

Universität Rostock



Traditio et Innovatio

Aus der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock

Direktorin (k): Prof. Dr. med. Astrid Bertsche

**Die prebiotische Wirkung eines Gemisches aus resistenten
Stärken auf die renale und fäkale ^{13}C - und ^{15}N -Exkretion,
die orozökale Transitzeit sowie die Methan- und
Wasserstoffbildung beim gesunden Erwachsenen.**

Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr.med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von:

Sarah Scheel, geb. Michalski, aus Schwerin

Rostock, im Mai 2022



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International
Lizenz.

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

Promotionsvergebender: Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Wutzke, Universitätsmedizin
Rostock, Ernährungsmedizin

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Wutzke, Universitätsmedizin Rostock,
Ernährungsmedizin

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Sylvia Stracke, Universitätsmedizin Greifswald, Klinik und
Poliklinik für Innere Medizin A

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernd Kreikemeyer, Universitätsmedizin Rostock,
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 24.01.2023

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | Anatomisch-physiologische und biochemische Grundlagen..... | 1 |
| 1.1.1 | Die Verdauung des Menschen..... | 1 |
| 1.1.2 | Die oro-zokale Transitzeit..... | 2 |
| 1.1.3 | Die mikrobielle Flora in Zökum und Colon | 3 |
| 1.2 | Stoffwechsel | 4 |
| 1.2.1 | Der Stickstoffmetabolismus..... | 4 |
| 1.2.2 | Der Kohlenhydratstoffwechsel | 5 |
| 1.2.3 | Wasserstoff- und Methanentstehung im menschlichen Körper | 6 |
| 1.3 | Ernährung gemäß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung | 7 |
| 1.4 | Prebiotika in der Ernährung | 8 |
| 1.4.1 | Definition und Abgrenzung zu den Probiotika | 8 |
| 1.4.2 | Resistente Stärke..... | 9 |
| 1.5 | Stabile Isotope | 11 |
| 1.5.1 | Definition und physiologisches Vorkommen | 11 |
| 1.5.2 | Stabile Isotope in der Forschung und der klinischen Diagnostik | 13 |
| 1.6 | Laktoseureide | 15 |
| 1.6.1 | Struktur und Metabolismus von Laktose-[¹³ C, ¹⁵ N]ureid | 15 |
| 1.6.2 | Laktose- [¹³ C, ¹⁵ N]-ureide in Forschung und klinischer Diagnostik | 16 |
| 1.6.3 | Enzyminduktion mit unmarkiertem Laktoseureid | 17 |
| 2 | ZIELSTELLUNG..... | 18 |
| 3 | MATERIAL UND METHODEN..... | 19 |
| 3.1 | Das Probandenkollektiv | 19 |
| 3.2 | Die Tracer- und Induktionssubstanzen | 21 |
| 3.2.1 | ¹³ C- und ¹⁵ N-Laktoseureid..... | 21 |
| 3.2.2 | Unmarkiertes Laktoseureid als Induktionssubstanz..... | 22 |
| 3.3 | Die Probenanalyse und die Berechnungen | 22 |
| 3.3.1 | Die Atemgasproben | 22 |
| 3.3.2 | Die ¹³ CO ₂ -Messung mit dem nicht-dispersiven Infrarotspektrometer (FANci2) | 23 |
| 3.3.3 | Die Methan- und Wasserstoffanalyse mit dem BreathTracker® von QuinTron | 24 |
| 3.3.4 | Die Auswertung der Urin- und Stuhlproben..... | 25 |
| 3.3.4.1 | Vorbereitung der Proben für die Auswertung..... | 25 |
| 3.3.4.2 | Analyse der stabilen Isotope ¹³ C- und ¹⁵ N mittels Isotopenverhältnismassen- spektrometrie..... | 26 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.5 | Die Bestimmung der kumulativen prozentualen Exkretion von ^{13}C und ^{15}N im Urin und in den Faeces..... | 28 |
| 3.4 | Der Versuchsablauf | 29 |
| 3.5 | Statistik | 32 |
| 3.5.1 | Das Studiendesign..... | 32 |
| 3.5.2 | Die statistische Datenanalyse..... | 32 |
| 4 | ERGEBNISSE..... | 34 |
| 4.1 | Die Wasserstoff- und Methanexhalation über einen Zeitraum von 6 Stunden.... | 34 |
| 4.2 | Der $^{13}\text{CO}_2$-Atemtest | 38 |
| 4.2.1 | Die $^{13}\text{CO}_2$ - Häufigkeit über einen Zeitraum von 14 Stunden..... | 38 |
| 4.2.2 | Die kumulative prozentuale $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (CPDR) nach 14 Stunden..... | 39 |
| 4.2.3 | Die orozökale Transitzeit..... | 43 |
| 4.3 | Die Stickstoffexkretion | 46 |
| 4.3.1 | Die Gesamt-Stickstoffexkretion im Urin nach 48 Stunden | 46 |
| 4.3.2 | Die renale und faecale ^{15}N -Exkretion | 48 |
| 4.3.3 | Die mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion im Urin..... | 52 |
| 4.4 | Die renale und faecale ^{13}C-Exkretion..... | 54 |
| 5 | DISKUSSION DER ERGEBNISSE | 57 |
| 5.1 | Statistische Evaluation des Studiendesigns und der Versuchsplanung | 57 |
| 5.2 | Stoffwechselprozesse und -modulation im Zökum durch resistente Stärken | 58 |
| 5.3 | Der Wasserstoff- und Methanatemtest | 59 |
| 5.4 | Der ^{13}C-Atemtest und die orozökale Transitzeit..... | 62 |
| 5.5 | Die ^{15}N- und $^{15}\text{NH}_3$-Elimination..... | 65 |
| 5.6 | Die renale und faecale ^{13}C-Exkretion..... | 68 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 70 |
| 7 | LITERATURVERZEICHNIS | 72 |
| 8 | THESEN..... | III |

| | | |
|-----------|---|-------------|
| 9 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | V |
| 10 | TABELLENVERZEICHNIS | VI |
| 11 | SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG..... | VIII |
| 12 | LEBENSLAUF | IX |
| 13 | DANKSAGUNG | XI |

1 Einleitung

1.1 Anatomisch-physiologische und biochemische Grundlagen

Die folgenden Darstellungen der Anatomie und Physiologie des Verdauungstrakts sowie der grundlegenden biochemischen Prozesse im Stickstoff- und Kohlenhydratstoffwechsel dienen dem Verständnis der weiteren Abschnitte dieser Arbeit und sind als Übersicht zu verstehen. Für detaillierte Informationen wird auf die gängigen Lehrbücher der Anatomie, Physiologie und Biochemie verwiesen [1–5].

1.1.1 Die Verdauung des Menschen

Unter Verdauung versteht man die enzymkatalysierte Spaltung der Nahrungsstoffe [3]. Diese beginnt bereits im Mund. Beim Zerkauen der Nahrung wird diese mit dem Speichel gemischt und durch die in diesem enthaltenen Mucine für die Passage durch den Ösophagus (Speiseröhre) vorbereitet. Durch orale α -Amylase Ptyalin beginnt die Aufspaltung der langkettigen Kohlenhydrate wie Stärke. Nach der Passage des Ösophagus und des Magens gelangt die Nahrungsbrei (Chymus) in das Duodenum (Zwölffingerdarm). Hier werden dem Chymus die Verdauungsenzyme beigemischt, die zum größten Teil aus dem Pankreassekret entstammen. Die wichtigsten Enzyme sind hierbei die pankreatische α -Amylase, Lipasen, Peptidasen, Proteasen, RNasen und DNasen sowie die Cholin-Esterase. Des Weiteren erfolgt im Duodenum die Beimengung der Galle, die wichtige Stoffe für die Verdauung von Lipiden liefert. Erwähnt seien an dieser Stelle konjugierte Gallensäuren und Phospholipide. Das Dünndarmsekret enthält zu einem großen Teil Mucine und Bicarbonat (HCO_3^-). Es wird durch die Brunner-Drüsen sezerniert und schützt im Duodenum die Darmschleimhaut vor dem sauren Magensaft. Das wichtigste Enzym des Dünndarmsekrets ist die Enteropeptidase, die das inaktive Trypsinogen aus dem Pankreassekret in die aktive Form Trypsin umwandelt. Über die Sekretion von IgA-Antikörpern, die der Regulation des Wachstums von Mikroorganismen im Darm dienen, hat das Dünndarmsekret zudem eine wichtige immunologische Funktion. Über die Dünndarmabschnitte Jejunum und Ileum gelangt der Chymus in den Dickdarm. Dieser besteht aus den Abschnitten Zökum (Blinddarm) mit dem Wurmfortsatz (Appendix vermiformis), Colon (mit Pars ascendens, Pars transversum, Pars descendens, Pars sigmoideum) und dem Rektum (Mastdarm). Im Dickdarm wird dem Chymus viel Wasser entzogen und so um ein Vielfaches eingedickt. Das Ausscheidungsprodukt des Dickdarms, die

Faeces, besteht dennoch weiterhin zu 75% aus Wasser und lediglich zu 25% aus Trockensubstanz. Diese Trockensubstanz der Faeces besteht zu jeweils einem Drittel aus [3,5]:

- unverdaute Nahrungsreste: insbesondere Cellulose und unverdauliche Lipide
- Darmbakterien und mit ihnen stickstoffhaltige Substanzen
- Darmepithelzellen.

Die Faeces werden schließlich über das Rektum ausgeschieden.

1.1.2 Die oroökale Transitzeit

Die oroökale Transitzeit (OzTz) beschreibt den Zeitraum über die Passage der Nahrungssubstanz von der oralen Aufnahme bis zum Zökum und somit den Beginn der Fermentation der Nahrungsbestandteile durch die mikrobielle Flora des Dickdarms. Die Entwicklung und Evaluation geeigneter Verfahren zur Bestimmung der OzTz ist seit etwa 40 Jahren fortlaufend das Ziel zahlreicher Studien. Bereits in den 1970er Jahren wurden der Wasserstoffatemtest unter der Verwendung von Lactulose (H_2 -Lactulose Breathtest) beschrieben [6,7]. Dieses Verfahren etablierte sich durch seine einfache Umsetzung, die Nichtinvasivität und die Kosteneffizienz und galt folglich über viele Jahre für die nichtinvasive Bestimmung der OzTz [8,9]. Mit den Jahren der Forschung und klinischen Anwendung zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse des H_2 -Lactulose-Atemtests von verschiedenen intestinalen und anderen Faktoren und Prozessen beeinflusst wurden. Durch die Verabreichung von (insbesondere hohen Dosen) Lactulose traten vermehrt Passagestörungen mit gastrointestinalen Symptomen wie osmotisch bedingten Diarrhoen oder abdominellen Krämpfen auf. Es zeigte sich eine dosisassoziierte Passagebeschleunigung nach Einnahme von Lactulose [9]. In den frühen 1990er Jahren thematisierte eine italienische Arbeitsgruppe zudem das Problem der Nonresponder bezogen auf die H_2 -Produktion nach der Fermentation von Kohlenhydraten durch die bakterielle Flora des Zökums und Colons [10]. Man kam zu der Erkenntnis, dass hierin eine relevante Limitation des Verfahrens besteht [9]. Alternativen zu diesem Verfahren wie z.B. radiologische oder scintigraphische Verfahren mit Strahlenbelastung oder dem Einsatz radioaktiver Tracersubstanzen setzten sich aus ethischen Gründen ihrerseits nicht als Standardverfahren durch [9,11]. 1995 publizierten Heine et al. erstmalig die Verwendung von ^{13}C -markierten Glykosylureiden als Tracersubstanz zur Bestimmung der OzTz [8]. Dieses Verfahren wurde in der Folge in zahlreichen Studien weiter erforscht und mit den bis dahin bekannten Verfahren zur Bestimmung der OzTz verglichen. Es zeigten sich überzeugende und zuverlässige Ergebnisse bei der Ermittlung der OzTz bei der Verwendung von Laktose-

[¹³C, ¹⁵N]ureid im Vergleich zum Lactulose-H₂-Atemtest [9]. In unserer Studie verwendeten wir den Laktose-[¹³C]ureid-Atemtest zur Bestimmung der OzTz.

1.1.3 Die mikrobielle Flora in Zökum und Colon

Der Dickdarm des Menschen beherbergt eine große Vielfalt an bakterieller Mikroflora, die wie ein eigenes Ökosystem wirken und einen großen Anteil an den Stoffwechselvorgängen in diesem Abschnitt des menschlichen Verdauungssystems haben. Man geht davon aus, dass bis zu 1000 Bakterienspezies im Colon siedeln [12]. Im Zökum und Colon herrschen für das bakterielle Wachstum auf Grund ihrer geringen Passagezeit, dem Nährstoffangebot und dem niedrigen pH ideale Bedingungen für Wachstum und Vermehrung. Wichtig ist, dass stets ein Gleichgewicht in der Besiedlung von physiologischen und pathogenen Spezies herrscht mit einem Vorteil für die physiologische Flora des Colons. Einen potentiell guten Einfluss auf die Integrität des Zökums und Colons haben Bakterien, die einen fast ausschließlich saccharolytischen Stoffwechsel aufweisen [12]. Detaillierte und wissenschaftlich belegte Erkenntnisse über die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora des Zökums und Colons zu erlangen, ist seit vielen Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Bereits 1922 beschrieb Adam die Rolle von Bifidobakterien im Darm und deren ernährungsabhängig schwankende Reaktion hinsichtlich Wachstum und Vermehrung [13]. Er stellte zudem bereits die Hypothese auf, dass „die Dickdarmflora in ausgesprochenem Maße ein Indicator für die Verdauungsvorgänge im Darmkanale ist.“ [13] Heute geht die Wissenschaft davon aus, dass Laktobazillen und Bifidobakterien die führenden physiologischen Bakterienspezies im Colon sind. Sie nutzen im oberen Verdauungstrakt nicht verdaute Kohlenhydrate als Substrate zur Fermentation durch Kohlenhydrat-hydrolysierende Enzyme. Als Stoffwechselprodukte entstehen hierbei kurzkettige Fettsäuren, Wasserstoff (H₂), Methan (CH₄), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Laktat [12]. Die Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora kann durch eine Vielzahl an endogenen und externen Faktoren beeinflusst werden. Hier seien beispielhaft das Alter, der Einfluss von Stress auf den Körper, die Ernährungsphilosophie und die Einnahme von antimikrobiellen Wirkstoffen (Antibiotika) genannt [12]. Mit dem Ziel, die Diversität und Interaktionen der menschlichen intestinalen Mikroflora weiter zu erforschen und die Erkenntnisse in internationalen Datenbanken systematisch zu erfassen, wurde die „Human Gut Microbiome Initiative (HGMI)“ gegründet [14].

1.2 Stoffwechsel

1.2.1 Der Stickstoffmetabolismus

Das Gleichgewicht des Stickstoffhaushalts, die Stickstoffhomöostase, im Körper des Menschen wird zum größten Anteil durch den Aminosäureabbau in den unterschiedlichen Geweben gewährleistet. Besondere Bedeutung haben hierbei die Leber und die Muskulatur. Die Substrate für den Aminosäurestoffwechsel entstammen der Proteolyse von Nahrungsproteinen und körpereigenen Proteinen. Die einzelnen Schritte des Abbaus von Aminosäuren sind komplex und vielschichtig. Grundlegend erfolgt der Abbau von Aminosäuren in zwei Schritten:

1. Die Aminogruppe wird durch eine Transaminierungs- oder Desaminierungsreaktion abgespalten. Bei Vorliegen einer Carboxylgruppe kommt es analog zu einer Decarboxylierungsreaktion.
2. Das in Schritt 1 entstandene Kohlenstoffgerüst wird dem Kohlenhydrat- oder Lipidstoffwechsel und dem Citratzyklus zugeführt.

Bei der Transaminierung wird die Aminogruppe auf eine α -Ketosäure übertragen. Häufigster Reaktionspartner ist hierbei das α -Ketoglutarat, aus dem durch die Reaktion die Aminosäure Glutamat entsteht. Glutamat nimmt somit eine zentrale Position im Aminosäurestoffwechsel ein. Bei der Desaminierung wird die Aminogruppe abgespalten und Ammoniak ($\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) freigesetzt. Dies geschieht entweder nach zuvor erfolgter Oxidation der Aminosäure (oxidative Desaminierung), unter der Abspaltung von Wasser (eliminierende Desaminierung) oder nach Einbau von Wasser (hydrolytische Desaminierung) [15]. Nach dem Abbauweg ihres Kohlenstoffgerüsts werden Aminosäuren wie folgt eingeteilt:

- Glucogene Aminosäuren: Es entstehen Pyruvat und Metaboliten des Citratzyklus. Diese werden als Substrate für den Citratzyklus verwendet und so zur Energiegewinnung genutzt oder als Substrate für die Gluconeogenese eingesetzt.
- Ketogene Aminosäuren: Es entsteht das Acetyl-CoA. Dieses wird als Substrat für den Citratzyklus und zur Synthese von Ketonkörpern oder Fettsäuren verwendet.
- Gemischt glucogene und ketogene Aminosäuren [15].

Das bei der Desaminierung freigesetzte Ammoniak ist zelltoxisch und muss vom Körper entgiftet werden. Hierfür wird es dem Harnstoffzyklus der Leber zugeführt und durch Reaktion mit Bicarbonat (HCO_3^-) zu Harnstoff abgebaut. Diese Reaktion macht den größten Teil der Ammoniakentgiftung aus. Durch die überwiegend renale Elimination des Harnstoffs (etwa 70%) kann Stickstoff ausgeschieden werden. Schätzungsweise gelangen bei einer normalen

Proteindiät täglich 30% des in der Leber produzierten Harnstoffs zudem erneut ins Colon und werden hier von der intestinalen Flora wieder zu Aminosäuren metabolisiert und für die Aminosäure- und Proteinsynthese verwendet [16]. Durch die mikrobielle Flora des Dickdarms kann Ammoniak inkorporiert und somit die Stickstoffexkretion über die Faeces gesteigert werden [17]. Neben der Leber und dem Darm beteiligen sich auch die Nieren, die Muskulatur und das zentrale Nervensystem zu geringeren Anteilen am Aminosäuremetabolismus.

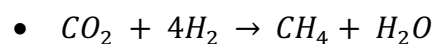
1.2.2 Der Kohlenhydratstoffwechsel

Kohlenhydrate, die mit der Nahrung zugeführt werden, sind zu etwa zwei Drittel Polysaccharide und zu dem übrigen Drittel Disaccharide wie Laktose (Milchzucker) und Saccharose (raffiniertes Zucker). Das bedeutendste Kohlenhydrat der menschlichen Ernährung ist Stärke, ein Polysaccharid aus 70% Amylopektin und 30% Amylose. Da im Duodenum nur Kohlenhydrate in Form von Monosacchariden resorbiert werden können, ist eine Aufspaltung der glykosidischen Bindungen der Polysaccharide durch Verdauungsenzyme notwendig. Diese beginnt bereits oral durch die Speichel- α -Amylase, durch die die Polysaccharide zu Di- und Oligosacchariden abgebaut werden. Nach der Passage des Ösophagus und des Magens gelangen diese in das Duodenum. Hier erfolgt die weitere Verdauung durch die Pankreas- α -Amylase und die Spaltung der Di- und Oligosaccharide zu Monosacchariden wie Glucose, Galactose und Fructose durch Glukosidasen. Diese gehören chemisch zu den Hydrolasen. Die Mukosazellen des Darms besitzen für die Resorption der Glucose Na^+ -Glucose Symporter. Die Aufnahme in die Zielzellen für die Verstoffwechselung erfolgt über spezifische Glucosetransporter, die sogenannten GLUT. Je nach Zielgewebe wird die Glucose als Substrat für die Glycolyse oder den Hexosemonophosphatweg verwendet und abgebaut. Durch die Glycolyse entstehen Pyruvat, ATP als Energiequelle und Reduktionsäquivalente für weitere Stoffwechselprozesse wie z.B. den Citratzyklus und die Atmungskette. Der Hexosemonophosphatweg liefert Pentosen, d.h. Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, die u.a. für die Synthese von DNA und RNA benötigt werden. Glucose wird zudem in Form von Glykogen, einem stark verzweigten Polymer mit α -1,4- und α -1,6-glykosidischen Verbindungen, gespeichert. Alle Zellen des Körpers mit Ausnahme der kernlosen Erythrozyten können Glykogen speichern und bei Bedarf als Substrat für die Glucoseneubildung (Gluconeogenese) verwenden. Die größten Glykogenspeicher finden sich in der Skelettmuskulatur, gefolgt von der Leber [2,3,18].

1.2.3 Wasserstoff- und Methanentstehung im menschlichen Körper

Wasserstoff und Methan können bei der Verdauung von Nährstoffen im menschlichen Körper ausschließlich unter anaeroben Bedingungen nach Fermentation durch die mikrobielle Flora der Dickdarmabschnitte Zökum und Colon entstehen. Als gesichert gilt, dass bei der Fermentation von Kohlenhydraten durch die Anaerobier die Gase Wasserstoff (H₂), Methan (CH₄), Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Schwefelwasserstoff (H₂S) entstehen [19,20].

Bisher auch nach jahrzehntelanger Forschung weiter wenig verstanden ist, welche Mikroorganismen exakt an der Entstehung und weiteren Verstoffwechselung von Wasserstoff und insbesondere Methan im humanen Intestinaltrakt beteiligt sind. In ihrer Dissertation aus dem Jahr 2018 beschäftigte sich zum Beispiel Kröninger mit dieser Fragestellung [21]. Demnach gehören zur mikrobiellen Flora des Colons Bakterien, die methanogenen Archaeen, die in der Lage sind, die energiearmen Stoffwechselverbindungen wie Methylamine, H₂ und CO₂ nach bakterieller Fermentation als Substrate zur Energiegewinnung zu nutzen und somit eine bedeutende Rolle in den finalen Schritten des Abbaus organischer Verbindungen spielen. Bei der Methanogenese aus H₂ als Elektronendonator und CO₂ als Substrat wirken hydrogenotrophe methanogene Archaeen [21]. Die Methanogenese lässt sich hierbei mit folgender chemischen Reaktion beschreiben:



Als weitere für den menschlichen Organismus potentiell relevante Reaktion beschreibt Kröninger [21] die Methanogenese aus methylierten Verbindungen wie Methylamin und Methanol über methylotrophe methanogene Archaeen. Auch hier wirkt H₂ als Elektronendonator.

Die Elimination von H₂ und CH₄ erfolgt entweder über den Darm als Flatus oder über den systemischen Blutkreislauf und schließlich nach Diffusion über die Alveolen in die Lunge mit der Ausatemluft. Letzteren Eliminationsmechanismus macht man sich in der Forschung und in der klinischen Anwendung bei der Anwendung von Atemtestverfahren zur Beurteilung von Stoffwechselvorgängen zu Nutzen. H₂-Atemtestverfahren finden breite Anwendung in der Diagnostik von Malabsorptionssyndromen und gastrointestinalen Motilitätsstörungen. Auch der weiter oben bereits erwähnte H₂-Lactulose-Atemtest basiert auf diesem Eliminationsmechanismus.

Der beschriebene Zusammenhang zwischen H₂- und CH₄-Metabolismus - insbesondere die Verwendung von H₂ zur Methanogenese - unterstützen die zahlreichen Studien und Publikationen, die eine kombinierte exhalative Bestimmung von H₂ und CH₄ unter Anwendung einer CO₂-Korrektur stark empfehlen, um valide Messergebnisse zu erhalten [10,22–25]. In unserer Studie verwendeten wir ein solches Analyseverfahren mit kombinierter H₂- und CH₄-Bestimmung unter Anwendung der CO₂-Korrektur.

1.3 Ernährung gemäß der Deutschen Gesellschaft für Ernährung

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) folgt in ihren Empfehlungen zur Gestaltung der Ernährung den Empfehlungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO = „World Health Organization“). 2011 veröffentlichte die DGE ein Positionspapier „Richtwerte für die Energiezufuhr aus Kohlenhydraten und Fett“ [26]. Hier erfolgte die Empfehlung, den Energiebedarf führend durch Kohlenhydrate und Fette zu decken. Proteine komplettieren die Energiezufuhr. Die Zufuhr dieser soll für einen durchschnittlichen Erwachsenen 0,8g/kg Körpergewicht betragen. Setzt man eine ausgewogene regional typische Mischkost voraus, so liefern Proteine gemäß dieser Vorgabe einen Beitrag von 10-15% des Energiebedarfs. Für die Zufuhr von Fetten und Kohlenhydraten lässt sich nicht analog ein physiologisch durchschnittlicher Bedarf benennen. Hierfür gibt die DGE Richtwerte vor. Ziel ist eine moderate Fettzufuhr von 30-35% des Energiebedarfs je nach individueller körperlicher Aktivität. Insbesondere soll auf eine möglichst geringe Zufuhr von gesättigten Fettsäuren und eine ausreichende Zufuhr von Ballaststoffen über pflanzliche Lebensmittel geachtet werden. In der Differenz ergibt sie eine empfohlene Zufuhr von Kohlenhydraten in Höhe von 50-55% des Energiebedarfs. Ein Problem der durchschnittlichen Ernährung der deutschen Bevölkerung besteht hierbei in der Art von Kohlenhydraten, die konsumiert werden. Mono- und Disaccharide machen nach Einschätzung der DGE einen zu großen Anteil der Energiezufuhr über Kohlenhydrate aus. Die Empfehlung lautet, den Energiebedarf aus der Zufuhr von Kohlenhydraten durch einen hohen Anteil von langkettigen und ballaststoffreichen Polysacchariden zu gewährleisten und empfiehlt hier mehrfach den Konsum von Vollkornprodukten [26]. Zu den Nahrungsmitteln, die diese Anforderungen an qualitativ hochwertige Kohlenhydrate erfüllen, zählen die Prebiotika und aus der Gruppe dieser die resistenten Stärken.

