliche Reduktion der Ammoniakproduktion bzw. renalen Ausscheidung und einer Steigerung der fäkalen Exkretion zeigt. Bei der SP mit Induktion wurden Höchstwerte erwartet. Dies zeigte sich jedoch nicht. Ein signifikanter Einfluss der Induktion konnte nicht verifiziert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die renale ^{15} N-Exkretion bei Gabe eines Stärkegemisches im Vergleich mit der LP signifikant sinkt. Die renale Ausscheidung, wie von de Preter et al. 2006 diskutiert, wurde über einen Zeitraum von 48h untersucht und es konnte gezeigt werden, dass aufgrund analoger Ergebnisse in den vorausgehenden Studien [36-38] von einer Validierung der bisher veröffentlichten Ergebnisse zu diesem Thema gesprochen werden kann. Das Resultat der verminderten Ausscheidung von ^{15}N über die Niere ist durch die Reduktion der gesamten Ammoniakproduktion auf-

grund Verdrängung proteolytisch aktiver pathogener Darmkeime sowie ergänzend über eine Erhöhung der Ammoniakausscheidung mit den Fäzes zu erklären. Im Gegensatz zur Studie von De Preter et al. 2006 wurde in der vorliegenden Studie die fäkale ^{15}N-Exkretion untersucht. Für die fäkale ^{15}N-Exkretion ergaben sich keine signifikanten Differenzen. Jedoch zeigten sich in den SP höhere ^{15}N-Exkretionswerte und in den Phasen mit Induktion im Vergleich mit dem entsprechenden ohne Induktion niedrigere ^{15}N-Ekretionswerte.

Das Fehlen von signifikanten Differenzen ist mit Vorgängerstudien kompatibel. Es konnte bisher keine statistische Signifikanz erzielt werden, da die Standardabweichungen der fäkalen Ausscheidungen aufgrund erheblicher interindividueller Variabilität stets zu hoch waren. Dies ist, wie bereits in den vorangehenden Studien erwähnt, auf die Schwierigkeiten beim Auffangen der Stuhlproben bzw. insbesondere auf Schwierigkeiten beim Homogenisieren des Stuhles zurückzuführen. Um eine homogene Masse zu erhalten, müsste man den Stuhl vermutlich per Mixer [69], wie beispielsweise in Vorbereitung auf eine Stuhltransplantation praktiziert, verquirlen, statt ihn, wie hier durchgeführt, in der Plastiktüte verschlossen, manuell zu kneten. Dies war jedoch für die Möglichkeiten des Forschungslabores der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock zu aufwändig und den Probanden nicht zumutbar.

Die gewonnenen Ergebnisse der ^{15}N-Anreicherung im Überstand des Blutplasmas zeigen, dass sich vermutlich Harnstoff und auch freie ^{15}N-Aminosäuren darin befinden, die die Degradation des ^{15}N-LU zu $^{15}NH_3$ erklären und anschließend zu ^{15}N-Harnstoff und ^{15}N-Aminosäuren resynthetisiert werden. Jedoch darf man nicht außer Acht lassen, dass das Blutplasma ebenfalls ^{15}N bereits aus der Absorption von Glucose-[$^{15}N_2$]ureid beinhalten kann, wenn man sich die frühen Anreicherungszeiten bewusst macht. Wutzke et al. 1997 beobachteten schließlich ein Maximum in der ^{15}N-Anreicherung etwa 6h nach Tracereinnahme. [60] Messungen der ^{15}N-Markierung im Sediment, sowie im Fibrinogen blieben auch in der vorliegenden Studie unterhalb der Detektionsgrenze des Massenspektrometers.

Bei der Gesamtbeurteilung der Ergebnisse gilt es stets zu berücksichtigen, dass große inter- wie auch intraindividuelle Unterschiede in der Zusammensetzung und metabolischen Aktivität der intestinalen Mikrobiota bestehen können. [78]