Ballaststoffe sind Gerüst- und Speichersubstanzen in überwiegend pflanzlichen Nahrungsmitteln (in der internationalen Literatur englisch unter dem Terminus „dietary fiber“

= wörtlich übersetzt „Nahrungsfasern“ verwendet [27]), die durch die Enzyme des Pankreas und Dünndarms nicht aufgespalten werden können und sich so der Verstoffwechselung in diesen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts entziehen. Im Dickdarm (Colon) werden sie einerseits als Quellstoffe benutzt und beeinflussen hierdurch die Konsistenz der Faeces und stimulieren in der Folge die Darmmotilität. Bekannt sind wasserlösliche und wasserunlösliche Ballaststoffe. Die wasserlöslichen Ballaststoffe sind Substrate für den mikrobiellen Stoffwechsel des Colons, der kurzkettige Fettsäuren synthetisiert. Zu diesen gehören Acetat, Butyrat und Propionat. Acetat und Propionat gelangen nach Resorption direkt in das Pfortaderblut und werden dem allgemeinen Stoffwechsel als Energiesubstrate zur Verfügung gestellt. Butyrat dient speziell der Mukosa des Colons und deren mikrobiellen Flora als Substrat und fördert über diesen Mechanismus die Zellproliferation des Mukosaepithels. Über eine Reduktion des pH-Wertes verbessern die kurzkettigen Fettsäuren die Bioverfügbarkeit von Elektrolyten und Spurenelementen. Der Energiegehalt ballaststoffreicher Lebensmittel ist deutlich geringer als der Energiegehalt ballaststoffarmer Lebensmittel [2].

1.4 Prebiotika in der Ernährung

1.4.1 Definition und Abgrenzung zu den Probiotika

Prebiotika wurden 1995 von der Arbeitsgruppe um Gibson und Roberfroid zunächst als nichtverdauliche Bestandteile der Nahrung beschrieben, die die gastrointestinale Gesundheit des Wirts günstig beeinflussen, indem sie selektiv das Wachstum und/oder die Aktivität einer oder einer definierten Anzahl von physiologischen Bakterienpopulationen im Colon stimulieren (aus dem Englischen nach: [28]). Ebenfalls Gibson und Roberfroid publizierten 2004 erweiterte Kriterien, die Prebiotika für die Klassifizierung als solche erfüllen müssen, nachdem der Begriff zwischenzeitlich sehr großzügig auf viele Oligosaccharide und Polysaccharide aus der Gruppe der Ballaststoffe angewandt worden war [29]. Diese Kriterien waren im Detail:

- Resistenz gegenüber der Magensäure, der Hydrolyse durch Enzyme und der Absorption durch den GI-Trakt bis zum Zökum.
- Fermentation durch die intestinale Mikroflora.
- Selektive Stimulation des Wachstums und /oder der Aktivitäten der mikrobiellen Flora.

Gegenüber den Prebiotika abzugrenzen sind die Probiotika. Unter Probiotika versteht man gemäß einer Definition von Fuller aus dem Jahr 1989 „lebende mikrobielle Nahrungszusätze

mit nutzbringenden Effekten für den Wirtsorganismus durch Verbesserung seiner intestinalen mikrobiellen Balance“ [30]. Diese Definition wurde im Jahr 2001 durch die Food and Agriculture Organization der Vereinten Nationen und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) bestätigt [31]. Die bisher besten untersuchten Mikroorganismen unter den Probiotika sind Laktobazillen und Bifidobakterien.

Zusammenfassend lässt sich als wesentlicher Unterschied der beiden Substanzklassen beschreiben, dass Prebiotika als Kohlenhydratverbindungen mit definierten biochemischen Eigenschaften (s.o.) die vorhandene intestinale Mikroflora in Wachstum und Aktivität stimulieren, während Probiotika den Aufbau und Erhalt der intestinalen Mikroflora durch Zufuhr lebender Mikroorganismen wie Laktobazillen und Bifidobakterien fördern.

1.4.2 Resistente Stärke

Der Begriff der resistenten Stärke (RS) wurde 1982 zunächst von Englyst et al. verwendet, nachdem diese in ihren Untersuchungen zur Verdauung von Polysacchariden unter Anwendung der Flüssiggaschromatographie gesehen hatten, dass eine Fraktion der Stärke in gekochter und wieder abgekühlter Nahrung vermehrt resistent gegenüber der Verdauung durch die Pankreasamylase war [32]. Im Verlauf weiterer in vivo und in vitro Studien fanden die Autoren weitere Stärkefraktionen und ihre Mechanismen, die sich auch gegenüber der Spaltung ihrer spezifischen α -1,4- und α -1,6-glykosidischen Bindungstypen im Dünndarm resistent zeigten [27,33]. Gemäß aktueller Definition ist unter resistenter Stärke jene Stärke zu verstehen, die das Colon unverdaut erreicht und durch die dort angesiedelte mikrobielle Flora fermentiert und verstoffwechselt wird [34]. Es besteht demnach eine Resistenz gegenüber den hydrolisierenden Enzymen des Pankreas und der Dünndarmabschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum.

Es entwickelte sich eine Klassifikation natürlich vorkommender RS, die Tabelle 1 zusammenfasst:

| | Mechanismus der Resistenz gegenüber der Spaltung im Dünndarm | Beispiele für Vorkommen in der Nahrung |
|------|---|--|
| RS 1 | Physiologisch unzugängliche Stärke (in unverdaulicher Matrix) | Vollkorn, Hülsenfrüchte (z.B. Nüsse, Bohnen), Hafer |
| RS 2 | Granula resistenter Stärke | rohe Kartoffeln, unreife Bananen, Maisstärke mit hohem Amylosegehalt |
| RS 3 | Retrogradation | Gekochte und wieder abgekühlte Kartoffeln, Brot, Nudeln, Reis |

Tabelle 1: Klassifikation der Typen natürlich vorkommender RS nach [33]

In der Fachliteratur werden unter dem Begriff RS 4 chemisch modifizierte Stärken beschrieben. Hier werden in einer Additionsreaktion Ester- und Ethergruppen angefügt. Zudem enthalten diese quervernetzende Amylosestränge. Die Kombination der chemischen Modifikation macht diese Stärken der Verdauung im Dünndarm unzugänglich [34]. Diese Form der RS findet in der Lebensmittelindustrie Anwendung als Geschmacksverstärker und Verdickungsmittel in Backwaren und Getränken [35] und kann somit nicht zu den natürlich vorkommenden RS gezählt werden.

Die Fermentation der RS im proximalen Colon, hier insbesondere im Zökum, führt zu der vermehrten Produktion von kurzkettigen Fettsäuren - insbesondere Butyrat, Propionat und Acetat - und zu einer Herabsetzung des pH-Wertes. Publikationen von Zhou et al. sowie Keenan et al. befassten sich detailliert mit den Auswirkungen dieses Stoffwechselprozesses auf die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora des Zökums und den Einfluss auf die Genexpression der Mukoszellen [34,36,37].

RS haben einen niedrigen glykämischen Index (GI). Unter dem glykämischen Index versteht man die Blutzuckerwirksamkeit der Kohlenhydrate aus der Nahrung. Er beschreibt, wie schnell die Glucosekonzentration nach dem intestinalen Abbau der Kohlenhydrate im Blut steigt und somit die Insulinfreisetzung stimuliert. Die Ermittlung des glykämischen Index eines Nahrungsmittels erfolgt über den zeitlichen Verlauf des Anstiegs der Blutglucosekonzentration 2 Stunden nach Einnahme einer Testmahlzeit mit einem Kohlenhydratanteil von 50g im Vergleich zu einer Indexmahlzeit mit ebenfalls 50g Kohlenhydratanteil. Das Ergebnis in Prozent der area under the curve (AUC) im Vergleich zu der Referenzsubstanz (meist Glucose) ergibt den glykämischen Index [38,39]. Der GI von Glucose als Referenzwert für die

Beurteilung des GI anderer Nahrungsmittel beträgt 100 [40]. Als niedriger GI gilt ein Wert <50% des Referenzwertes [41]. Um die Blutzuckerwirksamkeit eines Nahrungsmittels zu beurteilen, wird in der Literatur ergänzend zum GI die Berücksichtigung der glykämischen Last (GL) eines Nahrungsmittels empfohlen. Diese errechnet sich aus dem GI multipliziert mit dem verwertbaren Kohlenhydratanteil in [g] geteilt durch 100 [42]. Nahrungsmittel wie RS mit einem niedrigen GI senken über diesen Weg die GL und in der Folge die metabolischen Effekte einer hohen Blutzuckerwirksamkeit [37,42,43].

Die Blutzuckerregulation nach Zufuhr RS wird verbessert. Dies haben Tier- und Humanstudien bereits bewiesen. Die genauen Mechanismen und die detaillierten Stoffwechselwege sind weiterhin nicht eindeutig beschrieben. Die bisherigen Studien deuten darauf hin, dass insbesondere zwei der weiter oben beschriebenen Eigenschaften von RS hier eine große Rolle spielen dürften. Dies ist zum einen die Resistenz gegenüber der Verdauung der Stärke im Dünndarm und dem hieraus resultierenden niedrigen GI. Zum anderen bewirkt die vermehrte Produktion von kurzkettigen Fettsäuren nach Fermentation durch die mikrobielle Flora des Zökums eine verbesserte Blutzuckerregulation über verschiedene Mechanismen. Hierzu zählen eine verbesserte Glucoseverstoffwechselung in der Leber und in Muskelzellen, eine gesteigerte Insulinantwort und Insulinsensitivität über eine vermehrte Sekretion der Hormone PYY und GLP-1 sowie eine Reduktion von Adipositas durch die Hemmung des Fettaufbaus und Herabsetzung der Inflammation im Organismus [37].

1.5 Stabile Isotope

1.5.1 Definition und physiologisches Vorkommen

Stabile Isotope sind gemäß der Übersetzung ihres Namens aus dem Griechischen („isos topos“ = an der gleichen Stelle) Nuklide eines chemischen Elements an derselben Stelle des Periodensystems und gleicher Protonenanzahl, die sich untereinander durch die Anzahl ihrer Neutronen unterscheiden [44]. Dies bewirkt Unterschiede in der Atommasse, in Kernvolumen, Kernsymmetrie und Kernmagnetismus, aus denen sich die Unterschiede in den physikalischen Eigenschaften ergeben. Man spricht von Isotopeneffekten. Diese Effekte stellen die Grundlage für die künstliche Anreicherung stabiler Isotope dar und ermöglichen so ihren Nachweis und Bestimmung im Labor [45]. Stabile Isotope sind in der Natur deutlich seltener als die natürlich dominanten Isotope ihres Elements. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der stabilen Isotope ^{13}C und ^{15}N , die in unserer Studie zur Anwendung kamen:

| Element | Isotop | natürliche Häufigkeit [%] |
|---------------|-----------------|---------------------------|
| Kohlenstoff C | ^{12}C | 98,89 |
| | ^{13}C | 1,11 |
| Stickstoff N | ^{14}N | 99,63 |
| | ^{15}N | 0,37 |

Tabelle 2: Isotopenhäufigkeit der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff nach [45]

In der Regel haben die stabilen Isotope eine oder auch mehrere Neutronen mehr als die in der Häufigkeit dominanten Isotope ihres Elements. Hieraus ergibt sich die höhere Atommasse der stabilen Isotope, die zum Beispiel die Reaktionsgeschwindigkeit und auch die Gleichgewichtskonstante beeinflusst [45].

Wada et al. publizierten 1995 erstmals die sogenannte „isotope man“. Diese Darstellung gibt einen Eindruck über den Massenanteil von stabilen Isotopen einer 70kg schweren Person, die nach diesem Modell einen Anteil von 314,44g stabilen Isotopen an ihrem Gesamtkörpergewicht hat [46].

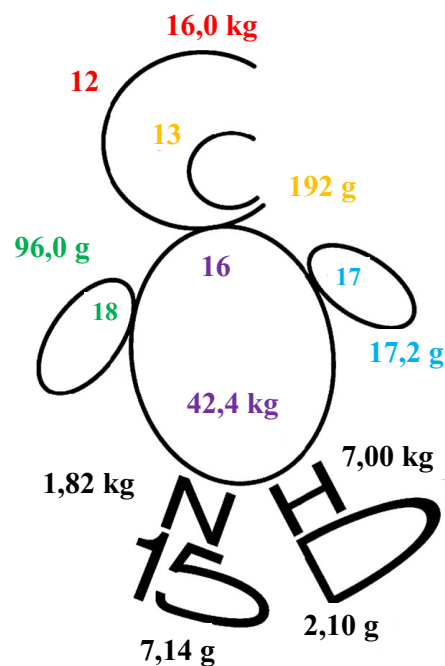


Abbildung 1: Isotopenzusammensetzung des menschlichen Körpers einer 70kg schweren Person modifiziert nach [46]

1.5.2 Stabile Isotope in der Forschung und der klinischen Diagnostik

Stabile Isotope werden seit vielen Jahrzehnten in der Stoffwechselforschung angewendet. Schon in den 1930er Jahren verwendeten Schoenheimer und Rittenberg stabile Isotope bei der Untersuchung des Fettstoffwechsels von Mäusen (Deuterium, ^2H) und bei der Messung des Protein-Turnovers (^{15}N -Glyzin) [45,47]. In den 50er und 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden die stabilen Isotope in der Stoffwechselforschung zwischenzeitlich weitestgehend von radioaktiven Isotopen verdrängt, da diese zu jener Zeit besser verfügbar und analysierbar waren. Eine Ausnahme bildete hierbei das stabile Isotop ^{15}N , das sich behauptete, da es von Stickstoff kein Radioisotop mit ausreichend langer Halbwertszeit für den Einsatz in Forschung und Diagnostik gab [47]. Das im Verlauf der Jahre steigende Bewusstsein der Risiken der Strahlenbelastung durch den Einsatz von Radioisotopen in der Stoffwechsel- und Ernährungsforschung insbesondere bei pädiatrischen Patienten und Schwangeren führte im Verlauf zu zunehmender Kritik und ethischen Bedenken. In dem Bestreben, sichere und nichtinvasive Methoden zur Analyse des Stoffwechsels und in der klinischen Diagnostik zu etablieren, erlebten die stabilen Isotope eine Renaissance in der Forschung. Die Forschung zu Möglichkeiten, die Anreicherung von stabilen Isotopen für diagnostische Zwecke erheblich zu verbessern, und zu verlässlicheren analytischen Methoden bei der Anwendung stabiler Isotope wurde massiv intensiviert [47]. Vorreiter auf diesem Forschungsgebiet in den vergangenen gut 4 Jahrzehnten waren u.a. Arbeitsgruppen und Kliniken auf dem Gebiet der Kinderheilkunde [8,9,44,47–55].

Stabile Isotope sind sichere Verbindungen. Für ^{13}C , ^{15}N und ^{18}O beispielsweise konnten in Tierstudien auch bei maximaler Anreicherung keine Nebenwirkungen beobachtet werden. Lediglich bei sehr hohen Dosen von Deuterium (^2H), die jedoch weit über den in Forschung und klinischer Diagnostik verwendeten Dosierungen lagen, traten bei Nagetieren unerwünschte Effekte auf [44]. Auf Grund der nachgewiesenen Sicherheit, der nichtinvasiven Analysemethoden und der heute breiten Verfügbarkeit stabiler Isotope sind diese eine breite Säule in der Stoffwechsel- und Ernährungsforschung sowie in der klinischen Diagnostik und somit weitgehend unverzichtbar geworden.

Das Isotop ^{13}C findet bei der Untersuchung des Substratturnovers, bei Absorptions- und Oxidationsvorgängen sowie in der Analyse von Pharmakokinetik und enzymatischen Spaltungen Anwendung [45]. Im Folgenden sei eine Auswahl an Verfahren unter dem Einsatz des stabilen Isotops ^{13}C genannt [44,56]:

- Substratoxidation: ^{13}C -Glucose (Kohlenhydrate), ^{13}C -Palmitat (Fett), ^{13}C -Leucine/ $[\text{}^{13}\text{C}, \text{}^{15}\text{N}]$ -Leucine (Aminosäuren)
- Syntheseprozesse: 2,3- $^{13}\text{C}_2$ -Alanin (Gluconeogenese), natürlich angereicherte ^{13}C -Linolsäure (Fettsäuresynthese)
- Stoffwechselstörungen: ^{13}C -Fructose (Fructoseintoleranz)
- Maldigestionssyndrome: ^{13}C -Laktose (Laktasemangel), ^{13}C -Stärke (Amylasemangel), ^{13}C -Triolein (Lipase-Mangel)
- Malabsorptionssyndrome: ^{13}C -Glucose (Kohlenhydrate), ^{13}C -Triglyceride (Fett)
- Infektionsdiagnostik: ^{13}C -Harnstoff (*Helicobacter pylori*-Infektion)
- Funktionsdiagnostik: ^{13}C -Acetat und ^{13}C -Octanoat (Magenentleerung), ^{13}C -Laktoseureid (Oroökale Transitzeit)

Das stabile Isotop ^{15}N findet weit verbreitet Anwendung in der Analyse von Stoffwechselprozessen des Aminosäure- und Proteinturnovers. In zahlreichen Studien der letzten Jahrzehnte wurde der Einsatz von ^{15}N -Tracermethoden fortlaufend validiert und die Verfahren verbessert [17,49,50,53,57–59]. Das Forschungslabor an der Kinderklinik der Universitätsmedizin Rostock hat sich an der Forschung auf diesem Feld seit den 1980er Jahren aktiv beteiligt. Ein Forschungsschwerpunkt war die Untersuchung des Proteinturnovers in Früh- und Neugeborenen in Abhängigkeit von der Art der Ernährung unter Anwendung von verschiedensten mit ^{15}N markierten Substraten als Tracersubstanz [50,51,55,55,60,60,61]. In den letzten Jahren intensivierte sich in unserer Arbeitsgruppe wie auch global die Forschungsaktivität mit dem Einsatz von ^{15}N -Tracertechniken in der Untersuchung des Stickstoff- und Ammoniakmetabolismus im Colon sowie dessen Beeinflussbarkeit durch definierte Modulation der Ernährungsvorschrift [59,62–70].

Die genannten Beispiele für die Anwendung von ^{15}N als Bestandteil von Tracersubstanzen in der klinischen Diagnostik und bei der Beantwortung von Forschungsfragen zu Stoffwechsel und Ernährung zeigen die Möglichkeiten des vielfältigen Einsatzes dieses stabilen Isotops.

In unserer Studie verwendeten wir sowohl ^{13}C - als auch ^{15}N - markiertes Laktoseureid als Tracersubstanzen für unsere Fragestellung (Details siehe Abschnitt 1.6).

1.6 Laktoseureide

1.6.1 Struktur und Metabolismus von Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureid

Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureid gehört zu der Gruppe der Zuckerureide. Zuckerureide sind Mono-, Di- oder Polysaccharide, die in einer säurekatalysierten Kondensationsreaktion mit einem Harnstoffmolekül verbunden werden. Diese Verbindungen wurden bereits vor über 100 Jahren durch Schoorl hergestellt und beschrieben [71,72]. Laktose ist ein Disaccharid aus Galactose und Glucose, die über eine α -1,4-glycosidische Verbindung verbunden sind. An das C_1 -Atom der Glucose erfolgt die Bindung des mit den stabilen Isotopen markierten Harnstoffs. Abbildung 2 zeigt beispielhaft die chemische Struktur eines doppelt-markierten Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureids:

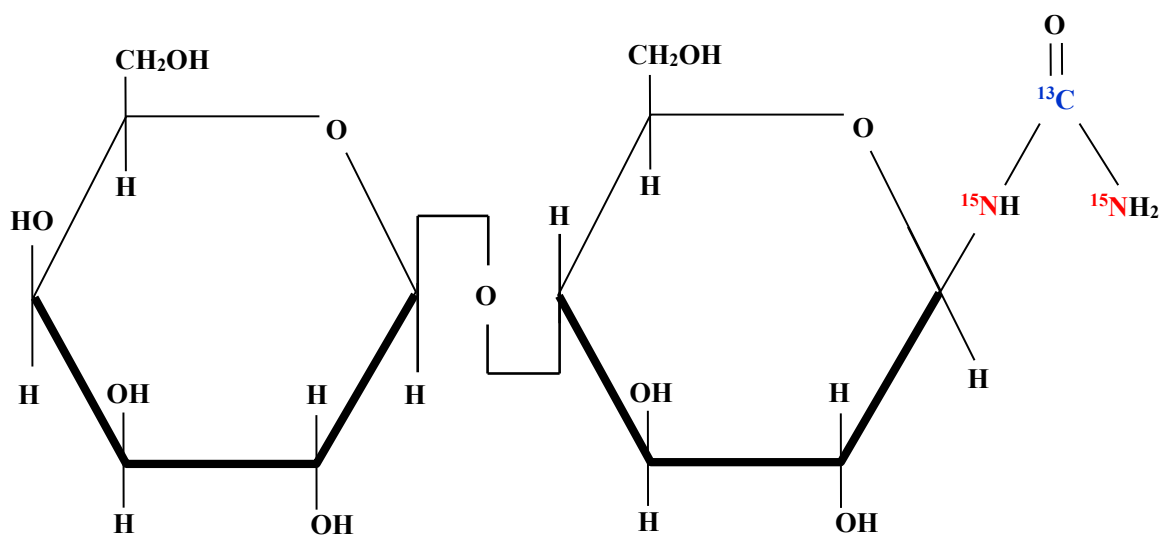


Abbildung 2: Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureid (modifiziert nach [8])

Durch die β -Galactosidase, eine Hydrolase des Dünndarms, wird die α -1,4-glycosidische Bindung gespalten und es entstehen das Monosaccharid Galactose und das Zuckerureid Glucoseureid. Die glycosylureidische Bindung ist den Hydrolasen des Dünndarms unzugänglich und wird exklusiv durch die Glucoseureid-Hydrolase des Bakteriums *Clostridium innocuum* im Zökum des Menschen gespalten [48]. Der ^{13}C , ^{15}N -markierte Harnstoff wird im Colon durch das Enzym Urease der intestinalen Mikroflora in $^{13}\text{CO}_2$ und 2 Moleküle $^{15}\text{NH}_3$ gespalten. Die Elimination erfolgt über die Ausatemluft sowie über Urin und Faeces [68]. Den Abbau und Stoffwechsel des Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureid verdeutlicht Abbildung 3 schematisch.

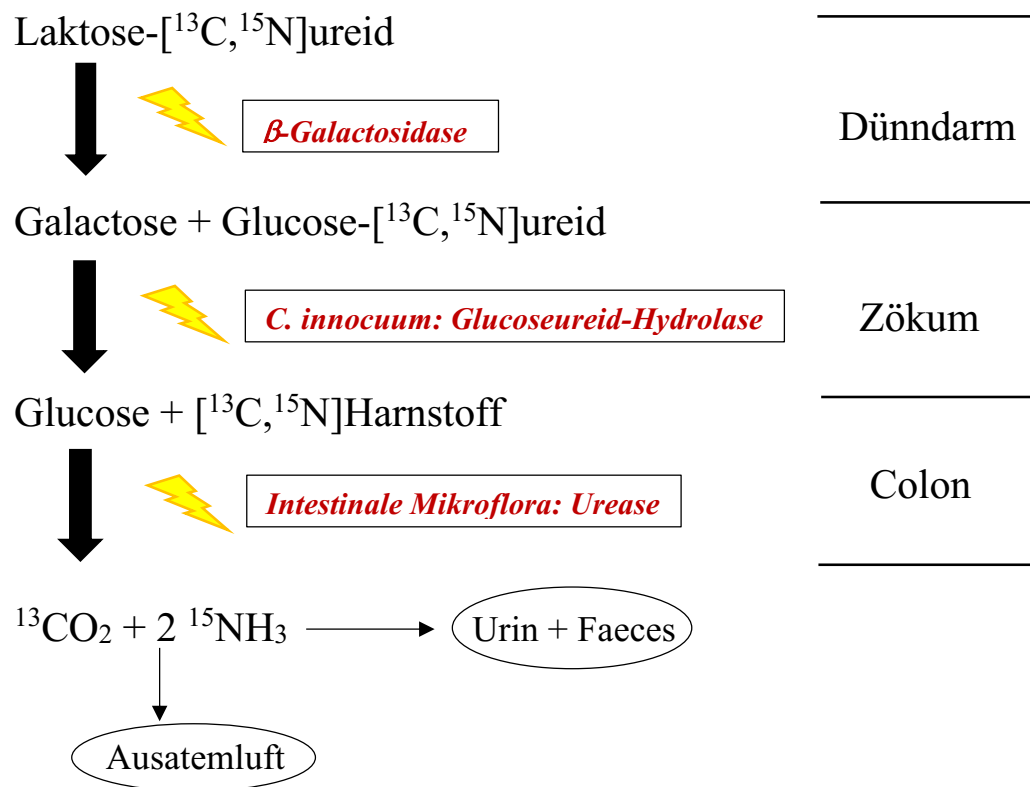


Abbildung 3: Metabolismus des Laktose-[¹³C, ¹⁵N]ureids nach [48,68]

1.6.2 Laktose- [¹³C, ¹⁵N]-ureide in Forschung und klinischer Diagnostik

Mit ¹³C- und ¹⁵N-markierten Laktoseureiden sind in den vergangenen Jahrzehnten sehr umfangreich als Tracersubstanzen für Stoffwechsel und Ernährung erforscht worden. ¹³C-markiertes Laktoseureid findet verbreitet Anwendung in der nicht-invasiven Diagnostik und bei der Bestimmung der oro-zökalen Transitzeit (OzTz). Dieses Verfahren wurde 1995 erstmals von Heine et al. beschrieben. Besonders geeignet zeigten sich die Glycosylureide und unter ihnen das ¹³C-Laktoseureid angesichts der Tatsache, dass die Verbindung zwischen dem Kohlenhydrat und dem Harnstoffmolekül nicht von den Hydrolasen des Dünndarms gespalten werden kann und das ¹³C-Laktoseureid somit unverdaut in das Zökum gelangt [8]. In darauffolgenden Studien konnte durch Wutzke et al. bestätigt werden, dass der Laktose-[¹³C]ureid-Atemtest zuverlässigere Ergebnisse bei der Bestimmung der OzTz lieferte im Vergleich mit dem H₂-Lactulose-Atemtest [9]. Mohr gelang es 1999, das Bakterium *Clostridium innocuum* mit dem in ihm vorkommenden Enzym Glucoseureid-Hydrolase als exklusiven Spaltungsmechanismus der glycosylureidischen Bindung zu identifizieren [48]. Geypens et al. konnten die nichtinvasive Bestimmung der OzTz mittels Laktose-[¹³C]ureid-

Atemtest im Vergleich mit der ^{99m}Tc -Szintigraphie validieren [73]. Eine Arbeitsgruppe in Leuven, Belgien, evaluierte den Einsatz des Laktose- ^{13}C ureid-Atemtest (LUBT = „lactose- ^{13}C ureid breath test“) für den Einsatz bei pädiatrischen Patienten unterschiedlicher Altersklassen [74]. Es zeigte sich, dass der LUBT bei Kindern und bei Säuglingen über 8 Monaten unter der Voraussetzung der bereits begonnenen Beikosteneinführung angewendet werden kann und somit eine vertretbare und für die kleinen Patienten nicht traumatische diagnostische Methode für z.B. Passage- und Motilitätsstörungen darstellt. Zudem ergab sich in den durchgeführten Stuhluntersuchungen, dass Laktose- ^{13}C ureid für voll gestillte oder ausschließlich mit Formelnahrung ernährte Säuglinge als Tracersubstanz nicht geeignet ist, da ihrer intestinalen Flora die Enzymausstattung, die Glucoseureid-Hydrolase, fehlt. Erst mit der Beikosteneinführung ändert sich die mikrobielle Flora umfangreich und wird dann u.a. auch mit Clostridien, unter ihnen *C. innocuum*, besiedelt [74].