Da es sich hier um eine relativ kleine Studie in einem Forschungslabor handelt, das keinem verifizierten ernährungsmedizinischen Institut wie z.B. dem der Universität Gießen angehört und damit Ernährungsgewohnheiten und Aktivitäten der Probanden nicht uneingeschränkt überwachbar waren, sind mögliche Fehler bei der Studiendurchführung sowie der Ernährung, der Probensammlung und der Probenaufbewahrung durch die Probanden nicht auszuschließen. Größere Fehler konnten durch genaue Information und Instruktion der Probanden . sowie die sofortige Beantwortung von Rückfragen vermieden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Supplementation eines Gemisches aus drei verschiedenen Stärken mit unterschiedlichem Gehalt an RS sowie an Ballaststoffen eine gesteigerte Detoxifikation des Dickdarmes bewirkt. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie konnte dies durch die orale Einnahme und Metabolisierung von ^{15}N-LU, wie bereits in Vorgängerstudien festgestellt, erneut verifiziert werden.Durch die Degradation des Tracers ^{15}N-LU konnten die kumulative prozentuale renale $^{15}NH_3$-Exkretion, die Gesamtstickstoffexkretion, die kumulative prozentuale renale und fäkale ^{15}N-Exkretion und die korrespondierende ^{15}N-Häufigkeit im proteinfreien Überstand des Bluts gemessen werden. Bereits gewonnene Erkenntnisse über den Ammoniakmetabolismus konnten anhand dessen validiert werden. Die Widerlegung der von de Preter et al. 2006 aufgestellten These, dass es für die präzise Messung der Degradationsprodukte von ^{15}N-LU hinsichtlich des Ammoniak- und Stickstoffmetabolismus keine vorausgehende Induktion braucht [68], blieb aus.

Diese Arbeit stellt einen weiteren Mosaikstein im großen Mosaik der Erforschung des Dickdarms, seiner Stoffwechselvorgänge inklusive der Ammoniakentgiftung im Kolon dar. Diese Aspekte sind nach wie vor von großem wissenschaftlichem, ernährungsphysiologischem und nicht zu letzt kommerziellem Interesse, blickt man zurück zur Einleitung und zur Frage nach der Bedeutung von Functional Foods, Super Foods und Nahrungsergänzungsmitteln, sowie, was schlussendlich von größerer Bedeutung ist, hinsichtlich der weiteren Erforschung von Ursache und Therapiemöglichkeiten von Erkrankungen wie beispielweise dem Morbus Crohn, der Colitis ulcerosa, dem Darmkrebs oder der Reduktion des Risikos von Wohlstandskrankheiten wie etwa dem metabolischen Syndrom.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer Enzyminduktion auf den Dickdarmmetabolismus hinsichtlich der Ammoniakentgiftung bei zusätzlicher Supplementation eines Präbiotikums, nämlich eines Gemisches aus verschiedenen Stärken mit beachtlichem Anteil an resistenter Stärke, untersucht.

Die Messungen wurden mit der Tracersubstanz Lactose-[$^{15}N_2$]ureid durchgeführt. Gemessen wurden im Endeffekt die Degradationsprodukte des ^{15}N-LU, ^{15}N-Harnstoff und $^{15}NH_3$.

23 Probanden ernährten sich entsprechend einer regulären, täglichen Diät über einen Zeitraum von 75 Tagen, der sich in vier Phasen gliederte. In diesem mussten sie randomisiert in zwei Gruppen, in den Phasen I und III bzw. II und IV über einen Zeitraum von je 15 Tagen, zu den drei Hauptmahlzeiten am Tage, ein Gemisch aus insgesamt 10g Markerbsenstärke, Kartoffelfaserstärke und Maisstärke(je 3,33g) zu sich nehmen. Die zwei Phasen der Stärkeeinnahme, sowie der regelrechten Diät ohne Stärkeeinnahme, unterschieden sich dadurch, dass in der je zweiten Phase mit oder ohne Stärkeeinnahme, am Vortag der Verabreichung des Biomarkers ^{15}N-LU (markiertes Laktoseureid) dreimal (um 12:00, 16:00 und 20:00 Uhr) mit einer Dosis von 200mg unmarkiertem Laktoseureid induziert wurde.

An den Tagen 13, 33, 53 und 73 der Studie wurde vor dem Frühstück Blut abgenommen. Zusammen mit dem Frühstück wurde ^{15}N-LU verabreicht. Urin und Stuhl wurden danach fraktioniert über einen Zeitraum von 48 bzw. 72h gesammelt. Eine zweite venöse Blutprobe wurde sechs Stunden nach Applikation des ^{15}N-LU abgenommen.

Der kumulative prozentuale ^{15}N-Gehalt der Proben wurde nach Aufarbeitung der Proben durch Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie gemessen. Die kumulative prozentuale renale ^{15}N-Exkretion betreffend, zeigte sich im Vergleich der Leerphase ohne Induktion mit der SP ohne Induktion eine signifikante Absenkung der renalen ^{15}N- Exkretion. Dies ist in Abbildung 5 zu erkennen. Hiermit korrespondierend sank in ebendiesem Vergleich auch die renale $^{15}NH_3$-Exkretion signifikant, was in Abbildung 7 dargestellt ist. Im Vergleich LP mit Induktion mit SP ohne Induktion konnte ebenfalls eine signifikante Absenkung dieser beiden Parameter beobachtet werden.

Die übrigen paarweisen Testungen für die Parameter fäkale ^{15}N-Exkretion, Gesamt-Stickstoff-Exkretion, sowie ^{15}N-Anreicherung im Fibrinogen, im Überstand sowie im Sediment des Blutplasmas und die Gesamt-^{15}N-KPE konnten keine Sigfikanzen nachweisen.

Zusammenfassend ließ sich beobachten, dass die Testungen der SP ohne und mit Induktion zu einer Herabsetzung der kumulativen prozentualen ^{15}N-Urin-Exkretion führten. Die Induktion zeigte hier keinen eindeutigen Trend.

Die Testungen SP ohne und SP mit Induktion zeigten zudem eine Verminderung der $^{15}NH_3$-Exkretion. Die Testungen mit Induktion (LP mit / SP mit Ind.) gingen mit höheren Exkretionswerten einher.

Hinsichtlich der renalen Gesamt-Stickstoff-Exkretion in g pro 48h zeigten sich etwa gleich hohe Exkretionswerte für alle Phasen.

Bei der fäkalen kumulativen prozentualen ^{15}N-Exkretion ließen sich in den beiden Stärkephasen höhere ^{15}N-KPE-Werte feststellen, in den Phasen mit Induktion im Vergleich mit den entsprechenden Phasen ohne Induktion jedoch eine erniedrigte Exkretion.

Beim Nachweis des ^{15}N im Überstand des Blutplasmas ließen sich für die Phasen mit Induktion zu den entsprechenden ohne Induktion höhere Werte nachweisen, für die Phasen mit Stärke im Vergleich zu den entsprechenden ohne Induktion jedoch niedrigere Werte.

Dies zeigt, dass bei der Supplementation des Präbiotikums resistente Stärke die Ammoniakentgiftung im Kolon gesteigert wird. Jedoch zeigt sich auch, dass dies unabhängig von einer vorausgehenden Induktion geschieht.

Im Unterschied zu in einer vorausgehenden Studie für die orozökale Transitzeit mit Lactose-[^{13}C]ureid bewiesenen, signifikanten Steigerung durch Induktion am Vortag, konnte hier nicht signfikant gezeigt werden, dass auch bei der den Ammoniak- und Stickstoffstoffwechsel betreffenden Wirkung von Präbiotika der Induktion am Vortag eine bedeutende Wirkung zukommt. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Ergebnisse einer Studie von de Preter et al. aus dem Jahr 2006.

Auch der Widerlegung von Hypothesen, wie in dieser Studie festgestellt, kommt im großen Mosaik der Forschung als kleines Steinchen eine große Bedeutung zu.

7 Literaturverzeichnis

1. Imaeda H, Hibi T: The burden of diverticular disease and its Complications: West versus east. Inflamm Intest Dis 2018;3:61-68
2. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G: Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology 2012;142:46-54
3. Stepaniuk P, Bernstein CN, Targownik LE, Singh H: Characterization of inflammatory bowel disease in elderly patients: A review of epidemiology, current practices and outcomes of current management strategies. Can J Gastroenterol Hepatol 2015;29:327-333
4. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA: ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. Am J Gastroenterol 2013;108:656-676
5. Biesalski HK, Bischoff SC, Pirlich M, Weimann A (eds.): Ernährungsmedizin. Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer. 5. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 2018
6. Cummings JH, Macfarlane GT: Colonic microflora: nutrition and health. Nutrition 1997;13:476-478
7. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S: Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. J Appl Microbiol 2008;104:305-344
8. Macfarlane GT, Blackett KL, Nakayama T, Steed H, Macfarlane S: The gut microbiota in inflammatory bowel disease. Curr Pharm Des 2009;15:1528-36
9. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F: Gut health and immunity. Eur J Nutr 2004;43:II/118-173
10. Suter PM: Checkliste Ernährung. 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 2005
11. IBH: Umsatz mit Functional Food 1995-2009. Retail Consultants,