Laktose- $^{15}\text{N}_2$ ureid findet als Tracersubstanz für die Beurteilung des Stickstoffmetabolismus weit verbreitet Anwendung. Ein weites Forschungsfeld für den Einsatz dieser Tracersubstanz bietet hierbei die Ernährung und deren möglicher Einfluss auf Stoffwechsel- und Entgiftungsprozesse. Eine sehr bedeutende Rolle bei der Betrachtung des Stickstoffmetabolismus und der Entgiftung toxischen Ammoniaks unter definierter Modulation der Ernährungsvorschrift eines Individuums nehmen hierbei die Stoffwechselvorgänge im Colon ein [16,17,75]. Studien aus unserem Forschungslabor an der Universitätskinderklinik in Rostock bestätigten die Erkenntnisse der internationalen Literatur und erweiterten den Forschungsstand [59,63–66,76].

1.6.3 Enzyminduktion mit unmarkiertem Laktoseureid

Eine Enzyminduktion mit unmarkiertem Laktoseureid (LU) zur Stimulation der Aktivität der Glucoseureid-Hydrolase in *C. innocuum* vor der Verabreichung der Tracersubstanz Laktose- ^{13}C , ^{15}N ureid wurde bereits 1997 von Wutzke et al. beschrieben [9]. Es zeigte sich eine höhere und schnellere Anreicherung von $^{13}\text{CO}_2$ im LUBT nach Enzyminduktion im Abstand von jeweils 4 Stunden über 24 Stunden vor Tracereinnahme. In einer Folgestudie empfahlen Wutzke und Schütt [70] eine Dosis von 5x100mg LU über 24 Stunden vor der Einnahme von 500mg Laktose- ^{13}C ureid als Tracersubstanz. Zudem zeigte sich, dass die induzierte Enzymaktivität eine kurze Halbwertszeit hat und nach 1 Woche ihr Effekt bereits nicht mehr messbar war. Hieraus ergab sich die Konsequenz, dass die Glucoseureid-Hydrolase als Schlüsselenzym des Zuckerureid-Abbaus vor jedem LUBT einer Versuchsreihe erneut induziert werden muss, um zuverlässige Ergebnisse für die OzTz zu erhalten [70].

2 Zielstellung

Die Thematik der Ernährung und Ihrer Bedeutung für ein gesundes Leben sowie in der Prävention von Zivilisationserkrankungen ist sowohl in Deutschland als auch global in den vergangenen 2 Jahrzehnten sehr stark in den wissenschaftlichen und auch gesellschaftlichen Fokus gerückt.

Ein anhaltendes und stetig wachsendes Interesse gilt im Rahmen dieser Entwicklungen Forschungen mit dem Ziel, ein detaillierteres Verständnis über Stoffwechselvorgänge und Resorptionsprozesse im Darm, speziell im Colon, zu erlangen. Der Einsatz von Pro- und Prebiotika zur Unterstützung und Förderung der Darmgesundheit durch Stimulation entgiftungsfördernder Prozesse im Colon ist daher von erheblichem wissenschaftlichem Interesse und Gegenstand vieler Studien und Publikationen [20,29,77,78]. Resistente Stärken als Prebiotika finden bereits weit verbreitet Anwendung und schon heute nehmen wir über unsere Nahrung – oftmals unbewusst – diese in geringen Dosierungen zu uns. Um den Einfluss resistenter Stärken auf die Aktivität der mikrobiellen Flora des Colons und damit einer möglichen protektiven und/oder präventiven Wirkung mit Hilfe wissenschaftlich belastbarer Erkenntnisse zu verstehen und zu definieren, braucht es fortlaufend kontrollierte Studien mit gezielter und definierter Anwendung von resistenten Stärken. Die Forschungslabor an der Universitätskinderklinik Rostock führte hierzu in den vergangenen Jahren bereits einige Studien im Rahmen der Grundlagenforschung unter Einsatz von resistenten Stärken durch [64,76,79]. Dabei kamen die resistenten Stärken jeweils isoliert zum Einsatz und ihr Einfluss wurde untereinander oder gegenüber der Supplementation von Probiotika verglichen.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir den Einfluss der Supplementation eines Gemischs aus 3 verschiedenen resistenten Stärken – Markersbensenstärke (MES), Kartoffelfaserstärke (KFS) und Maisstärke (MS) – auf die Ammoniakentgiftung im Colon, die oroökale Transitzeit (OzTz) und die expiratorische Wasserstoff- und Methanbildung anhand des Abbaus von Laktose-[¹³C]ureid und Laktose-[¹⁵N]ureid im Colon gesunder Erwachsener nach Induktion mittels LU. Zur Anwendung kamen hierbei ausschließlich nicht-invasive Analysetechniken. Ergänzend zu den o.g. Vorgängerstudien wurde die expiratorische Wasserstoff- und Methanbildung nach Supplementation des Gemischs aus RS mittels Atemgasanalyse untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie dürften durch Erlangung weiteren Wissens über Stoffwechsel- und Entgiftungsprozesse speziell im Colon zur fortlaufenden Etablierung der Anwendung von RS in der ernährungsmedizinischen Forschung und Klinik beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Das Probandenkollektiv

Insgesamt begannen 20 freiwillige Erwachsene (17 weiblich, 3 männlich) die Durchführung des Versuchsablaufs. Die Probanden¹ waren im Mittel 26,45 Jahre alt (SD: +/- 5,26, Spannweite: 25 Jahre). Die meisten Probanden waren zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 21 und 32 Jahre alt. Lediglich eine Probandin stellte hierunter mit einem Alter von 46 Jahren eine Ausnahme dar. Als definierte Einschlusskriterien für die Aufnahme in das Probandenkollektiv galten eine schriftlich vorliegende Einwilligungserklärung sowie die bestehende mentale und körperliche Fähigkeit, den Ablaufplänen der Versuchsanordnung zuverlässig folgen und die Probensammlung durchführen zu können. Antibiotikaeinnahme 2 Monate vor dem Beginn des Untersuchungszeitraums, stattgehabte gastrointestinale Erkrankungen (z.B. virale Durchfallerkrankungen, operative Eingriffe im Bereich der Magen-Darm-Organen sowie der harnausscheidenden Organe) während der vorangehenden 3 Monate, chronische gastrointestinale Erkrankungen (z.B. Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) sowie eine veränderte Anatomie der Faeces- und Urin-ausscheidenden Organe (beispielsweise das Vorliegen eines operativ geschaffenen Mainz-Pouch) führten zum Ausschluss aus dem Probandenkollektiv. Ebenso mussten Studienanwärter mit sich auf die gastrointestinale Passage auswirkenden Stoffwechselerkrankungen als Teilnehmer abgelehnt werden. Hierfür sei als Beispiel der Laktasemangel mit konsekutiver Laktoseintoleranz genannt. Der regelmäßige Gebrauch von Anticholinergika oder Opioiden führte ebenfalls zum Ausschluss als Studienteilnehmer, da dieser die Magen-Darm-Passage und die OzTz beeinflusst und somit zu einer Verfälschung der Studienergebnisse hätte führen können. Die Probanden wurden angewiesen, die individuelle sportliche Aktivität über den Zeitraum der Studienteilnahme konstant zu halten.

Alle teilnehmenden Freiwilligen befanden sich zum Zeitpunkt des Beginns der Durchführung der Studie in guter gesundheitlicher Verfassung. Von den Freiwilligen wurden Größe und Gewicht erhoben. Aus diesen Parametern erfolgte die Evaluation einer Adipositas bzw. einer Präadipositas mittels der Formel zur Bestimmung des Bodymass-Indexes nach Quételet [80]:

¹ Aus Gründen der Lesbarkeit wurde bei der Beschreibung des Probandenkollektivs das generische Maskulinum verwendet, welches ausdrücklich alle weiblichen Studienteilnehmerinnen miteinschließt.

$$BMI = \frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{\text{Körpergröße [m]}^2}$$

| Proband/in | Geschlecht | Alter bei Studienteilnahme [Jahre] | Größe [cm] | Gewicht [kg] | BMI [kg/m ²] |
|------------|------------|---------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------------------|
| 1 | männlich | 25 | 182 | 72 | 21,7 |
| 2 | weiblich | 23 | 171 | 57 | 19,2 |
| 3 | weiblich | 46 | 176 | 62 | 20,0 |
| 4 | weiblich | 28 | 160 | 68 | 26,6 |
| 5 | weiblich | 23 | 173 | 58,5 | 19,5 |
| 6 | männlich | 25 | 172 | 122 | 41,2 |
| 7 | weiblich | 26 | 170 | 55 | 18,6 |
| 8 | weiblich | 25 | 160 | 58 | 22,6 |
| 9 | weiblich | 30 | 168 | 58,5 | 20,7 |
| 10 | weiblich | 24 | 167 | 64 | 20,7 |
| 11 | weiblich | 25 | 167 | 53 | 19,0 |
| 12 | weiblich | 24 | 173 | 82 | 27,7 |
| 13 | weiblich | 28 | 178 | 64 | 20,2 |
| 14 | weiblich | 26 | 171 | 68,4 | 23,4 |
| 15 | weiblich | 25 | 176 | 72 | 23,2 |
| 16 | weiblich | 21 | 173 | 63 | 21,6 |
| 17 | weiblich | 26 | 164 | 55 | 20,4 |
| 18 | weiblich | 24 | 173 | 73 | 24,4 |
| 19 | männlich | 32 | 182 | 79 | 23,8 |
| 20 | weiblich | 23 | 172 | 70 | 23,7 |
| MW | - | 26,5 | 171,4 | 67,7 | 22,9 |
| SD | - | 5,3 | 6,0 | 15,1 | 5 |

Tabelle 3: Liste der Studienteilnehmer/innen

Unter den Versuchsteilnehmern zeigte sich nach dieser Definition nur ein Freiwilliger mit einem BMI von 41,2 kg/m² adipös. Alle anderen Probanden boten ein Normalgewicht. Keiner der Teilnehmer war Raucher oder von einer gastrointestinalen Erkrankung oder Stoffwechselstörung betroffen. Ebenso fanden sich keine streng lebenden Vegetarier oder Veganer unter den Freiwilligen. Alkohol- und Drogenabusus wurden als Ausschlusskriterium definiert. Die Probanden Nummer 5 und 6 führten zunächst die Leerphase des Versuchs durch, standen im Verlauf aber für die Phase der Störkeeinnahme aus unterschiedlichen Gründen nicht mehr zur Verfügung. Somit ergab sich für die Auswertung der Daten eine Studienpopulation von 18 Probanden. Das Studienprotokoll wurde vor dem Beginn der Untersuchung der Probanden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock als ethisch unbedenklich bestätigt und zur Durchführung freigegeben. Amendment: Registrier-Nr.: II HV 41/2004

3.2 Die Tracer- und Induktionssubstanzen

3.2.1 ¹³C- und ¹⁵N-Laktoseureid

Als Tracersubstanzen wurde zum einen ¹⁵N-markiertes Laktoseureid und des Weiteren ¹³C-markiertes Laktoseureid verwendet. Diese können im Forschungslabor für Gastroenterologie und Ernährung an der Universitätskinderklinik Rostock durch säurekatalysierte Kondensation von Laktose mit Harnstoff selbst hergestellt werden. Anwendung findet hierfür die später von Hofmann (1931) modifizierte Methode nach Schoorl [71,72], die bereits 1903 die Herstellung eines Glycosylureids aus einem reduzierenden Zuckermolekül und Harnstoff ermöglichte. Der verwendete mit [¹³C]- und [¹⁵N₂] markierte Harnstoff wies einen Gehalt von jeweils 99 Atom% auf. Die Synthesevorschrift für diese Substanz lässt sich mit beispielhaften Mengen- und Konzentrationsangaben wie folgt beschreiben [9]

- 25g Laktose werden in 50ml kochendem Wasser gelöst und nachfolgend schrittweise auf 50°C abgekühlt.
- Im nächsten Schritt werden dem Gemisch 12,5g ¹³C-Harnstoff und hinzugefügt. Durch Zugabe von Salzsäure wird ein pH-Wert von 1,6 erreicht.
- In einem Wasserbad wird das Gemisch für 9 Tage bei 42°C erhitzt.
- Es erfolgte schließlich die Abkühlung der Suspension hinunter auf bis zu 4°C über Nacht in einem Tiefkühlschrank. Hierauf begann nach 24 Stunden das doppelt markierte Laktoseureid als Bodensatz auszufallen.

- Der Bodensatz wurde von der übrigen Flüssigkeit abgetrennt, getrocknet und gewogen.
- Unter der Behandlung mit heißem Wasser und Ethanol erfolgte die zweimalige Rekristallisation zum Ausschluss von freiem Harnstoff.
- Die Reinheit des erhaltenen doppelt markierten Laktoseureid wurde durch Dünnschichtchromatographie bestätigt.
- Unter der Voraussetzung der beispielhaft angegebenen Mengen- und Konzentrationsangaben ergeben sich mittels beschriebener Synthesevorschrift 14,5g ^{13}C -LU mit einer molaren Masse von 403,4 g/mol.

Die Synthese von Laktose- $^{15}\text{N}_2$ ureid erfolgte unter identischen Bedingungen. Anstelle von ^{13}C -Harnstoff wurde die gleiche Menge $^{15}\text{N}_2$ -Harnstoff eingesetzt. Die molare Masse beträgt 404,3 g/mol.

3.2.2 Unmarkiertes Laktoseureid als Induktionssubstanz

Am Tag vor der Tracereinnahme wurde zur Induktion des Metabolismus der Tracersubstanzen ^{13}C - und ^{15}N -Laktoseureid unmarkiertes Laktoseureid verabreicht. Dieses kann analog zum Vorgehen bei der Herstellung der Tracersubstanzen ebenfalls im Forschungslabor Gastroenterologie und Ernährung der Universitätskinderklinik Rostock synthetisiert werden. Die biochemischen Grundlagen zu Ziel und Ablauf des Induktionsprozesses sind dem Abschnitt 1.6.3 dieser Arbeit zu entnehmen.

3.3 Die Probenanalyse und die Berechnungen

3.3.1 Die Atemgasproben

Zur Untersuchung der Konzentrationen von Kohlenstoffdioxid sowie Methan und Wasserstoff in der expiratorischen Atemluft im Verlauf befüllten die Probanden vor Einnahme der Tracersubstanzen (Leerwert) sowie in bestimmten Zeitabständen nach Verabreichung des Tracers speziell hierfür geeignete Atemtestbeutel durch Ausatmung nach forcierter Inspiration mit anschließend kurzem Verhalt der Luft zur CO_2 -Anreicherung. Die Atemtestbeutel wurden verschlossen und ins Forschungslabor zur Probenanalyse verbracht. Diese erfolgte stets im Zeitraum von 7 Tagen nach Durchführung des Atemtests. Für die genannte Zeitspanne war durch den Hersteller die Dichtigkeit der Atemtestbeutel garantiert worden, sodass die zu untersuchenden Spurengase durch ihre hohe Diffusionskapazität nicht entweichen konnten.

3.3.2 Die $^{13}\text{CO}_2$ -Messung mit dem nicht-dispersiven Infrarotspektrometer (FANci2)

In den 1980er Jahren wurde das Isotop ^{13}C des Kohlenstoffs als geeignete Substanz zur Untersuchung von metabolischen Vorgängen im menschlichen Körper entdeckt. In den vergangenen Jahren haben sich Verfahren zur quantitativen Erfassung von $^{13}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft etabliert. Bedingung hierfür sind hohe Konzentrationen des in der Natur am häufigsten vorkommenden Isotops $^{12}\text{CO}_2$. Zur Auswertung der gewonnenen Proben dieser Studie wurde das Gerät FANci2 der Firma Fischer Analysen Instrumente GmbH verwendet. Mittels Nicht-dispersiver-Infrarot (NDIR)-Spektroskopie kann das Verhältnis der stabilen Isotope ^{13}C und ^{12}C im Bereich ihres natürlichen Vorkommens exakt bestimmt werden. Gase mit einer unterschiedlichen Anzahl von Atomen zeigen unter Infrarotstrahlung im Spektrum zwischen 2,5 und 8 μm Wellenlänge spezifische Schwingungsrotationsbanden. Durch Resonanzabsorption dieser entstehen Absorptionsbanden, die für ein Gas mit einer Anzahl von n -Atomen jeweils spezifisch und mit einem Fingerabdruck vergleichbar sind. Auf diese Weise können anhand der vom FANci2 ausgegeben Absorptionsbanden die in der Probe vorhandenen Gase identifiziert werden. Die Ähnlichkeit der Isotope $^{13}\text{CO}_2$ und $^{12}\text{CO}_2$ bedingt eine teilweise Überlappung der Absorptionsbanden im Infrarotspektrum. Hieraus resultiert eine Querempfindlichkeit des $^{13}\text{CO}_2$ gegenüber dem $^{12}\text{CO}_2$. Diese reduziert das NDIR-Spektrometer durch einen $^{12}\text{CO}_2$ -Filter vor dem $^{13}\text{CO}_2$ -Detektor und eine interne elektronische Querempfindlichkeitskorrektur. [81] Dieses Verfahren setzten wir zur Ermittlung der OzTz sowie zur Ermittlung der kumulativen prozentualen Exhalation (CPDR= cumulative percentage dose recovery) der Tracersubstanz ein.

Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt in Form der Werte Delta-Over-Baseline (DOB) zur Ermittlung der OzTz sowie als CPDR in %. Für die Bestimmung ist zunächst die Ermittlung der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalationsrate ($^{13}\text{CO}_2\text{ER}$) notwendig. Die Berechnungen erfolgten unter Anwendung der Gleichungen gemäß Schoeller et al. (1980), Brösicke (1987), Wutzke et al. (1992) und Radke et al. (1995) [68].

Bestimmung der ^{13}C -Exszess-Dosis in mmol:

$$D = \frac{I \cdot E \cdot n}{100 \cdot M}$$

I = Tracermenge = 500mg ^{13}C -LU

E = Isotopenhäufigkeit des Harnstoffes mit ^{13}C

n = Anzahl der mit ^{13}C markierten Atome im Molekül = 1

M = Molare Masse der Tracersubstanz = 403,4g/mol

Ermittlung der $^{13}\text{CO}_2$ -kumulativen prozentualen Exhalation (CPDR):

$$^{13}\text{C-CPDR} = \frac{CO_2PR \times \Delta\delta cum \times \left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{std} \times BSA}{10 \times D}$$

CO_2PR = definierte CO_2 -Produktionsrate = $300\text{mmol/m}^2/\text{h}$

$\Delta\delta cum$ = berechnetes ^{13}C kumulativ

$\left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{std}$ = Isotopenverhältnis des $^{13}\text{CO}_2$ -Standardgases (PDB) = 0,01123

$BSA [\text{m}^2]$ = body surface area = $0,007184 \times (\text{Größe} [\text{cm}])^{0,725} \times$

$(\text{Gewicht} [\text{kg}])^{0,425}$ [82]

$D = ^{13}\text{C}$ -Exszess-Dosis

3.3.3 Die Methan- und Wasserstoffanalyse mit dem BreathTracker® von QuinTron

Die Bestimmung der Konzentration der Spurengase Wasserstoff, Methan und Kohlenstoffdioxid in den Atemtestproben der Studienteilnehmer erfolgte mit dem Atemgasanalysegerät BreathTracker® der Firma QuinTron Instrument Company Inc. Milwaukee, WI, vertrieben durch die Firma Campro Scientific, Berlin. Wasserstoff und Methan entstehen als vorherrschende Gase bei Metabolisierung von Zuckern im Darm durch Bakterien. [83] Das Verfahren findet weitverbreitet Anwendung, u.a. in der Diagnostik der bakteriellen Überbesiedlung des Dünndarms als Xylobose- oder Lactuloseatemtest, sowie bei der non-invasiven Diagnostik von Kohlenhydratmalabsorptionssyndromen. Als Beispiel hierfür seien die Laktose- und die Fruktoseintoleranz benannt. In älteren Verfahren der Atemgasanalysen wurde zumeist allein die H_2 -Konzentration als Parameter für die Interpretation von Atemtestverfahren erhoben. Nach den Ergebnissen der Untersuchung von Corazza et al. sowie Rumessen et al. [10,25] wurden für die semiquantitative Interpretation der Ergebnisse von Atemgasproben Verfahren etabliert, die sowohl die Wasserstoff- als auch die Methankonzentration erfassen. Ebenfalls von Bedeutung, insbesondere für die Durchführbarkeit der Sammlung der Proben in der Häuslichkeit durch die Probanden, ist die CO_2 -Korrektur. Die Kohlenstoffdioxidkonzentration im menschlichen Körper ist bedeutend höher als jene in der Luft. Trotz technisch korrekter und zuverlässiger Gewinnung der Atemgasproben in den hierfür vorgesehenen Beutel kann eine Kontamination mit Raumluft, die in einer Reduzierung der CO_2 -Konzentration in der Probe resultieren würde, nicht vollständig ausgeschlossen werden. [84]. Analysiert wurden die Gaskonzentration von H_2 , CH_4

und CO₂. Die Maßeinheit beträgt ppm (parts per million), wobei die Genauigkeit des Messverfahrens laut Hersteller sich im Bereich von wenigen ppm bewegt.

3.3.4 Die Auswertung der Urin- und Stuhlproben

3.3.4.1 Vorbereitung der Proben für die Auswertung

Die Probengewinnung des Urins und des Stuhls erfolgte durch die Probanden in der Häuslichkeit innerhalb eines Zeitraums von 48h bzw. 72h nach Einnahme der Tracersubstanz. Jeder Abgang von Urin wurde vollständig aufgefangen und die Menge mittels eines DIN-genormten handelsüblichen Messgefäßes, das den Probanden zur Verfügung gestellt wurde, bestimmt. Diese wurde auf dem Probenprotokoll mit Datum und Uhrzeit der Abnahme dokumentiert. Eine Menge von 15ml jeder gewonnenen Probe wurde in ein Probenröhrchen übernommen und im Anschluss sofort bei -20°C tiefgefroren. Der Transport ins Forschungslabor erfolgte unter Erhaltung der Kühlkette nach Abschluss der Sammelperiode. Zur Auswertung der Urinproben wurden diese zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Auswertung erfolgte in Erlenmeyerkolben mit Stopfeneinsatz. 5ml Urin einer Probe wurden in den Erlenmeyerkolben gegeben und im Anschluss der Stopfeneinsatz mit 1ml Borsäure versehen. Als nächsten Schritt wurden 5ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung in den Erlenmeyerkolben gegeben und sofort das Gefäß mit dem Stopfen verschlossen. In der nun folgenden chemischen Reaktion entweicht über 24h das Ammoniak (NH₃) aus der Urinprobe und bindet sich an die Borsäure. Es entsteht Ammoniumborat (NH₄)₃BO₃ [85,86].

Dieses wurde unter Zugabe von Aqua dest in eine Abdampfschale überführt und mit Salzsäure (HCl) titriert, bis ein saures Milieu erreicht ist. Die Abdampfschale mit der titrierten Lösung wurde auf die Wärmeplatte gegeben und verdampfte im Folgenden. Diese Reaktion erfolgte erneut innerhalb von 24h. Im Anschluss wurde das verbliebene Ammoniumchloridsediment unter Resuspension mit Aqua dest erneut in Lösung gebracht. Eine kleine Menge Salzsäure wurde erneut zugesetzt, um das saure Milieu beizubehalten. Von dieser resuspendierten Lösung wurden 100µl auf dünne Zinnplättchen pipettiert und zu kleinen Kügelchen gerollt.

Bei jeder Defäkation wurde die gesamte Menge an Stuhl mit einem PVC-Beutel aufgefangen und mit einer handelsüblichen Haushaltswaage, die den Probanden durch das Forschungslabor zur Verfügung gestellt wurde, das Gewicht der Stuhlportion ermittelt und protokolliert. Im Anschluss wurde die gesamte Masse manuell homogenisiert und eine Probe von ca. 3g in ein Probenröhrchen gefüllt. Auch diese Proben wurden umgehend bei -20°C tiefgefroren und analog zu den Urinproben nach Abschluss der Sammelperiode in das Forschungslabor

verbracht. Vor Analyse der Stuhlproben wurden diese bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss erfolgte die Einwaage von 5-10mg je nach Vorgabe auf jeweils 2 dünnen Zinnplättchen. Auf einer Wärmeplatte wurden die eingewogenen Proben bei 50°C getrocknet und zu kleinen Kügelchen gerollt.

Die gerollten Kügelchen aus den Zinnplättchen wurden in beiden Fällen im Elementaranalysator bei 900°C verbrannt. Dies ist allgemein notwendig bei Proben in festem oder flüssigem Aggregatzustand vor der Analyse mit dem Massenspektrometer. Bei diesem Schritt entstehen zunächst CO₂, H₂O und Stickstoff (N₂). Das ebenfalls anfallende Stickoxid (NO_x) wird im Anschluss über eine Reaktion mit Kupfer bei 600°C zu Stickstoff reduziert.

3.3.4.2 Analyse der stabilen Isotope ¹³C- und ¹⁵N mittels Isotopenverhältnismassen-spektrometrie

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der kumulativen ¹⁵N-Exkretion im Urin über 48h sowie der prozentualen ¹⁵N- sowie ¹⁵NH₃- und der ¹³C-Exkretion im Urin wurde das Verfahren der continuous flow-isotope ratio mass spectrometry (CF-IRMS) eingesetzt. Das Forschungslabor verfügt hierfür über das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer Tracer Mass 20-20® der Firma SerCon (Crewe, UK). Mit demselben Verfahren erfolgte analog auch die Auswertung der prozentualen ¹⁵N- sowie ¹³C-Exkretion im Stuhl.

Beim Isotopenverhältnis-Massenspektrometer gelangt die zu analysierende Verbindung mittels eines Einlass-Ventils aus der Atmosphäre in die Vakuumkammern. Die Ionisation erfolgt hier mittels einer Ionenquelle. Die generierten Ionen werden entlang einer elektrisch geladenen Metallplatte durch eine entstehende Spannung (U) auf eine Geschwindigkeit (v) beschleunigt. Die Geschwindigkeit ist abhängig von der Masse eines Ions (m) und seiner Ladung (g). Es ergibt sich folgender physikalischer Zusammenhang: $v = (g \times U^2 \times 2/m)^{0,5}$

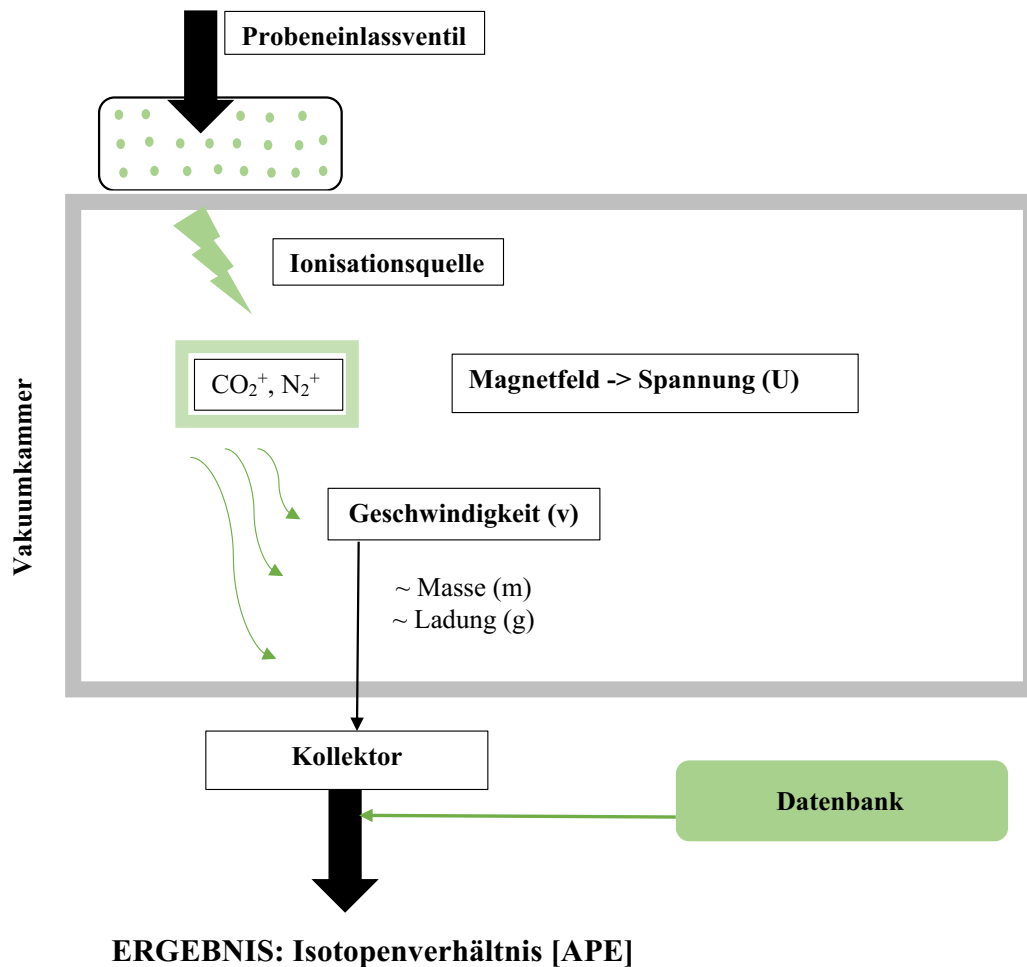


Abbildung 4: Isotopenverhältnis-Massenspektrometer

Über ein elektromagnetisches Linsensystem werden die Ionen zu einem Strahl fokussiert und in ein Magnetfeld geleitet. Nach der Lorenzkraft werden nun die Ionen entsprechend ihren Massen abgelenkt und es entstehen spezifische Kurvenverläufe. Je größer die Masse eines Ions, desto geringer ist die Ablenkung. In der 3. Kammer, dem Detektor oder auch Kollektor entsteht durch den Aufprall der Ionen ein Stromfluss, den das Massenspektrometer verstärkt und als Signale unterschiedlicher Intensität entsprechend den Massen der Ionen dargestellt. Auf diese Weise gelingt die Bestimmung des Intensitätsverhältnisses der schweren zu den leichteren Ionen der Isotope. Die Einheit des Isotopenverhältnisses wird standardisiert als Atom-%-exzess (APE) ausgedrückt.

3.3.5 Die Bestimmung der kumulativen prozentualen Exkretion von ^{13}C und ^{15}N im Urin und in den Faeces

Die Berechnung der kumulativen prozentualen Exkretion der Isotope ^{13}C und ^{15}N über 48 Stunden im Urin sowie über 72h in den Faeces erfolgte mit dem von Töwe entwickelten Pascal-Rechenprogramm [53].

Die Exzessdosis (D) der Tracersubstanz ^{15}N -LU errechnet sich aus der Anreicherung von ^{15}N in Atom-%-exzess ($APE_{^{15}\text{N-LU}}$) multipliziert mit der aufgenommenen Menge des Tracers ($I = \text{Input}$) und der Anzahl der markierten ^{15}N -Atome ($n=2$) geteilt durch das molekulare Gewicht ($MW = 404,3\text{g/mol}$) und 100 [76]:

$$D = \frac{(APE_{^{15}\text{N-LU}} \times I \times n)}{(100 \times MW)}$$

Die ^{15}N -Exkretion (E) einer bestimmten Probe ist definiert als Produkt aus der Anreicherung des ^{15}N einer Probe in Atom-%-exzess (APE_{Sample}) und dem Urinvolumen (V) bzw. der Faecesmasse (m) in ml oder g sowie der Konzentration an ^{15}N in der Probe (c_N in mg/ml oder mg/g) dividiert durch 100.

$$E = \frac{APE_{\text{Sample}} \times V(m) \times c_N}{100}$$

Die kumulative prozentuale ^{15}N - und $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion (CPE) errechnet sich aus der ^{15}N -Exkretion (E) multipliziert mit 100 und dividiert durch die Exzessdosis (D).

$$CPE = \frac{E \times 100}{D}$$

Es gilt: $D = 0,04\text{mg} = 0,00267\text{mmol}^{15}\text{N/kg}$ Körpergewicht, entsprechend $4,2\text{mg } ^{15}\text{N-LU/kg}$ Körpergewicht.

Analog zu der beispielhaft aufgeführten CPE des ^{15}N im Urin und in den Faeces, wurde unter Berücksichtigung der entsprechenden Werte die CPE des Tracers ^{13}C im Urin und in den Faeces ermittelt.

3.4 Der Versuchsablauf

Jeder der Probanden wurde jeweils am Ende einer Leerphase ohne sowie einer Phase mit Einnahme eines Gemisches aus drei unterschiedlichen Sorten resistenter Stärke untersucht. Besagtes Gemisch aus RS setzte sich aus jeweils 10g Kartoffelfaser-, 10g Markerbsen- und 10g Maisstärke verteilt auf 3 Mahlzeiten pro Tag zusammen. Kartoffelfaserstärke (KFS) enthält mindestens 12% RS Typ 1 und hat einen Ballaststoffgehalt von minimal 60%. Die verwendete Markerbsenstärke (MES) hat einen Anteil von mindestens 70% RS Typ 2 (hauptsächlich Amylose-haltige Stärke) bei jedoch deutlich niedrigerem Ballaststoffanteil von ungefähr 1%. Die Maisstärke (MS) weist 70% RS Typ 2 (Amylose-haltige Stärke) und im Gegensatz zur MES einen hohen Ballaststoffgehalt von mindestens 60% [76]. Für das in unserer Studie verwendete Stärkegemisch ergeben sich hieraus folgende Zusammensetzungen:

| Bestandteil * | Stärkegemisch (KFS/MES/MS) |
|--|----------------------------|
| Stärke insgesamt | 52,3 % (5,3 g) |
| RS Typ 1 | 4 % (0,4 g) |
| RS Typ 2 | 46,7 % (4,7 g) |
| Ballaststoffe gesamt | >40 % (> 4,0 g) |
| Protein | 2,7 % (0,3 g) |
| Kohlenhydrate | 62 % (6,2 g) |
| Fett | 0,6 % (0,1 g) |
| Wassergehalt | 12,7 % (1,3 g) |
| KFS: Kartoffelfaserstärke, MES: Markerbsenstärke, MS: Maisstärke * alle Bestandteile pro Mahlzeit mit insgesamt 10g Stärkegemisch | |

Tabelle 4: Zusammensetzung des verwendeten Gemischs aus resistenten Stärken (RS)

Von den Probanden wurden demnach täglich 30g resistente Stärke verteilt auf drei Mahlzeiten eingenommen. Hieraus ergibt sich eine Dosis der einzelnen Stärkevarianten von 3,33g auf eine Mahlzeit. Die Probanden erhielten die Anweisung, während des Untersuchungszeitraums ihre individuellen normalen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten. Hierbei war hierbei eine Orientierung der Speiseplangestaltung an den Empfehlungen der DGE zur gesunden Ernährungsgestaltung, die sich wiederum an den Empfehlungen der WHO orientiert, als

optimal zu betrachten [26]. Jede der oben benannten Phasen erstreckte sich über 16 Tage. Zwischen den Versuchsphasen war jeweils eine Auswaschphase von mindestens 5 Tagen einzuhalten. Somit erstreckte sich der gesamte Beobachtungszeitraum des einzelnen Probanden über 37 Tage. Die folgende Darstellung des Studienprotokolls soll zur besseren Veranschaulichung des Versuchsablaufs dienen:

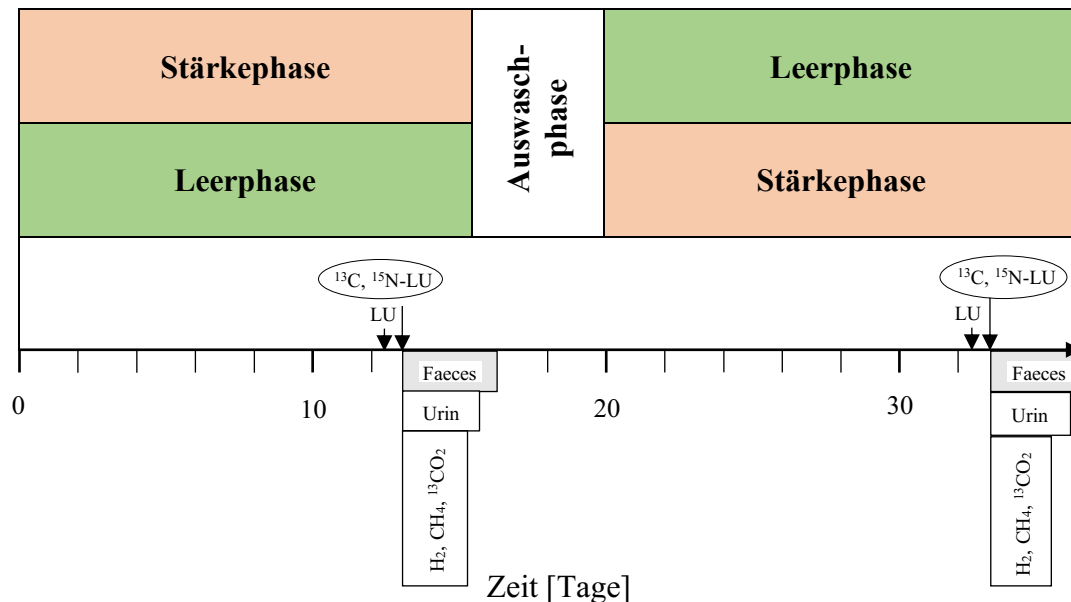


Abbildung 5: Das Studienprotokoll (schematisch)

Zehn Probanden begannen den Versuch mit der Leerphase. Sie ernährten sich über einen Zeitraum von 13 Tagen entsprechend ihrer bis dahin üblichen Essgewohnheiten. Als Vorgabe galt es hier lediglich, drei Mahlzeiten am Tag mit Orientierung an den weiter oben beschriebenen Empfehlungen der WHO bzw. DGE einzunehmen. Die andere Hälfte der Probanden startete die Versuchsreihe mit der Phase der Stäkeeinnahme. Beginnend mit dem 1.Tag der Versuchsteilnahme ergänzten sie drei Mahlzeiten am Tag durch die Einnahme von 10g des Gemisches aus resistenter Stärke in weiter oben bereits erläuteter Zusammensetzung. In Bezug auf die sonstige Zusammensetzung ihrer Speisen wurden auch diese Probanden instruiert, ihre gewöhnliche Ernährungsphilosophie weiter zu verfolgen. Als Hintergrund dieser Vorgabe ist das Bestreben nach einer konstanten intestinalen Flora und Peristaltik entsprechend der individuellen Adaptation der Probanden an ihre bisherigen Ernährungsphilosophien während der Versuchsdurchführung zu benennen. Der Einfluss der verabreichten Prebiotika auf die bakterielle Besiedlung des Darms, speziell des Zökums, und auf die Darmperistaltik dürfte von großem Interesse bei der Auswertung der Studienergebnisse sein. Eine Beeinflussung

durch eine inhaltlich veränderte Gestaltung der Mahlzeiten explizit während der Versuchsteilnahme sollte vermieden werden.

Am jeweils 12. Tag einer Versuchsphase erfolgte die Induktion des Enzyms Glucoseureidhydrolase mittels Einnahme von unmarkiertem Laktoseureid um 12 Uhr sowie um 16 Uhr und 20 Uhr. Am 13. Tag nahmen die Probanden zum Frühstück die Tracersubstanzen ^{13}C - und ^{15}N -Laktoseureid ein. Von hier an erstreckten sich die Perioden der Probensammlung, die sich abhängig vom gewonnenen Material unterschiedlich gestalteten. Das Befüllen der Atemgasbeutel begann mit der Gewinnung von zwei Leerwertproben vor Tracereinnahme. Eine halbe Stunde nach dem Frühstück samt Tracerverzehr befüllten die Probanden zwei weitere Atemgasbeutel mit einer endexpiratorischen Atemgasprobe. Dieses Procedere wurde im Folgenden über einen Zeitraum von 6 Stunden nach Tracerapplikation in halbstündlicher Taktung wiederholt. In den darauffolgenden 4 Stunden erfolgte bis einschließlich 10 Stunden post initiatum ebenfalls alle 30 Minuten die Beatmung von nun nur noch einem Probenbeutel. Schlussendlich befüllten die Versuchsteilnehmer bis 14 Stunden nach Tracereinnahme noch jeweils einen Atemgasbeutel stündlich. Die Sammlung der Atemgasproben war über den Zeitraum der initialen 6 Stunden in doppelter Ausführung notwendig, da die Auswertung der prozentualen $^{13}\text{CO}_2$ - und jene der Wasserstoff- und Methanexhalation mittels verschiedener labortechnischer Verfahren erfolgte.

Ebenfalls beginnend mit der Tracereinnahme erfolgte die Probensammlung der Medien Urin über 48 Stunden sowie Faeces über 72 Stunden zur Evaluation der renalen bzw. fäkalen ^{13}C - und ^{15}N -Exkretion als Parameter für die Entgiftung von Ammoniak durch die resistente Stärke. In den Urin- sowie Stuhlproben wurde auch die ^{13}C -Exkretion zum Vergleich mit den im Atemtestverfahren ermittelten Werten der $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation gemessen. Jeder Toilettengang in diesem Zeitraum musste mit Datum, Uhrzeit und Menge/Volumen der Probe protokolliert werden. Die gewonnenen Proben wurden bis zur Aufarbeitung im Labor bei -20°C eingefroren. Am 16. Tag des Versuchszeitraums endete mit der letzten asservierten Stuhlprobe die jeweilige Phase der Versuchsteilnahme (Leerphase bzw. Einnahme der Stärke). Es folgte in beiden Fällen eine mindestens 5-tägige Auswaschphase. Diese diente der Elimination von Restkonzentrationen der Laktoseureide bzw. gegebenenfalls der resistenten Stärke aus dem Stoffwechsel der Probanden. Im Anschluss konnte folgend mit der jeweils noch nicht absolvierten Phase des Versuches begonnen werden, an deren Ende wiederum analog zur oben beschriebenen Verfahrensweise eine insgesamt 72-stündige Phase der Probensammlung zu absolvieren war. Nach letztgenannter Phase endete der Versuch für die Probanden

3.5 Statistik

3.5.1 Das Studiendesign

Die Studie wurde nach einer Variante des Crossover-Designs durchgeführt (s. Abb. 5), in der zwei Behandlungen miteinander verglichen wurden, die jeder der rekrutierten Probanden zeitlich konsekutiv erhielt. Hierbei wechselte die Reihenfolge der Behandlungen. Die beiden Versuchsperioden wurden durch eine zwischengeschaltete Auswaschphase (Washout) unterbrochen. Jeder Proband absolvierte demnach eine Interventionsphase (Stärkephase), eine Washout-Phase und fungierte in einem weiteren Versuchsabschnitt als seine eigene Kontrolle (Leerphase). Die Zuweisung der Studienteilnehmer zur jeweiligen Sequenzgruppe der Studie (bezüglich der Abfolge der beiden Studienphasen) erfolgte alternierend.

Das gewählte Studiendesign erlaubt die Trennung zwischen Behandlungs- und Periodeneffekten und liefert zusätzlich zur Beurteilung der Wirkung der Intervention (Stärkeaufnahme) auch eine Antwort auf die Frage, ob die gewählte Dauer der Washout-Phase zwischen den Studienphasen ausreichend ist, um sicherzustellen, dass es keine - in die zweite Behandlungsphase hineinwirkenden - Überhangeffekte aus der Erstbehandlung geben kann.

3.5.2 Die statistische Datenanalyse

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden zunächst Mittelwert, Standardabweichung, und sowie Minimum, Maximum und Stichprobenumfang ermittelt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Parameter und deren Aggregate mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung untersucht.

Im nächsten Schritt der statistischen Auswertung der Ergebnisse einer Studie, die nach dem Crossover-Design durchgeführt wurde, ist es notwendig, vor der Analyse vorliegender Behandlungseffekte eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Carryover-Effekts zwischen den beiden Studienphasen zu treffen [87]. In einem vorgeschalteten T-Test für unabhängige Stichproben (bzw. Mann-Whitney U-Test - abhängig von der Verteilung der Daten) erfolgte hierfür der Vergleich der Mittelwerte der Summen eines Merkmals aus den beiden Studienphasen Leerphase und Stärkephase zwischen den Sequenzgruppen. Bei nicht signifikantem Testergebnis kann davon ausgegangen werden, dass die Washout-Phase zwischen den Studienphasen ausreichend lang gewählt worden ist. Ein signifikantes Ergebnis hingegen, bei dem die Nullhypothese verworfen werden muss, deutet auf ein Defizit in der Versuchsplanung hin. In diesem Fall erfolgt die statistische Auswertung des Behandlungseffektes nach [87] üblicherweise durch den Mittelwertvergleich der

Parameterwerte der 1. Studienphase, und zwar als Vergleich zwischen den beiden Sequenzgruppen Intervention (Stärkephase) und Kontrolle (Leerphase).

Zur Beurteilung des Behandlungseffekts nach ausreichender Auswaschphase erfolgte der Mittelwertvergleich der intraindividuellen Differenzen eines Merkmals aus den beiden Studienphasen zwischen den Sequenzgruppen mittels eines T-Tests für unabhängige Stichproben (unter Normalverteilungsannahme). Andernfalls kam der Mann-Whitney U-Test zum Einsatz.

Die Hypothesentestung erfolgte immer 2-seitig. Ergab der Levene-Test für die untersuchten Merkmale zu unterschiedlichen Messzeitpunkten Varianzhomogenität, wurde der Welch-Test zum Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Für die durchgeführten statistischen Tests wurde insofern nicht explizit anders benannt der α -Wert $\leq 0,05$ definiert. Alle genannten statistischen Testverfahren und die Erstellung der Grafiken wurden mit dem Statistikpaket IBM SPSS® Statistics 25-27 durchgeführt. Auf Grund der Machbarkeit der Studie wurde auf eine Poweranalyse verzichtet.

4 Ergebnisse

4.1 Die Wasserstoff- und Methanexhalation über einen Zeitraum von 6 Stunden

Die Untersuchung der ermittelten Werte der Aggregate der beiden Studienphasen auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab für den Parameter H₂-Exhalation, dass bei den zeitlich nah zur Tracersubstanzeinnahme gelegenen Messzeitpunkten überwiegend eine Normalverteilung der gebildeten Aggregate angenommen werden konnte. Mit zunehmendem Abstand der Probenentnahme zur Einnahme der Tracersubstanz wiesen die Ergebnisse jedoch überwiegend keine Normalverteilung mehr auf. Tabelle 5 gibt eine Übersicht zur Normalverteilung des Parameters H₂-Exhalation:

| Shapiro-Wilk-Test | Messzeitpunkte Aggregat Summe der gemessenen H ₂ - Exhalationswerte [min] | Messzeitpunkte Aggregat Differenz der gemessenen H ₂ -Exhalationswerte [min] |
|--|--|---|
| normalverteilt ($p \geq 0,05$) | LW, 30, 60, 90, 210 | LW, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 360 |
| nicht-normalverteilt ($p < 0,05$) | 120, 150, 180, 240, 270, 300, 330, 360 | 270, 300, 330 |

Tabelle 5: Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung des Parameters H₂-Exhalation

Bei dem Parameter CH₄-Exhalation ergaben sich mit Ausnahme eines Messzeitpunktes der Differenzen (Messzeitpunkt 60 Minuten nach Einnahme der Tracersubstanz) nicht-normalverteilte Werte.

Der vorgeschaltete T-Test für unabhängige Stichproben bzw. der Mann-Whitney-U-Test – je nach Verteilung der Daten – wurde an den Summen der ermittelten Werte zu den jeweiligen Messzeitpunkten durchgeführt. Für die Parameter der H₂-Exhalation ergab sich zu allen untersuchten Messzeitpunkten keine Signifikanz:

$$p(\text{Vorschalttest} - H_2) = [0,173; 0,951].$$

Für die Parameter der CH₄-Exhalation zeigte der Vorschalttest in der Untersuchung der Atemgasproben, die die Probanden vor der Einnahme der Tracersubstanz (Leerwert) sowie in den ersten 150 Minuten nach Applikation der Tracersubstanz abgegeben hatten, zu insgesamt 4 Messzeitpunkten ein statistisch signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$):

| Messzeitpunkt [min] | Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) |
|---------------------|------------------------------------|
| Leerwert (LW) | 0,034 |
| 30 | 0,016 |
| 90 | 0,012 |
| 150 | 0,034 |

Tabelle 6: Signifikante Unterschiede zwischen Leerphase (LV) und Intervention (SV) im Vorschalttest des Parameters CH₄-Exhalation

Zur statistischen Beurteilung des Behandlungseffekts der Intervention (Einnahme des Gemischs aus KFS, MES und MS) wurde abhängig von der Verteilung der Parameter entweder der T-Test für unabhängige Stichproben oder der Mann-Whitney-U-Test an den absoluten Differenzen der Mittelwerte zu den jeweiligen Messzeitpunkten durchgeführt.

Für die Exhalation von Wasserstoff ergab sich beim Vergleich der Mittelwerte bei den zur Tracereinnahme zeitlich nah gelegenen Messzeitpunkten eine bis zu 3,33ppm höhere Konzentration in der Interventionsphase (Messzeitpunkt 60min: 11,53ppm +/- 7,39 SD im LV vs. 14,86ppm +/- 11,30 SD im SV).

Dieser Effekt war mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Tracereinnahme rückläufig und zum Ende der Analyse 6h nach Einnahme der Tracersubstanz hatte sich der Mittelwert der Konzentration in beiden Versuchsreihen angeglichen (Messzeitpunkt 360min: 15,87ppm +/- 13,49 SD in der Leerphase (LV) vs. 15,75ppm +/- 13,07 SD in der Stärkephase (SV) = Interventionsphase). Die Analyse ergab zudem eine interindividuell unterschiedliche Ausprägung der expiratorisch gemessenen Wasserstoffproduktion, welche an den minimal und maximal gemessenen Konzentration zu erkennen ist (deskriptive Statistik s. Anhang).