Deutschland: Statista, 2018

12. Cummings JH: The effect of dietary fiber on fecal weight and composition. In: Spiller GA, (ed.) CRC handbook of dietary fiber in human nutrition, 3rd edn. Tampa, Florida: CRC Press LLC, 2001:183-252

13. Gilliland SE, Walker DK: Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J Dairy Sci 1990;73:905-911.

14. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL: Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr 2001;73:(2 Suppl)451-455

15. Pao- Ying L, Sing-Chung L, Hui- Pu L, Chun- Kuang S: Germinated brown rice combined with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* inhibits colorectal carcinogenesis in rats. Food Sci Nutr 2018;7:216-224

16. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology 2004;126:520-528

17. Bermudez-Brito M, Rösch C, Schols HA, Faas MM, de Vos P: Resistant starches differentially stimulate Toll-like receptors and attenuate proinflammatory cytokines in dendritic cells by modulation of intestinal epithelial cells. Mol Nutr Food Res 2015;59:1814-1826

18. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW: Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000;30:61-67

19. Gholizadeh Shamasbi S, Dehgan P, Mohammad-Alizadeh Charandabi S, Aliasgarzadeh A, Mirghafourvand M: The effect of resistant dextrin as a prebiotic on metabolic parameters and androgen level in women with polycystic ovarian syndrome: a randomized, triple-blind, controlled, clinical trial. Eur J Nutr 2018;58:629-640

20. Welters CF, Heineman E, Thunnissen BJ, van den Bogaard AE, Soeters

PB, Baeten CG. Effect of dietary inulin supplementation on inflammation of pouch mucosa in patients with an ileal pouch-anal anastomosis. Dis Colon Rectum 2002;45:621-627.

21. Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A: Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. Gut 2005;54:242-249

22. Aslam H,Green J, Jacka FN, Collier F, Berk M, Pasco J, Dawson SL: Fermented foods, the gut and mental health: a mechanistic overview with implications for depression and anxiety. Nutr Neurosci 2018;11:1-13

23. Azpiroz F: Intestinal perception: mechanisms and assessment. Br J Nutr 2005;93:7-12

24. Burokas A, Arboleya S, Moloney RD, Peterson VL, Murphy K, Clarke G: Targeting the microbiota-gut-brain axis: Prebiotics have anxiolytic and antidepressant-like effects and reverse the impact of chronic stress in mice. Biol Psychiatry 2017;82:472-487

25. Smith AP: The concept of well-being: Relevance to nutrition research. Br J Nutr 2005;93:(2 Suppl)1-5

26. Kazemi A, Noorbala A, Ahmad A, Azam K, Mohammad H, Djafarian K: Effect of probiotic and prebiotic vs. Placebo on psychologcal outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. Clin Nutr 2019;38:522-528

27. Schulze J, Sonnenborn U, Ölschläger T, Kruis W: Probiotika-Mikroökologie, Mikrobiologie, Qualität, Sicherheit und gesundheitliche Effekte, 1. Auflage, Stuttgart, Hippokrates Verlag, 2008

28. Gibson GR, Roberfroid MB: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr 1995;125:1401-1412

29. Zaman SA, Sarbini SR: The potential of resistant starch as a prebiotic. Crit Rev Biotechnol 2016;36:578-584

30. Wood BJB: The lactic acid bacteria, 1. Auflage. London, New York:

Elsevier Applied Science, 1992

31. Wang X, Gibson GR: Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J Appl Bacteriol 1993;75:373-380

32. Bischoff SC: Probiotika, Präbiotika und Synbiotika, 1. Auflage, Stuttgart, New York: Thieme, 2009

33. Wutzke KD, Lorenz H: The effect of L-carnitine on fat oxidation, protein turnover and body compostion in slightly obese subjects. Metabolism 2004;53:1002-1006.

34. Wutzke KD, Oetjens I: ^{13}C- and ^{15}N- incorporation of doubly stable isotope labelled *Lactobacillus johnsonii* in humans. Eur J Clin Nutr 2005;59:1167-1172.