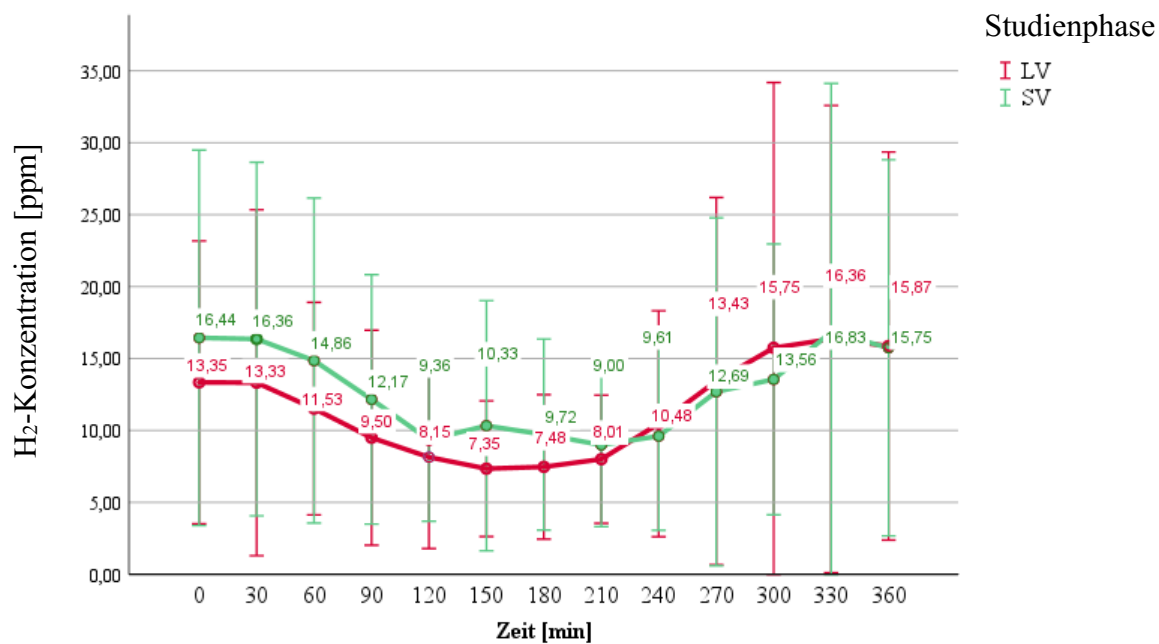


Abbildung 6: Konzentration der H₂-Exhalation zu Beginn des Analysezeitraums (LV; entspricht Zeitpunkt 0min auf der x-Achse) und über einen Zeitraum von 6h im Verlauf

Zu Beginn der Atemgasanalyse verläuft der Graph, der die Intervention (SV) repräsentiert um etwa 3ppm höher als der Graph LV. Beide Graphen erfahren dann parallel zueinander eine leichte wannenförmige Absenkung um bis zu etwa 6-7ppm bei Messzeitpunkt 150min bis 210min. Zum Ende des Untersuchungszeitraums haben beide Graphen ihr Ausgangsniveau wieder erreicht. In der statistischen Analyse der Mittelwerte ergab sich zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Effekt der Intervention gegenüber der Leerphase. Der p-Wert lag zwischen 0,209 und 0,965.

Die Auswertung der exhalativen Konzentration für CH₄ zeigte während des gesamten Analysezeitraums keinen Unterschied zwischen LV und SV. Der maximale Unterschied in den gemessenen Konzentrationen der Intervention im Vergleich zu LV betrug 2,21ppm am Messzeitpunkt 240min nach Tracereinnahme (LV 7,68ppm +/- 7,40 SD gegenüber SV 9,89ppm +/- 11,58 SD). Dieser Wert bewegt sich in der Schwankungsbreite der analytischen Genauigkeit des verwendeten Atemanalysegeräts Quintron Breath Tracker©, die mit +/- 2-3ppm angegeben wird [84]. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Unabhängigkeit der Methanexhalation von der Einnahme des Gemischs aus resistenten Stärken eindrucksvoll:

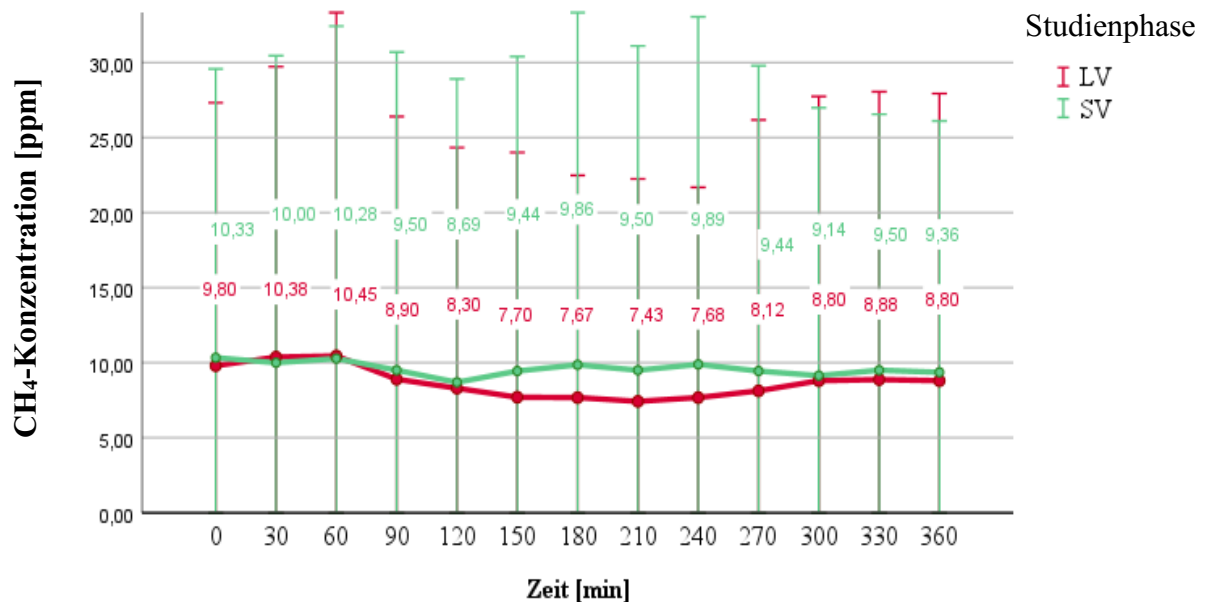


Abbildung 7: Konzentration der CH₄-Exhalation zu Beginn des Analysezeitraums (LV, entspricht Zeitpunkt 0min auf der x-Achse) und über einen Zeitraum von 6h im Verlauf

Die Graphen für den LV und den SV verlaufen über den gesamten Betrachtungszeitraum weitestgehend auf einer Linie und variieren lediglich zwischen den Messzeitpunkten 150min und 270min minimal um ihre Baseline bei etwa 10ppm. Hierbei verläuft der Graph der Interventionsanalyse ganz leicht - und permanent - über dem Graph LV. Bei Messzeitpunkt 360min verlaufen die Graphen dann bereits wieder ganz eng beieinander auf Höhe des Ausgangswerts. In der statistischen Analyse der Mittelwerte der untersuchten Messzeitpunkte zeigte sich kein signifikanter Effekt der Intervention gegenüber LV. Der p-Wert betrug zwischen 0,237 und 0,829. (Tabelle s. Anhang). Auch bei der Auswertung der Verteilungsparameter der CH₄-Exhalation fiel analog zu den Ergebnissen der H₂-Exhalation eine ausgeprägte interindividuell Schwankung der Produktion von Methan auf, welche sich im Vergleich der minimalen und maximalen Konzentrationen erkennen lässt (deskriptive Statistik siehe Anhang).

4.2 Der $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest

4.2.1 Die $^{13}\text{CO}_2$ - Häufigkeit über einen Zeitraum von 14 Stunden

Die folgende Abbildung zeigt graphisch den Verlauf der $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung während der Exhalation als Änderung über dem Ausgangswert (engl.: delta over baseline = DOB) im Vergleich zwischen LV und SV.

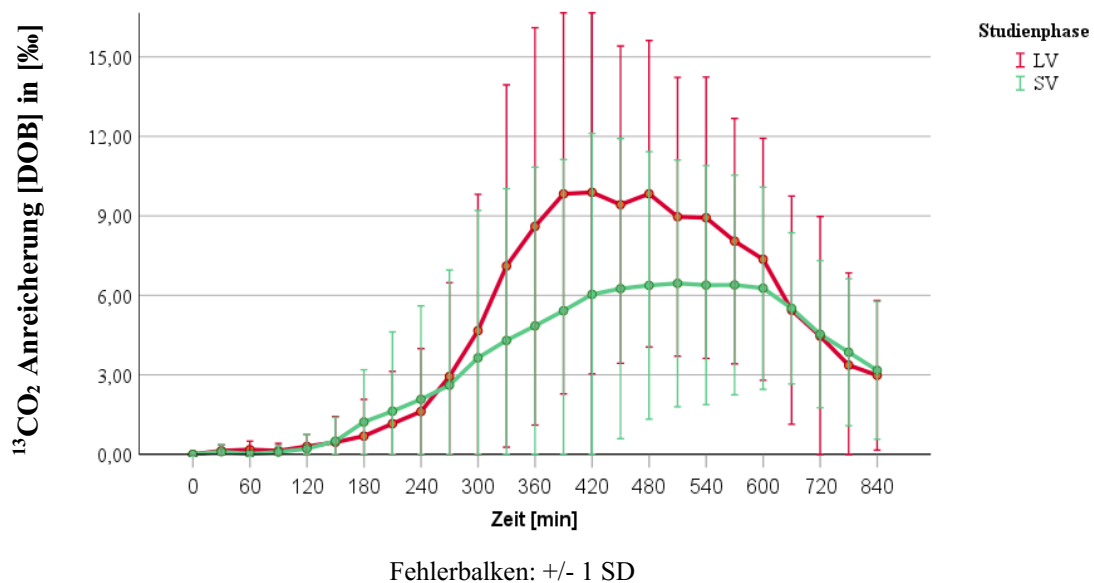


Abbildung 8: $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung in der Exhalation ohne (LV) und mit Supplementation (SV) des Gemischs aus RS nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid

Die Kurven beider Studienphasen haben ihre Basislinie definitionsgemäß zum Messzeitpunkt 0, welcher dem Entnahmezeitpunkt des Leerwertprobe vor Einnahme der Tracersubstanz [^{13}C]-Laktoseureid entspricht, bei 0‰. Beide Graphen verlaufen bis zum Messzeitpunkt 120min fast identisch zur Basislinie und steigen dann bis zum Messzeitpunkt 240min flach an. An diesem Punkt ändert sich die Kinetik der beiden Kurven. Der Graph LV zeigt nun einen deutlich steileren Anstieg, das Delta (d.h. die Änderung verglichen mit dem vorherigen Messzeitpunkt) wird größer. Das maximale DOB wird mit 9,97 ‰ mit dem Messzeitpunkt 390min erreicht. Die Mittelwerte halten hier ein Plateau bis zum Messzeitpunkt 480min. Anschließend beginnt die $^{13}\text{CO}_2$ -Konzentration wieder zu fallen. Der Graph SV steigt ab dem Messzeitpunkt 240min deutlich langsamer und flacher an und erreicht das Plateau bei ungefähr 6‰ DOB erst nach 450 min. Das maximale DOB beträgt hier 6,46‰ und damit absolut sowie graphisch betrachtet deutlich unter dem maximalen DOB des LV. Das Plateau bei der SV erstreckt sich über eine

längere Zeitspanne als bei der LV (150min gegenüber 90min). Konsistent zu der Anstiegskinetik der Kurven ergibt sich auch beim Abfall der Kurven eine langsamere Kinetik für die Kurve, die die SV-Phase repräsentiert. Mit dem Ende des Analysezeitraums haben beide Kurven das Ausgangsniveau noch nicht wieder erreicht.

4.2.2 Die kumulative prozentuale $^{13}\text{CO}_2$ -Exhalation (CPDR) nach 14 Stunden

Die CPDR des $^{13}\text{CO}_2$ wurde über einen Zeitraum von 14h im Abstand von jeweils 30min bestimmt. Die Mittelwerte dieser Analyse zeigt Abbildung 9 graphisch. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die ^{13}C -CPDR-Werte nach 14h. Es lässt sich eine ausgeprägte interindividuelle Schwankung der Werte erkennen, intraindividuell zeigen sich die ermittelten Werte jedoch konsistent.

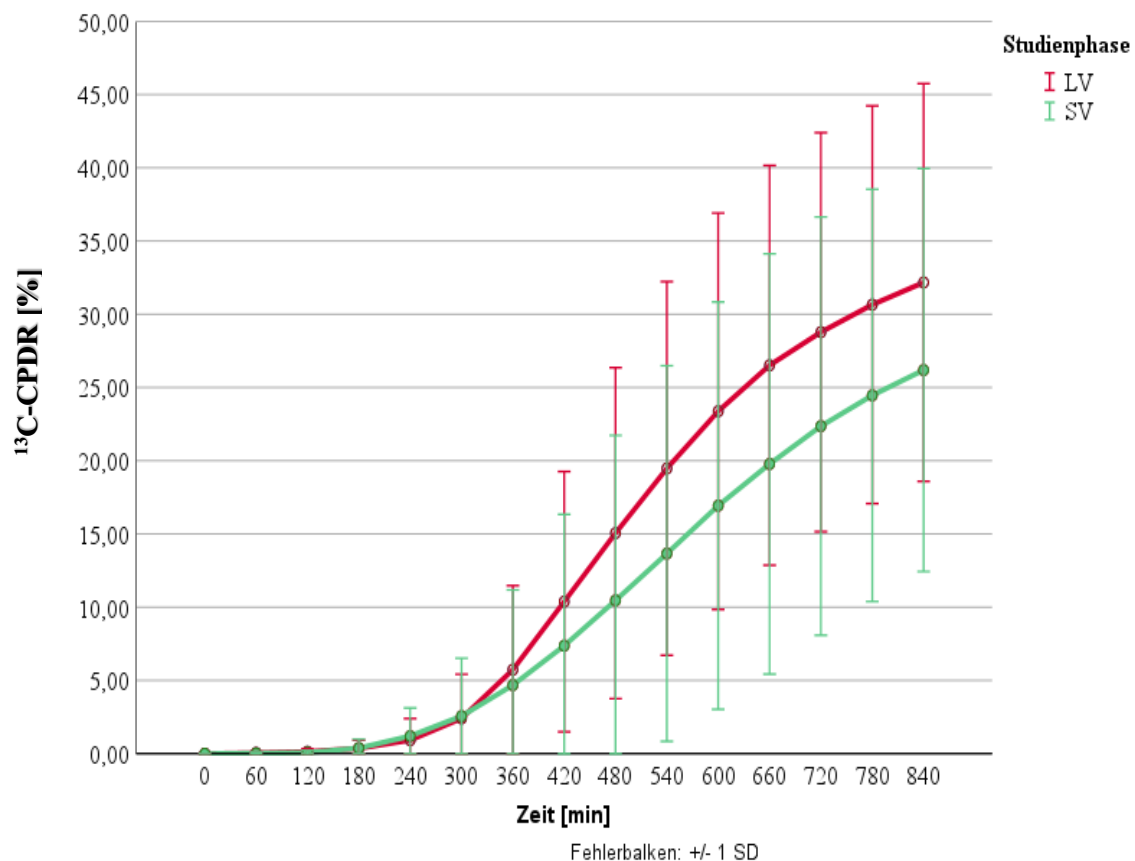


Abbildung 9: Kumulative prozentuale ^{13}C -Exhalation nach Einnahme des ^{13}C -LU im Vergleich von LV und SV nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid.

Der Ausgangswert beträgt per definitionem „0“. Die Kurven der beiden Studienphasen verlaufen zunächst parallel zur Basislinie. Im Verlauf beginnen sich beide Kurven ca. 180

Minuten nach Einnahme der Tracersubstanz (bei Zeitpunkt 0min) leicht über die Basislinie zu erheben. Im weiteren Verlauf steigt die Kurve SV mit weniger Steigung und somit langsamer an. Zwischen Messzeitpunkt 540min und Messzeitpunkt 840min, welcher das Ende des Untersuchungszeitraums darstellt, verlaufen die beiden Kurven parallel, wobei die Kurve SV sich insgesamt weniger über die Basislinie erhebt als die Kurve des LV. Beide Kurven flachen, mit einem leichten Vorsprung von LV gegenüber SV, langsam ab. Sie haben das Plateau jedoch zum Ende des Untersuchungszeitraums noch nicht erreicht.

| Proband | ¹³C - CPDR LV | ¹³C - CPDR SV |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 17,40 | 20,90 |
| 2 | 36,40 | 25,30 |
| 3 | 34,30 | 31,40 |
| 4 | 44,10 | 41,80 |
| 7 | 21,90 | 14,90 |
| 8 | 26,50 | 9,10 |
| 9 | 15,80 | 2,90 |
| 10 | 37,50 | 35,20 |
| 11 | 35,70 | 7,70 |
| 12 | 21,20 | 18,50 |
| 13 | 46,70 | 32,40 |
| 14 | - | 30,30 |
| 15 | 45,90 | 42,30 |
| 16 | 50,90 | 35,60 |
| 17 | 40,10 | 13,30 |
| 18 | 54,40 | 55,80 |
| 19 | 28,00 | 23,50 |
| 20 | 28,20 | 30,60 |
| Mittelwert (MW) | 32,17 | 26,19 |
| Standardabweichung (SD) | 13,58 | 13,76 |

Tabelle 7: ¹³C-kumulative prozentuale Exhalation (CPDR) der Probanden im Vergleich LV und SV nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid.

Die Probanden 5 und 6 der Versuchsteilnehmer absolvierten jeweils nur eine Phase der Studie und standen dann für die andere Phase nicht mehr zur Verfügung. Diese Werte sind nicht in die statistische Auswertung eingeflossen und daher an dieser Stelle nicht dargestellt. Dies wird für die kommenden Auswertungen ebenso beibehalten werden. Die Probandin 14 hat beide Studienphasen absolviert, es konnte jedoch in der LV nach 14h (Messzeitpunkt 840min) keine CPDR bestimmt werden.

Analog zum statistischen Procedere unter 4.1. erfolgte zunächst die Bildung der Aggregate aus den Werten zum Messzeitpunkt 840min (entspricht 14h). Diese wurden anschließend auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test untersucht.

| | p-Wert | statistische Verteilung |
|-------------------------------------|--------|-------------------------|
| Vorschalttest ^{13}C -CPDR | 0,831 | normalverteilt |
| ^{13}C -CPDR | 0,040 | nicht-normalverteilt |

Tabelle 8: Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung des Parameters ^{13}C -CPDR

Unter der vorliegenden Normalverteilung erfolgte die Anwendung des T-Test für unverbundene Stichproben auf die Summen des Parameters als vorgeschalteter Test zur Beurteilung der Wahrscheinlichkeit für einen Carryover-Effekt. Dieser war mit einem p-Wert = 0,214 statistisch nicht signifikant, wonach ein Carryover-Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Der Vergleich der Mittelwerte ergibt eine um 5,98 [%] geringere ^{13}C -CPDR 14h nach Einnahme des Tracers für die Phase SV. Dieser Unterschied war unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Test mit einem p-Wert = 0,003 statistisch signifikant. Abbildung 10 veranschaulicht hierzu den Unterschied der Mittelwerte zwischen SV) und LV.

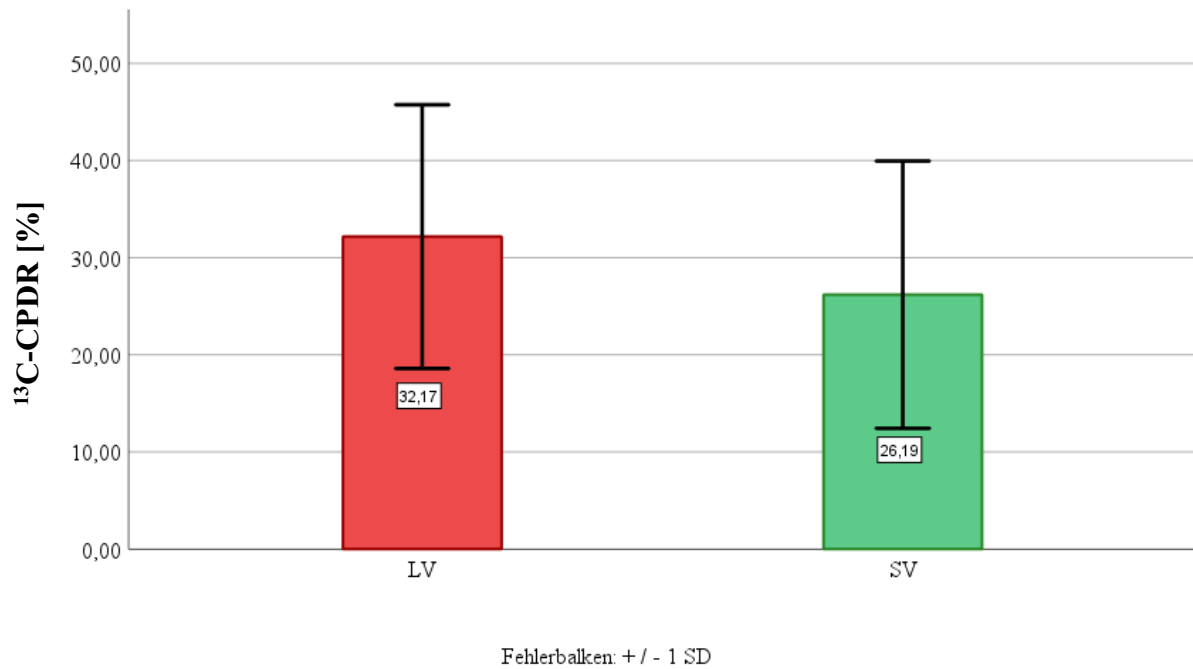


Abbildung 10: Mittelwert und einfache Standardabweichung der ^{13}C -CPDR 14h nach Einnahme der Tracersubstanz [^{13}C]-LU

4.2.3 Die oroökale Transitzeit

Die Bestimmung der oroökalen Transitzeit (OzTz) erfolgte aus dem Intervall zwischen Einnahme der Tracersubstanz [^{13}C]-Laktoseureid und dem Zeitpunkt eines erstmaligen und im Verlauf anhaltenden Anstiegs von 2 DOB in der ^{13}C -Atemgasanalyse [9] mittels FANci2. Tabelle 9 vergleicht die ermittelte OzTz in LV und in SV.

| Proband | OzTz LV [min] | OzTz SV [min] |
|-----------|---------------|---------------|
| 1 | 300 | 390 |
| 2 | 240 | 300 |
| 3 | 210 | 240 |
| 4 | 270 | 180 |
| 7 | 330 | 480 |
| 8 | 300 | 660 |
| 9 | 420 | 840 |
| 10 | 270 | 180 |
| 11 | 330 | 720 |
| 12 | 450 | 510 |
| 13 | 210 | 300 |
| 14 | 300 | 300 |
| 15 | 330 | 180 |
| 16 | 300 | 390 |
| 17 | 390 | 540 |
| 18 | 150 | 120 |
| 19 | 300 | 360 |
| 20 | 450 | 450 |
| MW | 301,6 | 396,7 |
| SD | 84,5 | 200,7 |

Tabelle 9: OzTz der Probanden sowie Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD) nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid

Der Vergleich der Mittelwerte ergab eine Verlängerung der OzTz um 95min in der Interventionsphase im Vergleich zur Leerphase. Auch in dieser Analyse zeigte sich eine erhebliche interindividuelle Schwankung der absoluten Werte aber auch im Ansprechen auf die Intervention (Einnahme des Gemischs aus RS). So lag die minimale OzTz während LV bei 150min, der maximale Wert bei 450min. Bei der SV ergab sich ein minimaler Wert von 120min gegenüber einer maximalen OzTz von 840min. Bei 4 Probanden der untersuchten Studiengruppe zeigte sich ein reverser Effekt, d.h. die OzTz war in der Interventionsphase kürzer als in der Leerphase. Bei 2 Probanden war zudem kein Unterschied zwischen LV und

SV zu erkennen. Diese Ergebnisse sollen im Verlauf Bestandteil der Diskussion sein. Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Mittelwerte graphisch:

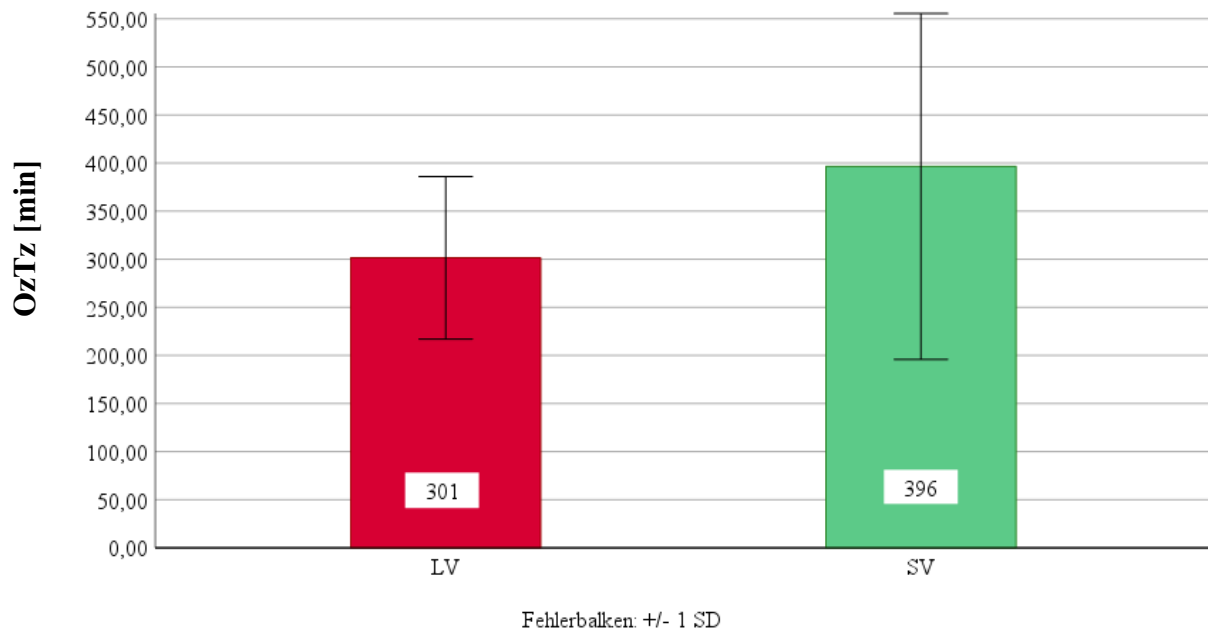


Abbildung 11: Die OzTz ohne (LV) und mit (SV) Einnahme des Gemischs aus RS nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid.

Die statistische Auswertung erfolgte erneut gemäß dem in Abschnitt 4.5 beschriebenen Vorgehen. Die Analyse der Mittelwertaggregate auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test ergab jeweils eine Normalverteilung der Werte. An beiden Aggregaten wurde demnach der T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Es ergaben sich folgende p-Werte:

| | p-Wert (T-Test) |
|--------------------|-----------------|
| Vorschalttest OzTz | 0,170 |
| OzTz | 0,028 |

Tabelle 10: p-Werte des Vorschalttests über die Wahrscheinlichkeit eines Carry-Over-Effekts und des T-Tests zur Beurteilung der Signifikanz des Behandlungseffekts

Mit einem statistisch nicht signifikanten Ergebnis im vorgeschalteten T-Test an den Summen der Mittelwerte wurde ein Carryover-Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen.

Die gefundene Verlängerung der OzTz um 95min nach Einnahme des Gemischs aus resistenten Stärken (SV) war mit dem o.g. Testergebnis statistisch signifikant. Als signifikant galten hierbei p-Werte <0,05.

4.3 Die Stickstoffexkretion

4.3.1 Die Gesamt-Stickstoffexkretion im Urin nach 48 Stunden

Tabelle 11 vergleicht die Studienphasen LV und SV hinsichtlich der Gesamtstickstoffexkretion im Urin am Ende des Untersuchungszeitraums von 48h. Abbildung 12 veranschaulicht die Ergebnisse graphisch.

| Proband | LV | SV |
|------------|--------------|--------------|
| 1 | 13,87 | 14,58 |
| 2 | 29,10 | 27,05 |
| 3 | 18,62 | 20,26 |
| 4 | 14,22 | 12,16 |
| 7 | 15,01 | 17,12 |
| 8 | 18,29 | 15,14 |
| 9 | 20,00 | 16,20 |
| 10 | 22,05 | 21,32 |
| 11 | 15,62 | 18,56 |
| 12 | 26,43 | 21,10 |
| 13 | 17,96 | 13,56 |
| 14 | 17,19 | 22,68 |
| 15 | 18,22 | 19,69 |
| 16 | 18,85 | 16,92 |
| 17 | 21,41 | 18,54 |
| 18 | 11,11 | 11,93 |
| 19 | 36,52 | 30,60 |
| 20 | 19,54 | 16,47 |
| MW | 19,67 | 18,55 |
| STD | 6,02 | 4,88 |

Tabelle 11: Gesamt-N-Exkretion im Urin in [g/48h]

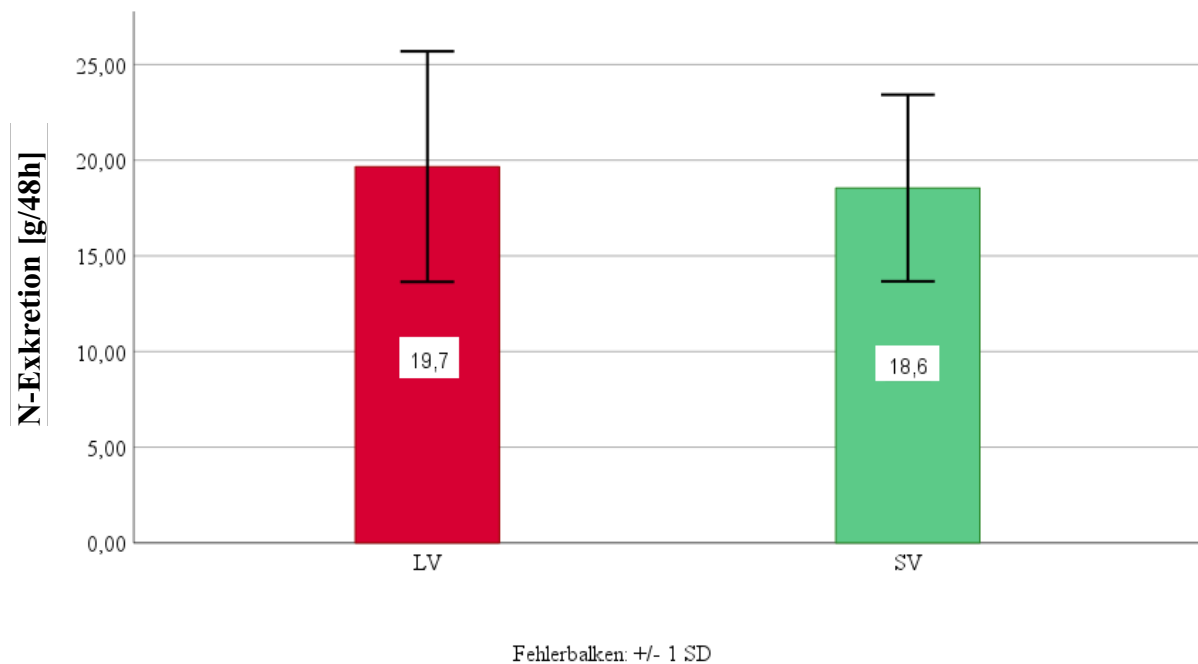


Abbildung 12: Die Gesamtstickstoffexkretion im Urin 48h im LV und nach Stärkegabe (SV).

Der Vergleich der Mittelwerte zeigt hierbei eine um 1,12g geringere Gesamtstickstoffexkretion nach Einnahme des Gemischs aus RS. Es zeigt sich eine interindividuelle Variabilität der Werte. Nach Bildung der Mittelwertaggregate, wurden diese zunächst mittels Shapiro-Wilk-Tests auf die statistische Verteilung untersucht. Das Ergebnis zeigt Tabelle 12.

| | p-Wert |
|------------------------------------|--------|
| Summe Gesamt-N-Urin-Exkretion | 0,082 |
| Differenz Gesamt-N-Urin- Exkretion | 0,075 |

Tabelle 12: Teststatistik der Untersuchung auf Normalverteilung der Gesamtstickstoffexkretion

Beide Mittelwertaggregate waren nach dem vorliegenden Ergebnis normalverteilt, sodass in der weiteren statistischen Analyse jeweils der T-Test für unverbundene Stichproben angewandt wurde. Die Ergebnisse hierzu zeigt Tabelle 13.

| | Signifikanz (p-Wert) |
|---|----------------------|
| Vorschalttest der Gesamt-N-Exkretion im Urin | 0,582 |
| Gesamt-N-Exkretion im Urin | 0,284 |

Tabelle 13: Signifikanztestung der Gesamtstickstoffexkretion im Urin

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte ein Carryover-Effekt mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da der p-Wert für das Mittelwertaggregat der Summen nicht signifikant war. Aus dem Ergebnis der Analyse der Mittelwertdifferenzen lässt sich schlussfolgern, dass die Einnahme des Gemischs aus RS die Gesamtstickstoffexkretion über den Urin nicht signifikant beeinflusst.

4.3.2 Die renale und faecale ¹⁵N-Exkretion

Tabelle 14 gibt einen Überblick über die Endwerte der ermittelten ¹⁵N-Exkretionsfraktionen [%] in den Urinproben nach 48h und in den Faeces nach 72h Analysezeitraum. Abbildung 13 veranschaulicht die Unterschiede in den Mittelwerten aus Tabelle 14 graphisch.

| | ¹⁵N-Urin-Exkretion | | ¹⁵N-Exkretion Faeces | |
|-----------|--------------------------------------|--------------|--|--------------|
| | [%] | | [%] | |
| | LV | SV | LV | SV |
| 1 | 30,08 | 37,63 | 39,39 | 53,43 |
| 2 | 39,25 | 27,66 | 17,58 | 7,63 |
| 3 | 47,59 | 27,92 | 22,55 | 26,84 |
| 4 | 36,96 | 47,44 | 25,28 | 9,28 |
| 7 | 41,98 | 34,60 | 18,08 | 44,38 |
| 8 | 35,67 | 30,96 | 40,87 | 20,12 |
| 9 | 27,50 | 19,07 | 37,32 | 11,23 |
| 10 | 24,60 | 24,07 | 60,92 | 34,94 |
| 11 | 24,67 | 26,04 | 49,00 | 65,64 |
| 12 | 35,62 | 29,98 | 29,66 | 6,52 |
| 13 | 33,77 | 9,60 | 28,31 | 32,26 |
| 14 | 48,00 | 49,07 | 9,61 | 23,43 |
| 15 | 30,24 | 29,40 | 41,56 | 17,72 |
| 16 | 36,37 | 37,45 | 19,07 | 11,81 |
| 17 | 53,48 | 36,21 | 9,26 | 1,59 |
| 18 | 35,28 | 26,38 | 28,08 | 39,66 |
| 19 | 60,20 | 40,99 | 12,14 | 8,48 |
| 20 | 40,29 | 21,55 | 16,01 | 29,99 |
| MW | 37,86 | 30,89 | 28,04 | 24,72 |
| SD | 9,63 | 9,79 | 14,35 | 17,79 |

Tabelle 14: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der ¹⁵N-Exkretion in Urin und Faeces

Für die ¹⁵N-Urin-Exkretion in der Interventionsphase (SV) war im Vergleich zum LV um 7% geringer. Die Standardabweichungen waren hierbei vergleichbar (siehe Tabelle 14). Bei der Analyse der ¹⁵N-Exkretion in den Faeces zeigte sich im SV eine um 3.32% niedrigere Ausscheidungsfraktion im Vergleich zu LV (Standardabweichung: +/- 14,35% gegenüber +/- 17,79%). In der Betrachtung der Gesamt-¹⁵N-Exkretion über beide Medien ergab sich in unserer Studie, dass sich in der Interventionsphase (SV) eine um 10% geringere

Ausscheidungsfraktion des ^{15}N beobachten ließ (siehe Abb. 13). Die kritische Betrachtung dieser Ergebnisse soll im weiteren Verlauf Teil des Diskussionsabschnitts dieser Arbeit sein.

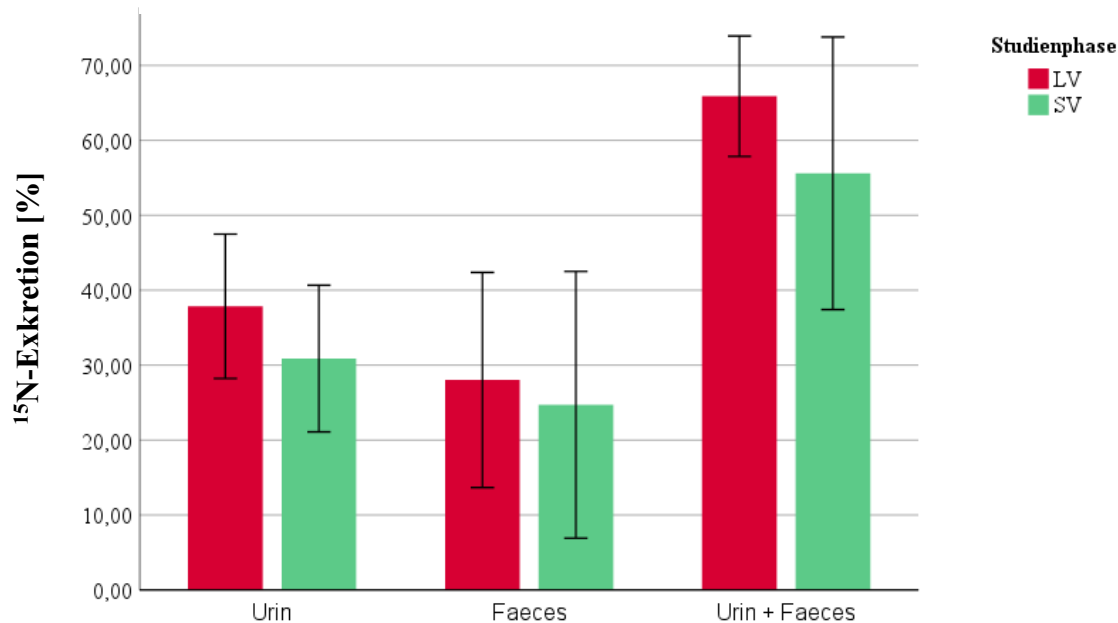


Abbildung 13: ^{15}N -Exkretion ohne (LV) und mit (SV) Supplementation des Gemischs aus RS

Im Rahmen der statistischen Analyse ergab sich unter Anwendung des Shapiro-Wilk-Test an den Aggregaten sowohl für die ^{15}N -Urin-Exkretion als auch für die faecale ^{15}N -Exkretion und für die Gesamt- ^{15}N -Exkretion eine Normalverteilung der erhobenen Werte ($p \geq 0,05$). Sowohl für die Beurteilung der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Carryover-Effekts (Vorschalttest) als auch für die Signifikanztestung des Behandlungseffekts kam somit der T-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse dieser statistischen Untersuchungen:

| | p-Wert (T-Test) |
|--|----------------------------|
| Vorschalttest ¹⁵ N-Urin-Exkretion | 0,686 |
| Vorschalttest ¹⁵ N-Faeces-Exkretion | 0,787 |
| Vorschalttest ¹⁵ N-Gesamtexkretion | 0,976 |
| ¹⁵ N-Urin-Exkretion | 0,012 |
| ¹⁵ N-Faeces-Exkretion | 0,473 |
| ¹⁵ N-Gesamtexkretion | 0,039 |

Tabelle 15: Ergebnisse der Signifikanztestung im Vorschalttest und des Behandlungseffekts für die renale und faecale ¹⁵N-Exkretion.

Ein Carryover-Effekt konnte demnach bei allen drei Parametern mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden ($p \geq 0,05$ im Vorschalttest). Bei der Betrachtung der Behandlungseffekte zeigte sich, dass die beobachtete Reduktion der ¹⁵N-Exkretion im Urin statistisch signifikant ist, während die Ergebnisse der ¹⁵N-Exkretion über die Faeces keine statistische Relevanz ergaben. Die Reduktion der Gesamt-¹⁵N-Exkretion um 10% war jedoch statistisch signifikant. Dieses Ergebnis wird im Diskussionsabschnitt dieser Arbeit erneut betrachtet werden. Als statistisch signifikant galt ein Testergebnis mit einem p-Wert $< 0,05$.

4.3.3 Die mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion im Urin

Die Analyse der Urinproben auf die mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion nach 24h ergab die in Tabelle 16 dargestellten Werte. Es wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Abbildung 14 vergleicht die Ergebnisse aus Tabelle 16 graphisch.

| Proband | LV | SV |
|-----------|-------------|-------------|
| 1 | 0,12 | 0,17 |
| 2 | 0,06 | 0,03 |
| 3 | 0,18 | 0,08 |
| 4 | 0,25 | 0,18 |
| 7 | 0,22 | 0,14 |
| 8 | 0,06 | 0,05 |
| 9 | 0,07 | 0,03 |
| 10 | 0,04 | 0,08 |
| 11 | 0,11 | 0,10 |
| 12 | 0,04 | 0,08 |
| 13 | 0,21 | 0,03 |
| 14 | 0,15 | 0,15 |
| 15 | 0,11 | 0,10 |
| 16 | 0,11 | 0,09 |
| 17 | 0,17 | 0,21 |
| 18 | 0,21 | 0,10 |
| 19 | 0,13 | 0,20 |
| 20 | 0,11 | 0,05 |
| MW | 0,13 | 0,10 |
| SD | 0,06 | 0,06 |

Tabelle 16: Die mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion im Urin [%] 24h nach Einnahme der Tracersubstanz

Der Vergleich der Mittelwerte zeigt eine um 0,03% geringere Anreicherung von $^{15}\text{NH}_3$ im Urin während der SV gegenüber dem LV bei identischen Standardabweichungen (+/- 0,06%). Auch bei diesem Parameter zeigt sich die bereits zuvor beschriebene interindividuelle Schwankung

bei der Höhe der Produktion von $^{15}\text{NH}_3$ sowie in der Reaktion auf die Verabreichung des Gemisches aus den resistenten Stärken.

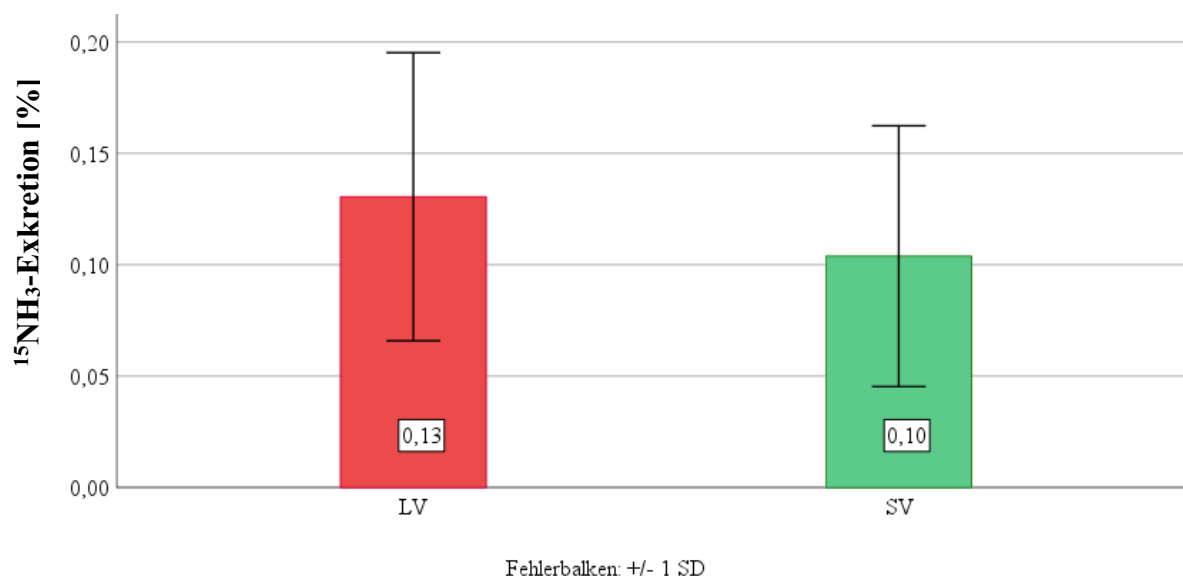


Abbildung 14: mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion ohne (LV) und mit Supplementation (SV) des Gemisches aus RS 24h nach Einnahme der Tracersubstanz

Der Shapiro-Wilk-Test ergab für die ermittelten Aggregate der Parameter jeweils eine Normalverteilung mit einem p-Wert $\geq 0,05$. Hieraus ergab sich die Anwendung des T-Test für unverbundene Stichproben sowohl für den Vorschalttest zur Beurteilung der Wahrscheinlichkeit eines Carryover-Effekts wie auch für die Beurteilung der statistischen Signifikanz des Behandlungseffekts. Die Ergebnisse dieser Signifikanztestungen zeigt Tabelle 17:

| | p-Wert (T-Test) |
|---|-----------------|
| Vorschalttest $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion | 0,714 |
| $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion | 0,124 |

Tabelle 17: Ergebnisse der Signifikanztestung der mittleren $^{15}\text{NH}_3$ -Urinexkretion nach 24h

Mit Vorliegen des statistisch nicht signifikanten Ergebnisses des Vorschalttests konnte ein Carryover-Effekt mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden

(Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,05$). Die ermittelte Reduktion der mittleren $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion im Urin nach 48h war mit einem p-Wert von 0,124 statistisch nicht signifikant. Als signifikant galten auch hier p-Werte $< 0,05$.

4.4 Die renale und faecale ^{13}C -Exkretion

Die Bestimmung des Endwertes erfolgte für die renale ^{13}C -Exkretion 48h nach Einnahme der Tracersubstanz sowie für die faecale ^{13}C -Exkretion nach 72h mittels des Rechenprogramms nach Töwe [53]. Tabelle 18 stellt die ermittelten Werte nach Studienphasen aufgeteilt dar.

| | ^{13}C -Urin-Exkretion [%] | | ^{13}C -Faeces-Exkretion [%] | |
|-----------|-------------------------------------|--------------|---------------------------------------|-------------|
| | LV | SV | LV | SV |
| 1 | 12,26 | 16,87 | 17,06 | 3,25 |
| 2 | 10,51 | 30,84 | 2,51 | 27,53 |
| 3 | 11,50 | 13,14 | 14,27 | 2,40 |
| 4 | 14,42 | 22,11 | 7,91 | 12,35 |
| 7 | 10,38 | 12,30 | 16,53 | 19,51 |
| 8 | 19,77 | 19,83 | 1,92 | 1,64 |
| 9 | 10,66 | 15,81 | 8,90 | 4,06 |
| 10 | 16,87 | 5,37 | 0,00 | 11,93 |
| 11 | 13,16 | 17,20 | 15,05 | 5,61 |
| 12 | 18,95 | 19,14 | 4,67 | 29,98 |
| 13 | 16,27 | 10,25 | 3,27 | 4,29 |
| 14 | 15,35 | 26,80 | 2,00 | 3,75 |
| 15 | 10,25 | 14,78 | 7,46 | 4,91 |
| 16 | 11,14 | 12,75 | 7,95 | 0,00 |
| 17 | 13,59 | 12,62 | 2,58 | 3,28 |
| 18 | 14,90 | 14,48 | 14,31 | 10,62 |
| 19 | 24,27 | 19,62 | 6,55 | 7,20 |
| 20 | 21,92 | 13,40 | 12,24 | 2,77 |
| MW | 14,79 | 16,52 | 8,07 | 8,40 |
| SD | 4,20 | 5,99 | 5,61 | 8,97 |

Tabelle 18: ^{13}C -Urin-Exkretion 48h [%] und ^{13}C -Faeces-Exkretion 72h [%] nach Einnahme der Tracersubstanz

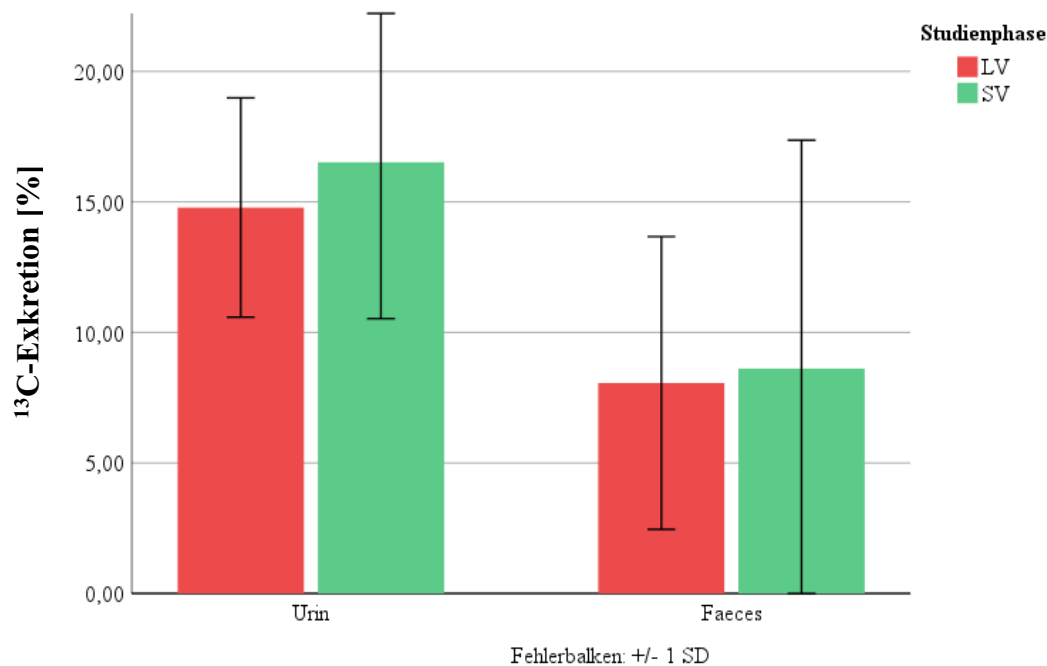


Abbildung 15: Die renale und faecale ^{13}C -Exkretion 48h bzw. 72h nach Einnahme der Tracersubstanz

Beim Vergleich der Werte aus Tabelle 18 ergab sich für die ^{13}C -Exkretion im Urin ein minimal höherer Wert in der SV gegenüber dem LV (Mittelwert: 16,52 +/- 5,99 gegenüber 14,79 +/- 4,20). Für die ^{13}C -Exkretion in den Faeces liegen die Mittelwerte sehr nahe beieinander (SV: 8,40 +/- 8,97; LV: 8,07 +/- 5,61). Es ließ sich hier praktisch kein Unterschied in der Exkretion zwischen SV und LV erkennen. Erneut zu beobachten war die interindividuelle Variabilität in Bezug auf die absoluten Werte und in der Reaktion auf die Einnahme des Gemisches aus KFS, MES und MS. Die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen spiegeln hierbei die weite Spanne zwischen den jeweiligen minimalen und maximalen Werten wider (siehe Tabelle 18).

Die Untersuchung der Aggregate auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test ergab für beide Parameter jeweils ein statistisch nicht signifikantes Testergebnis ($p \geq 0,05$). Somit konnte mit sehr geringer Irrtumswahrscheinlichkeit von Normalverteilung ausgegangen werden und es kam sowohl für die Vorschalttests als auch für Beurteilung der Signifikanz hinsichtlich des Behandlungseffekts der T-Test für unverbundene Stichproben zur Anwendung. Tabelle 19 gibt einen Überblick über diese statistischen Testergebnisse.

| | p-Werte (T-Test) |
|--|------------------|
| Vorschalttest ¹³ C-Urin-Exkretion | 0,282 |
| ¹³ C-Urin-Exkretion | 0,200 |
| Vorschalttest ¹³ C-Faeces-Exkretion | 0,904 |
| ¹³ C-Faeces-Exkretion | 0,265 |

Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analysen der renalen und faecalen ¹³C-Exkretion

Sowohl für die renale als auch für die faecale Exkretion von ¹³C ergab der Vorschalttest jeweils kein statistisch signifikantes Ergebnis. Somit kann mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ein Carryover-Effekt zwischen den beiden Studienphasen hinsichtlich der ¹³C-Exkretion ausgeschlossen werden. Die im Mittel minimal höhere renale ¹³C-Urin-Exkretion war im statistischen Vergleich der Mittelwerte nicht signifikant ($p = 0,200$). Ebenso ergab sich, wie schon aus den Mittelwerten und der graphischen Darstellung ersichtlich, hinsichtlich der faecalen ¹³C-Exkretion kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SV und LV. Für alle statistischen Testverfahren galt auch hier ein Ergebnis mit $p < 0,05$ als signifikant.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Statistische Evaluation des Studiendesigns und der Versuchsplanung

Das in dieser Studie von uns verwendete Studiendesign stellt eine Variante eines Cross-Over-Studiendesigns dar. Jeder der Probanden wurde jeweils in einer Leerphase (LV) und in einer Stärkephase (SV) untersucht. In welcher Reihenfolge die Probanden die Studienphasen absolvierten, wurde durch alternierende Zuweisung zu den Studiengruppen festgelegt. Zwischen den Studienphasen war eine mindestens 5-tägige Auswaschphase einzuhalten, um einen Carry-Over-Effekt aus der 1. Studienphase zu vermeiden. Zur statistischen Überprüfung des gewählten Studiendesigns und der Versuchsplanung wurde gemäß den von Wellek und Blettner [87] publizierten Empfehlungen zum Umgang mit Cross-Over-Studien ein statistischer Vorschalttest durchgeführt, wobei bei einem nicht signifikanten Ergebnis mit sehr großer Wahrscheinlichkeit ein Carry-Over-Effekt ausgeschlossen werden konnte. Für die in unserer Studie durchgeführten Analysen zeigte der Vorschalttest bei fast allen Parametern jeweils kein signifikantes Ergebnis, sodass belegt werden konnte, dass eine Auswaschphase von 5 Tagen zwischen den beiden Studienphasen ausreichend ist.