35. Wutzke KD, Sattinger V: ^{15}N- excretion of heat-killed *Lactobacillus casei* in humans. Eur J Clin Nutr 2006;60:847-852.

36. Wutzke KD, Lotz M, Zipprich C: The effect of pre- and probiotics on the colonic ammonia metabolism in humans as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide. Eur J Clin Nutr 2010;64:1215-1221

37. Wutzke KD, Scholübbers D: The metabolic effect of resistant starch and yoghurt on the renal and faecal nitrogen and ammonia excretion in humans as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide. Isot Environ Health Stud 2013;49:464-470.

38. Wutzke KD, Tisztl M, Salewski B, Glass A: Dietary fibre- rich resistant starches promote ammonia detoxification in the human colon as measured by lactose-[$^{15}N_2$]ureide. Isot Environ Health Stud 2015;51:488-496.

39. Wutzke KD, Schmidek KV: The effect of resistant starches on fat oxidation in healthy adults as measured by a $^{13}CO_2$-breath test. Isot Environ Health Stud 2017;53:553-562.

40. Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007

41. Leitzmann C, Brehme U, Hahn A, Laube H, Müller C, Michel P:

Ernährung in Prävention und Therapie, 2. Auflage. Stuttgart: Hippokrates, 2003

42. Abel G: Untersuchungen zur Wirkung von Anthocyanen auf die mikrobielle Metabolisierung von Lactose-[^{13}C]-Ureid und Lactose-[$^{15}N_2$]-Ureid im Colon des Menschen. Dissertation, Univ. Gießen: 2014

43. Topping DL, Clifton, PM: Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiol Rev 2001;81:1031-1064

44. Macfarlane GT, Allison C, Gibson GR, Effect of Ph on protease activities in the large-intestine. Lett Appl Microbiol 1988;7:161-164.

45. de Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K: The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: does it affect human health? Mol Nutr Food Res 2011;55:46-57

46. Nofrarías M, Martínez-Puig D, Pujols J, Majó N, Pérez JF: Long-term intake of resistant starch improves colonic mucosal integrity and reduces gut apoptosis and blood immune cells. Nutrition 2007;23:861-870

47. Keenan MJ, Zhou J, Hegsted M, Pelkman C, Durham HA, Coulon DB, Martin RJ: Role of resistant starch in improving gut health, adiposity and insulin resistance. Adv Nutr 2015;6:198-205

48. Croghan M: Resistente Stärke als funktioneller Bestandteil von Lebensmitteln. Ernähr Umschau 2003;2:65-67

49. Englyst HN, Kingman SM, Cummings JH: Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. Eur J Clin Nutr 1992:33-50.

50. Brown IL, McNaught KJ, Moloney E: Hi-maizeTM: new directions in starch technology and nutrition. Food Aust 1995;47:272-275

51. Topping DL, Fukushima M, Bird AR: Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. Proc Nutr Soc 2003;62:171-176

52. Bier DM: The use of stable isotopes in metabolic investigation. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1987;1:817-836

53. Koletzo B, Demmelmair H, Hartl W, Kindemann A, Koletzo S, Sauerwald T, Szitany P: The use of stable isotope technques for nutritional and metabolic research in pediatric. Early Hum Dev 1998;53:77-97

54. Zipprich C: Die Untersuchung des Einflusses von Prä- und Probiotika auf die Ammoniakentgiftung im Kolon mittels des Markers Laktose-[$^{15}N_2$]ureid. Dissertation, Univ. Rostock: 2014

55. Schicha H, Schober O: Nuklearmedizin: Basiswissen und klinische Anwendung, 6. Auflage. Stuttgart, New York: Schattauer, 2007

56. Wutzke KD, Glasenapp B: The use of ^{13}C-labelled glycosyl ureides for evaluation of oro-caecal transit time. Eur J Clin Nutr 2004;58:568-572

57. Schoorl MN: Les uréides (carbamides) des sucres. Recl Trav Chim Pays-Bas Belg 1903;22:31-77.

58. Hoffmann E: Über das physiologische Verhalten der Ureido-lactose und der Ureido-maltose, insbesondere über die enzymatische Spaltung der beiden Disaccharid-ureide. Biochem Z. 1932;253:462-469

59. Mohr C, Heine WE, Wutzke KD: *Clostridium innocuum*: a glucoseureide-splitting inhabitant of the human intestinal tract. Biochim Biophys Acta 1999;1472:550-554

60. Wutzke KD, Heine WE, Plath C, Leitzmann P, Radke M, Mohr C, Richter I, Gülzow HU, Hobusch D: Evaluation of oro-coecal transit time: a comparison of the lactose- [^{13}C, ^{15}N]ureide $^{13}CO_2$- an the lactulose H_2-breath test in humans. Eur J Clin Nutr 1997;57:11-19

61. Heine WE, Berthold HK, Klein PD: A novel stable isotope breath test: ^{13}C-labeled glycosyl ureides used as noninvasive markers of intestinal transit time. Am J Gastroenterol 1995;90:93-98

62. Beideck J: Die Bestimmung der orozökalen Transitzeit sowie der renalen und fäkalen Exkretion von doppelt markiertem Laktose-[^{13}C, ^{15}N]ureid beim Menschen. Dissertation, Univ. Rostock: 2010

63. Ruemmele FM, Heine WE, Keller KM, Lentze MJ: Metabolism of glycosyl ureides by human intestinal brush border enzymes. Biochim Biophys Acta 1997;1336:275-280

64. Lexikon der Biologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1999

65. Wutzke KD, Mix J: The metabolic fate of doubly labelled lactose-[^{13}C, ^{15}N]ureide after pre-dosing with different ureides. Eur J Clin Nutr 2010; 64:733-738

66. Wutzke KD, Schütt M: The duration of enzyme induction in orocaecal transit time measurements. Eur J Clin Nutr 2007;61:1162-1166

67. Verbeke K, de Preter V, Geboes K, Daems T, van den Mooter G, Evenepoel P, Rutgeerts P: In-vivo evaluation of a colonic delivery system using stable isotope techniques. Aliment Pharmacol Ther 2005;21:187-194

68. de Preter V, Verbeke K: Evaluation of the necessity of induction for lactose-[^{15}N, ^{15}N]-ureide to study the colonic ammonia metabolism. Scand J Gastroenterol 2006;41:396-400

69. Tisztl M: Ballaststoffreiche, resistente Stärken fördern bei Erwachsenen die Ammoniakentgiftung im Kolon, gemessen anhand der Exkretion der Abbauprodukte von Laktose-[$^{15}N_2$]ureid, Dissertation Univ. Rostock: 2018

70. Eisenbrand G, Schreier P, Meyer AH: Römpp-Lexikon Lebensmittelchemie, 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2006

71. Geboes KP, de Preter V, Luypaerts A, Bammens B, Evenepoel P, Ghoos Y, Rutgeerts P, Verbeke K: Validation of lactose-[^{15}N, ^{15}N]-ureide as a tool to study colonic nitrogen metabolism. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:G994-G999

72. Cloetens L, de Preter V, de Loor H, Rutgeerts P, Verbeke K: Does the biomarker ^{15}N-lactose ureid allow to estimate the site of fermentation of resistant starch? Eur J Nutr 2008;47:217-223

73. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE: Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. Nature 2014;505:559-563.

74. Morrison DJ, Dodson B, Preston T, Weaver LT. Gastrointestinal handling of glycosyl [^{13}C] ureides. Eur J Clin Nutr 2003;57:1017-1024

75. Leitzmann P, Heine WE, Wutzke KD, von Bismarck P, Dorlöchter L, Miera O, Bührlen M, Cornelissen BW, Höcker C: Comparison of gastric emptying, blood glucose, and oro-cecal transit times after a conventional morning meal and a Kollath breakfast. Z Ernahrungswiss 1998;37:31-37

76. Jackson AA, Gibson NR, Bundy R, Hounslow A, Millward DJ, Wootton SA: Transfer of ^{15}N from oral lactose-ureide to lysine in normal adults. Int J Food Sci Nutr 2004;55:455-462

77. de Preter V, Geboes K, Verbrugghe K, De Vuyst L, Vanhoutte T, Huys T: The in vivo use of the stable isotope labelled biomarker lactose-[$^{15}N_2$]-ureide and [$^{2}H_4$]tyrosine to assess the effects of pro- and prebiotics on the intesinal flora of healthy human volunteers. Br J Nutr 2004;92:439-446