Zu diskutieren ist das signifikante Ergebnis des Vorschalttests für den Parameter der Methan-CH₄-Exhalation zu Beginn des Analysezeitraums. Betroffen sind die Messzeitpunkte Leerwert, 30min, 90min und 150min. Die rein statistische Interpretation müsste laut Wellek und Blettner [87] lauten, dass für die Variable der CH₄-Exhalation die Auswaschphase mit 5 Tagen nicht lang genug gewählt worden ist. In der praktischen Betrachtung und unter Berücksichtigung der möglichen Fehlerquellen bei der Auswertung der Atemtestproben (siehe Abschnitt 5.3) scheint eine zu kurz gewählte Auswaschphase jedoch nicht sehr plausibel zu sein. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass zwischen den betroffenen Messzeitpunkten wiederum weitere Messzeitpunkte untersucht wurden, bei denen der Vorschalttest nicht statistisch signifikant war. Ebenso zeigten ab dem Messzeitpunkt 180min alle Auswertungen ein nicht signifikantes Ergebnis. Eine weitere mögliche Interpretation der signifikanten Ergebnisse im Vorschalttest ist ein statistischer Fehler 1. Art (Alpha-Fehler) infolge einer großen Anzahl durchgeführter statistischer Tests. In unserer Analyse führten wir für jeden der 11 Messzeitpunkte jeweils einen statistischen Test für den Vergleich der LV und der SV durch. Das von uns definierte Alphaniveau liegt bei 0.05, welches bei der Auswertung in medizinischen Studien international allgemeiner Konsens ist. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die vereinzelt signifikanten Ergebnisse aus den Vorschalttests für die CH₄-Exhalation durch einen Alpha-Fehler entstanden sind. Man spricht in diesem Fall von einer Alphafehlerkumulierung [88]. Um die

Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen, zu reduzieren, wäre die Anwendung der Bonferroni-Korrektur eine Option gewesen [88], die jedoch in der statistischen Auswertung dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurde.

5.2 Stoffwechselprozesse und -modulation im Zökum durch resistente Stärken

Die Verstoffwechselung von ballaststoff- und amylosereichen RS führt nach heutigen Erkenntnissen zu einer breiten Modulation des Stoffwechsels im Colon - insbesondere im Zökum - mit positiven Auswirkungen auf die Beschaffenheit und Funktion der Mukosa und somit global auf die Darmgesundheit des Menschen. Die Arbeitsgruppe um Keenan et al. veröffentlichte 2015 unter dem Titel „Role of Resistant Starch in Improving Gut Health, Adiposity and Insulin Resistance“ eine Zusammenfassung ihrer bisherigen Erkenntnisse über die Wirkung von RS auf die Genexpression verschiedener Enzyme und regulatorischer Hormone im Zökum [34]. Demnach kam es in Genen zu einer gesteigerten Expression, die für Prozesse wie Zellwachstum, Zellproliferation sowie Zelldifferenzierung und Zellapoptose codieren. Auch die Genexpression von Enzymen mit Wirkung in der verbesserten Detoxifikation des Colons zeigte sich erhöht. Ebenso waren positive Effekte auf die Insulinsensitivität und die Barrierefunktion des Colons zu beobachten. Eine Auswahl an Enzymen und Hormonen, die nach Keenan et al. durch die Zufuhr von RS eine gesteigerte Genexpression zeigten, sei im Folgenden kurz beschrieben:

- Galactose-4-Epimerase als Bestandteil in den Reaktionen der Mucin-Biosynthese.
- Glutathion-S-Transferase, ein chemopräventives Enzym, das oxidativen Stress reduziert.
- Dual-specificity Protein-Phosphatase, das über eine verbesserte Stressantwort auf exogene Einflüsse einer Onkogenese im Colon entgegenwirkt.
- Neurotensin: ein Hormon, das in der Regulation der Peristaltik mitwirkt.

Die Autoren geben an, dass sie insgesamt in über 2000 Genen eine gesteigerte Expression nach definierter Zufuhr von RS beobachten konnten [34]. Die Fermentation der RS im Zökum führt zu der vermehrten Produktion von kurzkettigen Fettsäuren - insbesondere Butyrat, Propionat und Acetat - und zu einer Herabsetzung des pH-Werts. Zhou et al. zeigten in in-vitro Studien an Mäusen, dass dies zu einer gesteigerten Genexpression von Proglucagon und Peptid YY (PYY) führt [36]. Aus Proglucagon entsteht in der weiteren Verstoffwechselung Glucagon-like Peptid 1 (GLP-1). GLP-1 und PYY stimulieren die Insulinsekretion in den β -Zellen der

Langerhans'schen Inseln. Zudem scheinen sie auf das hypothalamische Appetitzentrum inhibierend zu wirken und gelten somit als Sättigungshormone [2]. Ebenfalls Zhou et al. beschrieben eine verbesserte Glucosetoleranz in Mäusen mit Diabetes, die eine Diät mit definiertem Anteil von resistenter Stärke erhalten hatten [36]. In Studien an Nagetieren konnte nachgewiesen werden, dass sich nach Einnahme von High-Amylose-Maisstärke Typ 2 (HAMRS2) die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora des Zökums und die Genexpression der Zellen der zökalen Schleimhaut deutlich verändert hatten [34,37].

5.3 Der Wasserstoff- und Methanatemtest

Nicht-invasive Wasserstoff- und Methanatemtestverfahren finden international klinisch und in der Forschung weit verbreitet Anwendung in der Diagnostik und Erforschung gastrointestinaler Stoffwechselstörungen und chronischer gastrointestinaler Erkrankungen [22,83,89–91]. Die internationale Literatur bietet derzeit jedoch nur wenig Publikationen, die explizit den Einfluss einer gezielten Supplementation von RS auf die Wasserstoff- und Methanproduktion bei gesunden Erwachsenen untersucht haben, obwohl die Effekte von RS auf die Modulation des gastrointestinalen Stoffwechsels und der potentielle Nutzen auf die Darmgesundheit und in der Prävention von sogenannten Zivilisationserkrankungen seit langem Gegenstand vieler Studien und Publikationen sind [20,29,69,76,92–98]. Diese dünne Datenlage bezüglich der exhalativen H₂- und CH₄-Konzentration nach Einnahme von RS verwundert angesichts der Erkenntnis, dass H₂ und CH₄ bei der anaeroben Fermentation von RS zu kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat und Propionat entstehen [34,89,95,99]. Die Ergebnisse der bekannten Publikationen zeigen zudem eine breite Variabilität [24,100,101]. Eine mögliche Erklärung und somit zugleich Kritikpunkt bei der Anwendung von H₂- und CH₄-Atemtestverfahren sind international uneinheitliche Standards bei der Durchführung, Auswertung und Interpretation. Diese Motivation stand im Zentrum des nordamerikanischen Consensus Meetings zu H₂- und CH₄-basierten Atemtestverfahren bei gastrointestinalen Funktionstörungen im Jahr 2017. Rezaie et al. veröffentlichten im Anschluss an diese Konferenz 26 Statements mit Empfehlungen zur Anwendung dieser Atemtestverfahren [91].

Eine Limitation der reinen H₂-Atemtestverfahren ergibt sich bei sogenannten H₂-Non-Producern. 1994 beschrieb die Arbeitsgruppe um Corazza Fälle von Malabsorption, in denen Probanden nach Einnahme von Laktose keinen Wasserstoff produzierten. [10] Hier ergaben Atemgasanalysen mit exklusiver Messung der H₂-Konzentration falsch-negative Ergebnisse, obwohl eine Verstoffwechselung der Zucker durch die Mikroflora des Darmes stattgefunden

hatte. Stattdessen war in diesen Fällen die Methankonzentration in den Atemtestproben mehr als verdoppelt gewesen. Es wurde geschlussfolgert, dass einige Menschen nach bakterieller Degradation von Zuckern im Darm zum größeren Teil oder gegebenenfalls exklusiv Methan statt Wasserstoff produzieren und über die Lungen abatmen. Ebenso kamen Rumessen et al. ebenfalls 1994 zu dem Ergebnis, dass die Genauigkeit von semiquantitativen Messungen zur Diagnose von Kohlenhydratmalabsorption verbessert wird, wenn bei Ausatmung Methan an Stelle von oder zusätzlich zu Wasserstoff bestimmt wird. [102]. D'Angelo et al. bezifferten 2013 den Anteil auf bis zu 15% der untersuchten Patienten und Probanden, auf die diese durch Corazza und Rumessen beschriebene Stoffwechselreaktion zuzutreffen scheint [83]. Etwa 5% der Menschen gelten als H₂-Non-Producer und CH₄-Non-Producer auf Grund einer physiologisch oder ggf. auch pathologisch bedingten veränderten Mikroflora des Colons [83]. In diesen Fällen gibt es keine Indikation für die Durchführung eines H₂- und CH₄-Atemtests und auch ein verlängerter Untersuchungszeitraum bringt hier keine verwertbaren Ergebnisse [83].

2015 konnten Chang et al. in ihrer Studie mit dem bis dahin größten Patientenkollektiv die Erkenntnisse und Ergebnisse der zuvor genannten Autoren bestätigen und verdeutlichen. Untersucht worden waren 14.847 Patienten mit Verdacht auf ein SIBO („SIBO = small intestinal bacterial overgrowth“). 5,4% waren Non-H₂-Non-CH₄-Producer. Von den verbliebenen Patienten hatten 17,2% einen positiven CH₄-Atemtest und deutlich niedrigere H₂-Konzentrationen in den untersuchten Atemtestproben sowie einen geringeren Anstieg der H₂-Konzentration insgesamt [22].

In unserer Studie zeigte sich nach Einnahme des Gemischs aus RS über einen Zeitraum von 15 Tagen kein signifikanter Einfluss auf die endexpiratorische Wasserstoff- und Methankonzentration über einen Zeitraum von 6 Stunden nach Beginn des Analysezeitraums im Vergleich zum Leerphase ohne Einnahme der RS (siehe Abb. 6 und Abb. 7). Unsere Ergebnisse bestätigen die Aussagen einer älteren Studie, die keine Veränderung in der exhalativen H₂- und CH₄-Konzentration nach Kurzzeitsupplementation (3 Wochen) mit RS feststellte [100]. Diesen Erkenntnissen gegenüber stehen die Ergebnisse aus dem gleichen Jahr veröffentlicht durch die Arbeitsgruppe um van Munster. Diese verglich die Wasserstoff- und Methanexkretion nach der täglichen Gabe von 45g nativer Maisstärke mit einem RS-Anteil von 62% (entspricht 28g) mit der nach täglicher Gabe von 45g Maltodextrin [101]. Eine signifikant höhere H₂- Exkretion zeigte sich sowohl in der Gesamtstudiengruppe als auch in der nicht-methanproduzierenden Untergruppe. In der Gruppe der Methanproduzenten war die H₂-

Konzentration nicht statistisch signifikant erhöht. Die Autoren erklärten dies mit einer vermehrten Einspeisung des H_2 nach Fermentation im Colon in die Methanogenese und die gesteigerte Methanproduktion bei diesen Studienteilnehmern. Dementsprechend zeigte sich in dieser Studienteilpopulation die Methankonzentration nach Einnahme der RS signifikant erhöht gegenüber der Einnahme von Maltodextrin [101].

Auch wir hatten mit Beginn unserer Studie angesichts der Wege des Abbaus und der Fermentation durch die anaerobe Flora des Colons einen signifikanten Einfluss des verwendeten Gemischs aus RS auf die Wasserstoff- und Methanproduktion vermutet. Eine mögliche Interpretation der nicht signifikanten Ergebnisse unserer Untersuchung ist die nicht erfolgte Evaluation auf den möglichen Status eines H_2 -Non-Producers bzw. eines überwiegenden Methanproduzenten, wie dies van Munster et al. getan hatten. Der nordamerikanische Konsensus empfiehlt die 8-12-stündige Nahrungskarenz vor der Durchführung des Atemtests [91]. Unsere Probanden waren angewiesen worden, die Leerwert-Atemgasproben in jeder der beiden Studienphasen jeweils vor dem Frühstück nach der Nachtruhe zu entnehmen und erst im Anschluss ihr Frühstück zu sich zu nehmen. Die Einhaltung der Studienvorschriften wie dieser und allgemein erfolgte auf Vertrauensbasis gegenüber den Probanden. Die Entnahme der Atemgasproben erfolgte durch die Probanden in der Häuslichkeit und damit ohne direkte Aufsicht durch unsere Arbeitsgruppe. Fehlerquellen können demnach in diesem Bereich liegen. Die Probanden waren bei der Einweisung auch geschult worden, die Atemgasproben nach einer etwa 5 Sekunden langen Phase des inspiratory hold (tiefes Einatmen und anschließend Verweilen in diesem Zustand für etwa 5 Sekunden vor Expiration) zu entnehmen. D'Angelo et al. empfehlen zur Minimierung der Variabilität die CO_2 -Korrektur [83], die in dem von uns verwendeten Analyseverfahren mit dem Quintron Breath Tracker SC[®] standardmäßig erfolgt. In derselben Publikation thematisiert die Arbeitsgruppe die Dauer der Lagerung der Atemgasproben und kommt zu der Empfehlung, dass eine Lagerung über 12h vermieden werden sollte, um eine Reduktion der H_2 -Konzentration durch Diffusion aus den Probenbehältnissen zu verhindern [83]. Die Autoren beschreiben jedoch die Aufbewahrung der Atemgasproben in üblichen Einmalspritzen verschlossen mit einem Kombistopfen. Wir verwendeten für die Sammlung der Atemgasproben spezielle isolierte Atemtestbeutel mit Schlauchanschluss der Firma FAN GmbH. Der Hersteller garantiert die Stabilität der in den Atemtestbeuteln gewonnenen Atemgasproben bei richtiger Lagerung (trocken, geschützt vor direkter Sonneneinstrahlung) für bis zu 7 Tage. Wir führten die Auswertung des H_2 -/ CH_4 -Atemtest spätestens nach 24-36 Stunden durch.

Erdrich et al. thematisierten 2021 in ihrer Publikation die orale Hygiene vor und während der Durchführung von H₂- und CH₄-Atemtesten. Die Patienten, die sich mit Verdacht auf eine Kohlenhydratmalabsorptionstörung oder ein SIBO vorstellten, erhielten vor der Entnahme des Leerwertes sowie je nach Studiengruppenzugehörigkeit vor und nach einer jeden Atemprobenentnahme während des Untersuchungszeitraums eine Mundspülung mit Chlorhexidin. Signifikante niedrigere Ergebnisse ergaben sich beispielsweise in der Ausgangskonzentration der H₂/CH₄-Konzentration und in der Folge zeigten sich weniger H₂/CH₄-Atemtests falsch negativ. Die Autoren schlussfolgerten, dass erhöhte Leerwertkonzentrationen durch Einfluss der oralen Mikroflora, die auch methanogene Bakterien enthalten könne, bedingt sein dürften [103]. Die orale Hygiene ist somit eine weitere möglicherweise konfundierende Variable bei der Interpretation von H₂/CH₄-Atemtesten. Die Probanden unserer Studie führten selbstständig und individuell die üblichen Mundhygienemaßnahmen durch.

5.4 Der ¹³C-Atemtest und die oroökale Transitzeit

Die Entwicklung und Evaluation von nichtinvasiven diagnostischen Verfahren ohne Einsatz radioaktiver Strahlung zur Bestimmung der oroökalen Transitzeit (OzTz) steht spätestens seit den 1980er Jahren im Fokus der Gastroenterologie und Ernährungsforschung. Insbesondere in der Pädiatrie war das Bestreben groß, möglichst wenig invasive und toxische Verfahren zur Diagnostik gastrointestinaler Absorptionsstörungen und Motilitätsstörungen bei diesen vulnerablen Patienten anzuwenden. Mittlerweile, etwa 25 Jahre nach der Erstbeschreibung durch Heine et al. [8], ist der Atemtest mit ¹³C-markierten Glycosylureiden zur Bestimmung der OzTz ein sehr gut validiertes Standardverfahren und in der Stoffwechseldiagnostik unentbehrlich geworden. Dem Forschungslabor an der Universitätskinderklinik Rostock gelang seit 1997 die Etablierung des ¹³C-Laktoseureids (¹³C-LU) als Tracersubstanz für nichtinvasive diagnostische Atemtestverfahren und die Bestimmung der OzTz [9]. Weitere internationale Arbeitsgruppen konnten die Erkenntnisse der Rostocker Arbeitsgruppe bestätigen [73,74]. Es folgten Studien, in denen unterschiedliche ¹³C-Glycosylureide als Tracersubstanz zur Bestimmung der OzTz verwendet wurden [68] sowie der Einfluss einer möglichen Enzyminduktion des Enzyms Glucoseureidhydrolase (GU-Hydrolase) untersucht wurde [66,68,70]. Dabei zeigte sich, dass auch eine niedrige Dosierung eines unmarkierten Glycosylureids ausreichend und effizient zur Induktion der GU-Hydrolase ist.

Die aus den genannten Publikationen gewonnenen Erkenntnisse über die Bestimmung der OzTz mittels ^{13}C -LU und den Mechanismen der Enzyminduktion der GU-Hydrolase nutzten wir in dieser Studie bei der Anwendung der Verfahren zur Bestimmung des Einflusses einer definierten Supplementation des Gemisches aus RS über einen Zeitraum von 15 Tagen auf die OzTz. Nach Einnahme der RS zeigte sich wie erwartet eine um 95min verlängerte OzTz (LV: 301,58 +/- 84,52 min.; SV: 396,67 +/- 200,73 min.). Dieser Effekt war in der statistischen Auswertung signifikant. Die genauere Betrachtung der großen Standardabweichung, insbesondere in der SV, lässt eine große interindividuelle Variabilität der Stoffwechselreaktion der Probanden sehr wahrscheinlich erscheinen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Beideck (geb. Mix), in deren Studie unterschiedliche Glycosylureide zur Induktion der GU-Hydrolase untersucht worden waren. Bei 4 Probanden in unserer Studie zeigte sich ein reverser Effekt, d.h. die OzTz war nach der Interventionsphase der Studie (SV) kürzer als nach der LV. Ob dies ein Ausdruck einer Variante der Stoffwechselreaktion auf die Einnahme der RS ist oder möglicherweise Fehler beim Befolgen der Studienanweisungen oder der Entnahme der Atemgasproben ursächlich sind, lässt sich an dieser Stelle nicht benennen. Bei 2 Probanden zeigte sich zudem kein Effekt auf die OzTz nach Einnahme der RS. Auch hier ist der Raum für verschiedene Interpretationen gegeben. Handelte es sich um Durchführungsfehler seitens der Probanden? Gibt es möglicherweise Non-Responder bezüglich des Einflusses des Gemischs aus RS auf die OzTz? Waren die Probanden auf Grund ihrer individuellen Ernährungsphilosophie bereits an eine ausgeprägt starke ballaststoffreiche Ernährung adaptiert, sodass eine tägliche Supplementation von 30g RS über einen Zeitraum von 15 Tagen keinen Effekt auf die OzTz bewirkte? Vorgängerstudien aus der Arbeitsgruppe Gastroenterologie und Ernährung der Universitätskinderklinik in Rostock hatten das Frühstück und das Mittagessen am Tag der Tracereinnahme und des ^{13}C -Atemtests standardisiert und vorgegeben (z.B. [66,68,98,104]). In diesem Punkt unterscheidet sich unser Studiendesign von den genannten Vorgängerstudien. Zu Beginn der Studie hatten wir uns dafür entschieden, den Probanden während der Studienteilnahme keine expliziten Vorgaben zur Ernährungsgestaltung aufzuerlegen. Die individuelle bis dahin gepflegte Ernährungsphilosophie sollte lediglich über beide Studienphasen konstant gehalten werden und sich an den Empfehlungen der WHO und der DGE orientieren [26]. Auf diese Weise sollte eine Stoffwechselumstellung und insbesondere eine veränderte Darmmotilität als Reaktion auf eine speziell für die Studienteilnahme erfolgte Ernährungsumstellung als konfundierende Variable vermieden werden.

Die in unseren Untersuchungen ermittelte durchschnittliche OzTz in der Leerphase ist mit 300 Minuten (entsprechend 5 Stunden) vergleichbar der Versuchsreihen mit Enzyminduktion der benannten Vorgängerstudien [66,70,73,104]. Die ermittelte signifikante Verlängerung der OzTz in der SV ist somit auf die Einnahme der RS und deren Einfluss auf die Stoffwechselaktivität des Colons sowie auf die intestinale Motilität zurückzuführen. Hier dürfte insbesondere die für Ballaststoffe typische verzögernde Wirkung auf die Digestion verantwortlich sein. Dies ist auch aus dem Verlauf der Kurven im Diagramm über die gemessene $^{13}\text{CO}_2$ -Häufigkeit nach Abbau des ^{13}C -LU durch die GU-Hydrolase zu erkennen. Der Graph der SV zeigt einen späteren, langsameren Anstieg, eine längere Plateauphase und eine verzögerte Rückkehr zum Ausgangsniveau. Der Vergleich der ^{13}C -CPDR 14 Stunden nach Einnahme des Tracers ^{13}C -LU zeigt zu diesem Zeitpunkt eine signifikant niedrigere Wiederfindungsrate des stabilen Isotops in der SV gegenüber dem LV. Dieses Ergebnis verdeutlicht die verzögerte Digestion nach Einnahme der RS, da mit dem Ende des Untersuchungszeitraums von 14 Stunden nach Einnahme des Tracers die ^{13}C -Anreicherung während der Exhalation deutlich niedriger ist als im Vergleich zu LV. Dies erlaubt die Interpretation, dass die Metabolisierung der Tracersubstanz im SV zu diesem Zeitpunkt noch fort dauert und daher das $^{13}\text{CO}_2$ als Stoffwechselprodukt noch nicht wieder in so hoher Konzentration in der Ausatemluft erscheint. Die Ergebnisse der kumulativen prozentualen Exhalation des ^{13}C im LV (32,17%/h) unserer Untersuchung sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Versuchsreihen mit Induktion aus der Studie von Beideck (geb. Mix) und bestätigen diese [66]. In der Betrachtung der Graphen der Darstellung der ^{13}C -Anreicherung ist zu erkennen, dass die Kurven zum Ende des Untersuchungszeitraumes beginnen abzuflachen mit einem Vorsprung für die Kurve der LV wohingegen der Verlauf der Kurve des SV langsamer erfolgt. Das Plateau wurde in beiden Studienphasen noch nicht erreicht. Bei einer längeren Untersuchungsdauer ist zu erwarten, dass sich die Graphen stetig weiter annähern und schließlich auf einem Niveau verlaufen. Die Gesamtexhalation des $^{13}\text{CO}_2$ dürfte insgesamt weder von der Enzyminduktion [66] noch von der Einnahme der RS beeinflusst werden. Über die verzögerte Digestion verlängert sich jedoch der Zeitraum bis zur Wiederfindung des $^{13}\text{CO}_2$ in der Ausatemluft.

5.5 Die ^{15}N - und $^{15}\text{NH}_3$ -Elimination

Ein Ziel dieser Studie war, unter Anwendung des Laktose- $^{15}\text{N}_2$ ureids als Tracersubstanz, den Einfluss und die Effekte der Supplementation von RS auf den Stickstoff-(N-) metabolismus des Colons zu untersuchen. Besonderes Interesse galt hierbei dem Einfluss der Einnahme des Gemisches aus RS auf die entgiftungsfördernden Stoffwechselvorgänge im Colon. Der mikrobiellen Flora des Colons obliegt unter anderem der Abbau von unverdauten Proteinen zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA = „short chain fatty acids“). Hierbei entstehen in gewissen Mengen auch potenziell toxische Metabolite wie z.B. Ammoniak. [16,65,93,105]. Publikationen der vergangenen Jahre legen nahe, dass die Fermentation von RS durch die mikrobielle Flora des Colons insbesondere über die Bildung von Butyrat zu einer Senkung des luminalen pH-Werts und zu einer Hemmung der bakteriellen Proteaseaktivität führt [106,107]. Hieraus folgt eine vermehrte Stickstoffinkorporation durch die Darmbakterien und eine gesteigerte Stickstoffelimination über die Faeces. In der Konsequenz wird weniger Stickstoff und Ammoniak über die Darmschleimhaut resorbiert und renal eliminiert [16,65,105–107]. Jackson et al. befassten sich genauer mit dem Verbleib des ^{15}N nach oraler Einnahme einer bestimmten Menge der Tracersubstanz doppelt markierten Laktose- $^{15}\text{N}_2$ ureid nach der Fermentation durch die Mikroflora des Colons [75]. Sie konnten darstellen, dass 73% des ^{15}N im Colon, am ehesten in Form von Ammoniak, primär absorbiert und über die verschiedenen Stoffwechselprozesse metabolisiert werden. Von diesen 73% werden etwa $\frac{1}{3}$ zu einfach ^{15}N -markiertem Harnstoff umgewandelt und renal ausgeschieden. $\frac{2}{3}$ aus diesem Pool verbleiben nach den Autoren im Körper und werden im Organismus weiterverwendet. Weitere 5% des ^{15}N werden in Form von doppelt ^{15}N -markiertem Harnstoff über den Urin ausgeschieden. Demnach werden 22% des ^{15}N über die Faeces eliminiert [75].