78. Holdemann LV, Cato EP, Moore WEC: Anaerobe. Laboratory Manual, 4th edn., Blackburg/Virginia, USA, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977

8 Thesen

1. **Präbiotika zählen zu den sogenannten funktionellen Lebensmitteln.**

2. **Resistente Stärken zählen zu den Präbiotika.**

3. **Resistente Stärken werden aufgrund des Fehlens spezifischer Enzyme im Dünndarm weder hydrolysiert, noch absorbiert.**

4. **Resistente Stärken gelangen unverdaut ins Kolon.**

5. **Im Kolon werden resistente Stärken von Bakterien fermentiert.**

6. **Resistente Stärken dienen den Kolonbakterien als Energielieferant.**

7. **Die Supplementation mit resistenten Stärken dient dem vermehrten Wachstum apathogener Keime.**

8. **Lactose-[$^{15}N_2$]ureid ist eine geeignete Substanz um eine bekannte Dosis ^{15}N-Stickstoff bzw. ^{15}N-Ammoniak in das Kolon einzuschleusen.**

9. **Lactose-[$^{15}N_2$]ureid wird im GIT nur marginal resorbiert und erst im Zökum verstoffwechselt.**

10. **Die Messung der Abbauprodukte von Lactose-[$^{15}N_2$]ureid ist eine geeignete, nicht-invasive Methode zur Bestimmung des Stickstoffmetabolismus im Kolon.**

11. **Eine Einnahme von 3x200mg pro Tag unmarkiertem Lactoseureid ist ausreichend um den Abbau von Lactose-[$^{15}N_2$]ureid zu induzieren.**

12. **Resistente Stärken senken signifikant die renale ^{15}N- und $^{15}NH_3$-Exkretion im Urin.**

13. **Nach Gabe eines Gemisches aus resistenten Stärken erfolgt ein geringer Anstieg der Ausscheidung von ^{15}N-markiertem Stickstoff über den Stuhl, jedoch ohne statistische Signifikanz.**

14. **Einer Induktion am Vortag der Tracereinnahme mit unmarkiertem Lactoseureid kommt hinsichtlich des Effekts auf den Ammoniakmetabolismus im Kolon keine Bedeutung zu.**

15. **Eine vorausgehende Enzyminduktion bewirkt keine Signalverstärkung der ^{15}N-Markierung der Exkretionsprodukte.**

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Anne-Sophie Tröndle

Anne-Sophie Tröndle

10 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	18. November 1992
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig, keine Kinder

Beruflicher Werdegang

06/2019- dato	Assistenzärztin der Allgemein- und Viszeralchirurgie, Hegau-Bodensee-Klinikum Singen

Hochschulbildung

10/2012- 11/2018	Studium der Humanmedizin (Note: gut (2,1)) Universität Rostock

Schulbildung

06/2011	Abitur (Note: sehr gut (1,4))
2002- 2011	Hochrhein-Gymnasium Waldshut-Tiengen
1998- 2002	Grundschule Buch, Gemeinde Albbruck

Auslandsaufenthalte

07/2011- 08/2012	Au Pair in Boston, Massachusetts, USA

Nebentätigkeiten

10/2016- 07/2017	Studentische Hilfskraft, Tutorin, PedSim-Center, Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock
04/2016- 07/2016	Studentische Hilfskraft, Tutorin, Präparierkurs, Institut für Anatomie, Universitätsmedizin Rostock
2009- 2011	Ausgebildete Vereinsassistentin des badischen Tennisverbandes für Tennissport

Sprachen

Muttersprache	Deutsch
Weitere Sprachen	Englisch (fließend in Wort und Schrift) Spanisch (B2) Französisch (Schulkenntnisse, 8 Jahre) Schwedisch (A1) Latein (Erwerb kleines Latinum)

Zusätzliche Interessen

Tennis
Reisen
Wintersport
Wandern

11 Danksagung

Herzlichen Dank an Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Wutzke, Leiter des Forschungslabores für Ernährungsmedizin an der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock, für die Themenvergabe und die gute Betreuung über den gesamten Zeitraum der Anfertigung der Dissertation hinweg.

Ein riesengroßes Dankeschön auch an Frau Birgit Salewski, MTA des Forschungslabores, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Studienteilnehmer ohne deren gewissenhaften Einsatz diese Studie nicht möglich gewesen wäre.

Vielen lieben Dank an Frau Anne Hornung vom Institut für Biostatitstik und Informatik in Medizin und Altersforschung für die Beratung und Hilfestellung in statistischen Fragen.

Ein letztes und riesiges Dankeschön meinen Eltern, meinem Bruder und meinem Freund für die stets liebevolle Unterstützung, die mir entgegengebrachte Geduld und die motivierenden Worte.

12 Anhang

12.1 Übersicht des Ablaufs der Tracereinnahme und Probengewinnung anhand des Instruktionsblattes für die Probanden

Bereits vor dem eigentlichen Messbeginn ist eine Urin- und eine Stuhlprobe für die Leerwertbestimmung zu sammeln!

1. Tag (Tag 13, 33, 53 und 73 der Studie)

7:30 Uhr	**1. Blutentnahme in der Universitäts- Kinderklinik**, Forschungslabor für Ernährungsmedizin, 1. Etage
7:40 Uhr	Wenn nicht bereits vorher erledigt, eine Urinleerwertprobe sammeln und Körpergewichtbestimmung mittels Personenwaage
7:45 Uhr	Gemeinsames Frühstück, wird gestellt, 1 Weizenbrötchen, Marmelade, Lätta, Käse, Tee
8:00 Uhr	Tracer (ca. 400mg, je nach aktuellem Körpergewicht)auf ein Ecke der mit Marmelade bestrichenen Brötchenhälfte geben, Ecke um 8:00 Uhr abbeißen, kauen und runterschlucken
10:00 Uhr	Urinprobe nehmen, (mittels Becherglas und Messzylinder zur genauen Volumenbestimmung)
12:00 Uhr	Urinprobe nehmen + Volumen bestimmen
14:00 Uhr	**2. Blutentnahme in der Kinderklinik**, Urinprobe nehmen(bereits in der Klinik oder sofort anschließend zu Hause), Mittagessen, wird gestellt, Spaghetti und Glas Soße
16:00 Uhr	Urinprobe + Volumenbestimmung
20:00 Uhr	Urinprobe + Volumenbestimmung
24:00 Uhr	Urinprobe + Volumenbestimmung
	Zwischen Frühstück und Mittagessen sollte nichts gegessen und getrunken werden. Eine kleine Menge Wasser oder Tee ist erlaubt, um Urinproduktion

	sicherzustellen. Nach dem standardisierten Mittagessen ist wieder individuelle Kost erlaubt. Stuhl wird ganztägig ad libitum gesammelt! s. Allgemeine Hinweise

2. Tag (Tag 14, 34, 54, 74)

8:00 Uhr	Urinprobe+Volumenbestimmung (**24h-Wert,** wichtig!)
Danach Urin sammeln ad libitum	→ immer Probe+ Volumen
Stuhl sammeln ad libitum	→ immer Probe + Gewicht

3.Tag (Tag 15, 35, 55, 75)

8:00 Uhr	Urinprobe+Volumenbestimmung (**48h-Wert,** wichtig!)
Danach nur noch Stuhl sammeln ad libitum	→ immer Probe + Gewicht

Allgemeine Hinweise:

- Der Stuhl wird mit der Tüte aufgefangen, manuell vermengt, einmal kurz auf die Küchenwaage gelegt und abgewogen.
- Dann mit dem **braunen** Stuhlröhrchen **haselnussgroße** Probe entnehmen.
- Die Tüte kann im Hausmüll entsorgt werden.
- *Alle Proben bitte mit Namen, Datum, Uhrzeit und möglichst Gewicht beschriften.*
- Für Urinröhrchen gilt dies ebenfalls! Sie sind bereits mit je 10 Tropfen 1N HCl gefüllt, diese bitte nicht verwerfen!

- Alle Proben in den vorgesehenen **Protokollen** notieren (*Datum, Uhrzeit, Gewicht*) → es gilt: Fehler dürfen passieren, aber bitte auch diese ehrlich notieren (bspw. Probe aus Versehen verworfen, Uhrzeit nicht genau eingehalten etc.).
- Eine **genaue Protokollführung** ist sehr wichtig.
- Die Proben bitte **schnellstmöglich einfrieren**/einfrieren lassen!