Geboes et al. zeigten im Vergleich der renalen ^{15}N -Exkretion zwischen einer Leerphase und der Einnahme von Inulin (einem nicht verdaubaren jedoch durch die mikrobielle Flora des Colons fermentierbaren Prebiotikum) eine signifikante Reduktion nach Einnahme des Inulins. Konsistent hierzu fanden sie eine gesteigerte faecale ^{15}N -Exkretion, die jedoch nicht statistisch signifikant war [16]. Cloetens et al. bestätigten die Ergebnisse von Geboes et al. hinsichtlich der renalen ^{15}N -Exkretion nach der Supplementation von RS3 [67]. Wutzke und Zipprich gelang es, eine signifikante Reduktion der ^{15}N -Urin- Exkretion im Vergleich LV versus KFS, KFS versus kommerziell erhältliche probiotische Joghurts (LC1) sowie WPS versus LC1 [64] zu zeigen. Des Weiteren gelang es den Autoren dieser Studie, eine statistisch signifikante Reduktion der renalen $^{15}\text{NH}_3$ -Anreicherung nach Einnahme von KFS zu belegen [64]. Eine

statistisch signifikante konsistente Steigerung der faecalen ^{15}N -Exkretion konnte nicht gezeigt werden. Wutzke und Scholübbers replizierten die Ergebnisse der oben genannten Studien und konnten zeigen, dass auch ein Gemisch aus KFS (RS1), WPS (RS2) und LC1 eine statistisch signifikant reduzierte renale ^{15}N -Exkretion sowie eine signifikant reduzierte $^{15}\text{NH}_3$ -Anreicherung bewirken [65]. Wutzke und Tisztli erhielten bei dem Vergleich der ^{15}N -Urin-Exkretion über 48 Stunden sowie der $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion über 24 Stunden jeweils signifikant reduzierte Ergebnisse nach der Supplementation verschiedener Typen RS. Analog zu den Vorgängerstudien war auch hier die faecale ^{15}N -Exkretion nicht signifikant erhöht [76]. Zusammengefasst belegen die benannten Studien, dass die Anwendung von doppelt-markiertem Laktose- $^{15}\text{N}_2$ ureid eine geeignete und nützliche Methode ist, den Einfluss verschiedener Kohlenhydrate auf den Harnstoff- und Stickstoffmetabolismus im proximalen Colon nichtinvasiv zu untersuchen [16,17,64,65,67,75,76].

Die Ergebnisse der renalen ^{15}N -Exkretion 48 Stunden nach der Tracereinnahme in unserer Studie bestätigen die Ergebnisse der Vorgängerstudien der Arbeitsgruppe sowie internationaler Studien [16,64,65,67,76]. Wir konnten zeigen, dass auch die Einnahme eines Gemisches aus unterschiedlichen resistenten Stärken mit einem Anteil von 46,7% RS Typ 2, etwa 4% RS Typ 1 und einem Ballaststoffgehalt von mindestens 40% die renale ^{15}N -Exkretion statistisch signifikant senkt und somit ein Stickstoff- und Ammoniak-entgiftender Einfluss der RS im Colon sehr wahrscheinlich ist. Dies verdeutlichen auch unsere Ergebnisse mit der Tendenz einer reduzierten $^{15}\text{NH}_3$ -Anreicherung im Urin trotz fehlender Signifikanz. In unserer Studie ist nicht gelungen, eine in der Konsequenz zu erwartende Steigerung der faecalen ^{15}N -Exkretion statistisch signifikant zu belegen. Die Schwierigkeit, valide und signifikante Ergebnisse bei der Gewinnung und Auswertung der Faecesproben zu erhalten und in der Folge die in negativer Korrelation erwartete Zunahme der faecalen ^{15}N -Exkretion in Probandenstudien zu belegen, ist in den hierzu forschenden Arbeitsgruppen seit Längerem bekannt. Bereits häufig beschriebene Fehlerquellen sind die vollständige Gewinnung jeder Stuhlprobe über einen Zeitraum von 3 Tagen, die suffiziente manuelle Homogenisierung der Probe, das exakte Auswiegen des Gewichts mit DIN-genormten üblichen Haushaltswaagen und das sofortige Einfrieren zu jeder Zeit nach Standard zu gewährleisten [64–66,69,76]. Dies bestätigten auch unsere Probanden. Um diese Fehlerquellen bei der Probengewinnung, der Protokollierung und der geforderten Aufbewahrung bzw. bei den Transportkriterien zu minimieren, hätten die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe die Probanden bei all diesen Schritten jeweils über mehrere Tage begleiten und beaufsichtigen müssen. Hier ergibt sich sehr schnell die Frage nach der Umsetzbarkeit und der

Verhältnismäßigkeit der den freiwilligen Probanden zumutbaren Eingriffe in die intimste Privatsphäre. Wir entschieden uns für eine ausführliche Aufklärung und Instruktion der Probanden vor Beginn der Studie und hielten jederzeit einen Ansprechpartner aus unserer Arbeitsgruppe verfügbar. Dies ermöglichte eine zufriedenstellende Vertrauensbasis beiderseits und führte zu einer guten Compliance der Probanden.

Die in unserer Studie gefundene statistisch signifikant reduzierte Gesamt- ^{15}N -Exkretion im SV über die beiden analysierten Medien Urin und Faeces zusammenbetrachtet stellt ein überraschendes Ergebnis dar und war so nach Kenntnis der Ergebnisse aus der internationalen Literatur nicht erwartet worden. Es ist davon auszugehen, dass dieses signifikante Ergebnis in Folge des konfundierenden Einflusses der interindividuellen Variabilität der Messergebnisse unserer Probanden (siehe Tabelle 13) im Zusammenspiel mit den Fehlerquellen bei der Probengewinnung des Mediums Faeces (siehe oberer Abschnitt) entstanden ist und somit als falsch positiv gewertet werden sollte. Unsere These hatte gelautet, dass nach der Einnahme des Gemisches aus RS die renale ^{15}N -Exkretion wie ermittelt signifikant sinkt und eine Verschiebung zu einer gesteigerten faecalen ^{15}N -Exkretion als messbares Korrelat zu einer gesteigerten Stickstoffinkorporation durch die mikrobielle Flora des Colons erfolgt. Durch die negative Korrelation zwischen ^{15}N -Urin- und ^{15}N -Faeces-Exkretion sollte die Gesamt- ^{15}N -Exkretion konstant sein [16,17,66,76]. Unsere Ergebnisse zeigen eine minimale und statistisch nicht signifikante Reduktion der faecalen ^{15}N -Exkretion. Die benannte negative Korrelation zwischen renaler und faecaler ^{15}N -Exkretion vorausgesetzt, wäre eine Erhöhung der faecalen ^{15}N -Exkretion notwendig gewesen, um das Gleichgewicht der Gesamt- ^{15}N -Exkretion statistisch belegen zu können. Unter Berücksichtigung der bereits angeführten Fehlerquellen bei Gewinnung der Stuhlproben und deren konfundierenden Einflüssen, kann in vivo mit großer Wahrscheinlichkeit von einem Gleichgewicht der Gesamt- ^{15}N -Exkretion ausgegangen werden. Eine Retention des Markers ^{15}N im Stickstoffpool des Menschen ist hingegen nicht wahrscheinlich, wie die genannten Vorgängerstudien bereits belegt haben.

Unsere Ergebnisse unterstreichen frühere Erkenntnisse insbesondere aus den Arbeitsgruppen in Rostock und Leuven [16,17,57,63–65,69,70,76], dass oral verabreichtes $^{15}\text{N}_2$ -LU eine geeignete, validierte und insbesondere gut verträgliche Tracersubstanz für die nichtinvasive Untersuchung des Stickstoffmetabolismus des Colons ist. Zudem konnten wir den positiven Einfluss des von uns verabreichten Gemisches aus ballaststoffreichen und amylosehaltigen resistenten Stärken auf die Stickstoffelimination und die Ammoniakentgiftung im Colon belegen. Der statistisch signifikante Nachweis, dass es nach Verabreichung von resistenten

Stärken über die vermehrte Stickstoffinkorporation der mikrobiellen Flora des Colons zu einer gesteigerten ^{15}N -Exkretion über die Faeces kommt, während die renale ^{15}N - und $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion sinkt, konnte auch durch unsere Studie nicht erbracht werden. Hierfür bedarf es weiterer Studien mit insbesondere exakteren Möglichkeiten der Homogenisierung der Stuhlproben.

5.6 Die renale und faecale ^{13}C -Exkretion

Unsere Ergebnisse haben ergeben, dass die renale wie die faecale ^{13}C -Exkretion durch die Einnahme des Gemisches aus RS nicht statistisch signifikant beeinflusst wird. Die renale ^{13}C -Exkretion 48h nach Tracereinnahme ermittelten wir mit 14,8% (LV) bzw. 16,5% (SV). Hier stimmen unsere Ergebnisse mit den Erkenntnissen einer früheren Studie überein, nach denen zu erwarten ist, dass ein Anteil von 15% der Dosis der Tracersubstanz ^{13}C renal eliminiert wird. Demgegenüber soll die ^{13}C -CPDR über die Ausatemluft 85% betragen [108]. Unsere Ergebnisse zeigen eine ^{13}C -CPDR nach 14h von 32,17% +/-SD im LV bzw. 26,19% +/-SD im SV. Im Vergleich zu Morrison et al. [108], die die ^{13}C -CPDR über einen Zeitraum von 20 Stunden ermittelt hatten, betrug unser Analysezeitraum nur 14 Stunden, sodass die absoluten Messwerte nicht miteinander vergleichbar sind. Morrison et al. hatten aus ihren Studienergebnissen zudem geschlossen, dass der Tracer ^{13}C nicht über die Faeces ausgeschieden wird, hatten die faecale ^{13}C -Exkretion jedoch nicht bestimmt. Wir konnten ermitteln, dass von der Einnahme des Gemisches aus RS unbeeinflusst – etwa 8% des ^{13}C nach 72 Stunden in den Faeces erscheinen. Dieser Wert bestätigt in seiner Dimension die Ergebnisse von Beideck (geb. Mix), die ebenfalls die faecale ^{13}C -Exkretion nach Verabreichung von [$^{13}\text{C};^{15}\text{N}$]-LU als Tracersubstanz bestimmt hatte [66].

Die Gesamt- ^{13}C -Elimination über die untersuchten Medien Ausatemluft, Urin und Faeces unserer Studie betrug 55,03% im LV gegenüber 51,11% im SV und ist in Bezug auf den LV vergleichbar mit den Ergebnissen von Beideck (geb. Mix) [66]. Da sich die renale und faecale ^{13}C -Exkretion im Vergleich der beiden Studienphasen nicht signifikant unterscheiden, ist die Reduktion der Gesamt- ^{13}C -Elimination auf den bereits unter 5.3 diskutierten verzögernden Einfluss der resistenten Stärke auf die Digestion und die damit verbundene Rechtsverschiebung der ^{13}C -CPDR im CO_2 -Atemtest zurückzuführen. Weiterhin nicht detailliert erforscht ist, welcher Anteil des ^{13}C jeweils über einen bestimmten Pfad der komplexen Stoffwechselwege eliminiert wird und welchen Einflussfaktoren hier eine Bedeutung zukommt. Einflussfaktoren könnten die körperliche Aktivität während des Analysezeitraums und der Anteil an ^{13}C , der in

vivo irreversibel den Bicarbonatpool erreicht, sein [108]. Als belegt gilt in der internationalen Fachliteratur, dass der überwiegende Anteil des Tracers ^{13}C exhalativ in Form von $^{13}\text{CO}_2$ eliminiert wird [8,9,66,68,75,108]. Morrison et al. wendeten in ihrer Studie Korrekturfaktoren für das Level der physischen Aktivität und die Bicarbonat-Exhalation bei der CPDR an. Resultierend hieraus erhielten sie eine Gesamt- ^{13}C -Exhalation von gerundet 96% [108]. Korrekturfaktoren kamen in unserer Auswertung der Studienergebnisse nicht zur Anwendung.

6 Zusammenfassung

Ziel unserer Studie war, neue Erkenntnisse über den Einfluss ballaststoffreicher resistenter Stärken auf den Stickstoffmetabolismus und die Ammoniakentgiftung im Colon sowie auf die Darmmotilität und die Digestion über die Bestimmung der oroökalen Transitzeit zu erlangen. Zudem interessierte uns der Einfluss der Supplementation unseres Stärkegemisches auf die Wasserstoff- und Methanbildung durch die anaerobe Flora des Colons. Es handelte sich um eine Studie, die an freiwilligen Probanden durchgeführt wurde, die bereit waren, sich über einen Zeitraum von knapp 6 Wochen zur Verfügung zu stellen, die resistente Stärke als Trockensubstanz zu sich zu nehmen und die aufwendige Probengewinnung durchzuführen. Angesichts dieser Umstände sollte die Untersuchungsverfahren ausnahmslos nichtinvasiv erfolgen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen, dass Laktose-[^{13}C]ureid und Laktose-[$^{15}\text{N}_2$]ureid valide und sehr gut verträgliche Tracersubstanzen für die nichtinvasive Untersuchung der OzTz bzw. des Stickstoff- und Ammoniakmetabolismus im Colon sind.

Erneut ist es nicht gelungen, in einer Probandenstudie an Freiwilligen die aus einer Reduktion der renalen ^{15}N -Exkretion bereits in mehreren Studien geschlussfolgerte gesteigerte ^{15}N -Exkretion nach 72-stündiger Probengewinnung über die Faeces nach Supplementation resistenter Stärken statistisch signifikant zu belegen. Als Hauptfehlerquelle ist hierbei die nicht exakt zu gewährleistende manuelle Homogenisierung der Stuhlproben zu benennen. Weiterführende Forschung sollte daher die Bemühungen intensivieren, dieses Verfahren unter Berücksichtigung der Zumutbarkeit für die Probanden zu optimieren.

Bisherige Studien hatten den entgiftungsfördernden Einfluss der Prebiotika und der zu diesen gehörenden resistenten Stärken in Studiendesigns untersucht, die jeweils Monosubstanzen miteinander und/oder mit einer Leerphase verglichen hatten [16,17,64,65,67,69,76]. Die Verwendung des von uns gewählten Gemisches aus drei verschiedenen Stärken, die sich im Anteil der Typen RS und zu dem im Ballaststoffanteil unterscheiden, ergab vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss auf die Stickstoff- und Ammoniakelimination über den Urin und die Faeces. Wir konnten belegen, dass die OzTz nach Einnahme unseres Stärkegemisches signifikant verlängert wird und schlussfolgern, dass ballaststoffreiche resistente Stärken die Digestion im Colon verzögern. In unserer Studie zeigte sich zudem, dass die H_2 - und CH_4 -Bildung durch Fermentationsprozesse anaerober Bakterien des Colons durch die hochdosierte Supplementation der RS nicht beeinflusst wird. Die kombinierte, komplexe Untersuchung des Einflusses des Stärkegemisches auf die Fermentationsprozesse im Colon ist

in dieser Form in der internationalen Literatur bisher nicht beschrieben und stellt daher ein Novum dar. Unsere Ergebnisse dürften die bisher erlangten Erkenntnisse hierzu erweitern und verdeutlichen die Notwendigkeit, in zukünftigen Studien die komplexen Zusammenhänge und Stoffwechselfade der Fermentation resistenter Stärken weiter zu untersuchen.

Das in unserer Studie verwendete Gemisch aus RS spiegelt die Alltagsrealität mit einer in der Bevölkerung überwiegend konsumierten Mischkost überzeugender wider als die in den erwähnten Vorgängerstudien verabreichten Monosubstanzen. Unsere Ergebnisse leisten daher einen wichtigen Beitrag zu einer besseren ökologischen Validität der resistenten Stärken, das heißt sie verbessern die Gültigkeit der Forschungsergebnisse für das Alltagsgeschehen [109].

7 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, et al. Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Thieme; 2007.
2. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. 8. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2007.
3. Rassow J (Hrsg.) Duale Reihe Biochemie: 50 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2008.
4. Schiebler TH, Korf HW. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs. 10. Aufl. Darmstadt: Steinkopff Verlag; 2007.
5. Silbernagl S, Despopoulos A, Gay R, Rothenburger A. Taschenatlas Physiologie. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2007.
6. Bond JH, Levitt MD, Prentiss R. Investigation of small bowel transit time in man utilizing pulmonary hydrogen (H₂) measurements. J Lab Clin Med 1975; 85: 546–55
7. Bond JH, Levitt MD. Effect of dietary fiber on intestinal gas production and small bowel transit time in man. Am J Clin Nutr 1978; 31: 169–74
8. Heine WE, Berthold HK, Klein PD. A novel stable isotope breath test: ¹³C-labeled glycosyl ureides used as noninvasive markers of intestinal transit time. Am J Gastroenterol 1995; 90: 93–8.
9. Wutzke K, Heine W, Plath C, Leitzmann P, Radke M, Mohr C, Richter I, Gülzow H, Hobusch D. Evaluation of oro-coecal transit time: a comparison of the lactose-[¹³C, ¹⁵N]ureide ¹³CO₂- and the lactulose H₂-breath test in humans. Eur J Clin Nutr 1997; 51: 11–9.
10. Corazza GR, Benati G, Strocchi A, Malservisi S, Gasbarrini G. The possible role of breath methane measurement in detecting carbohydrate malabsorption. J Lab Clin Med 1994; 124: 695–700
11. Madsen JL, Larsen NE, Hilsted J, Worning H. Scintigraphic determination of gastrointestinal transit times. A comparison with breath hydrogen and radiologic methods. Scand J Gastroenterol 1991; 26: 1263–71
12. Slavin J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and health benefits. Nutrients 2013; 5: 1417–35.
13. Adam A. Über Darmbakterien. Z Kinderheilkd. 1922; 31: 331–66.

14. Gordon JL, Ley ROE, Wilson R, Mardis E, Xu J, Fraser CM, Relman DA. Extending our view of self: the human gut microbiome initiative (HGMI). St. Louis, Rockville, Palo Alto; 2011. Verfügbar unter:
<https://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/HGMISeq.pdf>
15. Amboss. Aminosäurestoffwechsel. In: AMBOSS. 2021 [zitiert 17. Mai 2021]
16. Geboes KP, De Preter V, Luypaerts A, Bammens B, Evenepoel P, Ghooos Y, Rutgeerts P, Verbeke K. Validation of lactose-[¹⁵N,¹⁵N]ureide as a tool to study colonic nitrogen metabolism. *Am J Physiol-Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: 994–9
17. Geboes KP, De Hertogh G, De Preter V, Luypaerts A, Bammens B, Evenepoel P, Ghooos Y, Geboes K, Rutgeerts P, Verbeke K. The influence of inulin on the absorption of nitrogen and the production of metabolites of protein fermentation in the colon. *Br J Nutr* 2006; 96: 1078–86.
18. Amboss. Kohlenhydrate. In: AMBOSS. 2021 [zitiert 17. Mai 2021]
19. Braden B. Methods and functions: Breath tests. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 337–52
20. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Léotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010; 104: 1–63.
21. Kröninger L. Schlüsselenzyme der Methanogenese und der Energiekonservierung im Darmbewohner *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Dissertation. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2018. Verfügbar unter: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:5n-51440>
22. Chang BW, Chua KS, Lin E, Chang C, Pimentel M. Understanding the significant interaction between hydrogen and methane in the performance and interpretation of breath testing. *Gastroenterology* 2015; 148: 729
23. Hammer K, Hasanagic H, Memaran N, Huber WD, Hammer J. Relevance of methane and carbon dioxide evaluation in breath tests for carbohydrate malabsorption in a paediatric cohort. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2021; 72: 71–7
24. Rumessen JJ. Hydrogen and methane breath tests for evaluation of resistant carbohydrates. *Eur J Clin Nutr* 1992; 46 [Suppl 2]: 77-90
25. Rumessen JJ, Nordgaard-Andersen I, Gudmand-Høyer E. Carbohydrate malabsorption: quantification by methane and hydrogen breath tests. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 826–32

26. Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (Hrsg.). DGE-Positionspapier: Richtwerte für die Energiezufuhr aus Kohlenhydraten und Fett. 2011. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/fileadmin/public/doc/ws/position/DGE-Positionspapier-Richtwerte-Energiezufuhr-KH-und-Fett.pdf>
27. Englyst HN, Trowell H, Southgate DA, Cummings JH. Dietary fiber and resistant starch. *Am J Clin Nutr* 1987; 46: 873–4
28. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401–12
29. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17: 259–75
30. Rodeck B, Zimmer KP (Hrsg.) Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung. 2. Aufl. 2013. Berlin: Springer; 2013
31. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, (Hrsg.) Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization; 2006
32. Englyst H, Wiggins HS, Cummings JH. Determination of the non-starch polysaccharides in plant foods by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *The Analyst* 1982; 107: 307–18
33. Englyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, Cummings JH. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *Br J Nutr* 1996; 75: 749–55
34. 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 Bethesda Md* 2015; 6: 198–205
35. Kern, C. Resistente Stärke: gesundheitliches Potential? 2020 [zitiert 10. Mai 2021]. Verfügbar unter: <https://www.forum-ernaehrung.at/artikel/detail/news/detail/News/resistente-staerke-gesundheitliches-potenzial/>
36. Zhou J, Martin RJ, Tulley RT, Raggio AM, McCutcheon KL, Shen L, Danna SC, Tripathy S, Hegsted M, Keenan MJ. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* 2008; 295: 1160–6
37. Wong THT, Louie JCY. The relationship between resistant starch and glycemic control: A review on current evidence and possible mechanisms: Resistant starch and

- glycemic control. *Starch - Stärke* 2017; 69: 1600205.
38. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Hrsg.) Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Rome 1997. Rome: World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1998
 39. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr* 1981; 34: 362–6
 40. Bützer P. Glykämischer Index. 2019. Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/331866119_Glykamischer_Index
 41. Hauner H. Glykämischer Index und Glykämische Last. München; 2017 [zitiert 15. Mai 2021]. Verfügbar unter: https://www.mri.tum.de/sites/default/files/seiten/glykaemischer_index.pdf
 42. Strohm D. Glykämischer Index und glykämische Last – ein für die Ernährungspraxis des Gesunden relevantes Konzept? Wissenschaftliche Stellungnahme der DGE. *Ernahrungs Umschau* 2013; 60: M26-M38
 43. Venn BJ, Green TJ. Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships. *Eur J Clin Nutr* 2007; 61 [Suppl 1]: 122-131
 44. Koletzko B, Demmelmair H, Hartl W, Angelika Kindermann, Koletzko S, Sauerwald T, Szitanyi P. The use of stable isotope techniques for nutritional and metabolic research in paediatrics. *Early Hum Dev* 1998; 53: 77–97
 45. Eckart J, Wolfram G, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Künstliche Ernährung, (Hrsg.). Stabile Isotope in der Ernährungsforschung: Workshop I und II ; 6. gemeinsame Jahrestagung DAKE/AKE, Augsburg, 1987. München: Zuckschwerdt; 1988
 46. Wada E. Stable delta(¹⁵)N and delta(¹³)C isotope ratios in aquatic ecosystems. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85: 98–107
 47. Bier DM, Matthews DE. Stable isotope tracer methods for in vivo investigations. *Fed Proc* 1982; 41: 2679–85
 48. Mohr C, Heine WE, Wutzke KD. *Clostridium innocuum*: a glucoseureide-splitting inhabitant of the human intestinal tract. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1472: 550–4
 49. Plath C, Heine W, Wutzke K, Krienke L, Töwe J, Massute G, Windischmann C. ¹⁵N Tracer kinetic studies on the validity of various ¹⁵N tracer substances for determining whole-body protein parameters in very small preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol*

- Nutr 1987; 6: 400–8
50. Plath C, Heine W, Wutzke K, Uhlemann M. ^{15}N -Tracer studies in formula-fed preterm infants: the role of glycine supply in protein turnover. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1996; 23: 287–97
 51. Radke M, Heine W, Wutzke K, Leitzmann P, Walther F. Tracer kinetic studies on a methionine-supplemented soy-based infant formula using ^{13}C - and ^{15}N -methionine as tracers. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995; 21: 209–14
 52. Radke M, Wutzke K, Heine W. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic children determined by ^{13}C -urea breath test. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1995; 20: 463
 53. Töwe J, Richter I, Plath Ch, Heine W, Wutzke K, Kundt G. Originalarbeiten: Zur Auswertung experimenteller Daten der ^{15}N -Tracertechnik in der Medizin. Isot Environ Health Stud 1984; 20: 87–9
 54. Wutzke KD, Radke M, Breuel K, Gurk S, Lafrenz JD, Heine WE. Triglyceride oxidation in cystic fibrosis: a comparison between different ^{13}C -labeled tracer substances. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 29: 148–154
 55. Wutzke K, Heine W, Plath C, Müller M, Uhlemann M. Whole-body protein parameters in premature infants: a comparison of different ^{15}N -tracer substances and different methods. Clin Nutr Edinb Scotl. 1993; 12: 114–5
 56. Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotope use. Eur J Pediatr 1997; 156 [Suppl 1]: 12–17
 57. De Preter V, Houben E, Windey K, Luypaerts A, Verbeke K. Analysis of the urinary glucose- ^{15}N , ^{15}N -ureide content in the study of the lactose- ^{15}N , ^{15}N -ureide metabolism in healthy humans. Eur J Clin Nutr 2011; 65: 959–64
 58. 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
 59. 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: 1167–72
 60. Heine W, Plath C, Richter I, Wutzke K, Töwe J. ^{15}N -tracer investigations into the nitrogen metabolism of preterm infants fed mother's milk and a formula diet. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1983; 2: 606–12
 61. Richter I, Heine W, Plath C, Krawielitzki K, Junghans P. Kinetic tracer studies on protein synthesis during infancy using chemically defined diets containing ^{15}N -lysine

- as a tracer. Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr. 1981; 41: 89–98
62. Wutzke KD, Berg D, Haffner D. The metabolic fate of doubly stable isotope labelled heat-killed *Lactobacillus johnsonii* in humans. Eur J Clin Nutr 2008; 62: 197–202
 63. Wutzke KD, Sattinger V. ¹⁵N-excretion of heat-killed *Lactobacillus casei* in humans. Eur J Clin Nutr 2006; 60: 847–52
 64. Wutzke KD, Lotz M, Zipprich C. The effect of pre- and probiotics on the colonic ammonia metabolism in humans as measured by lactose-[¹⁵N₂]ureide. Eur J Clin Nutr 2010; 64: 1215–21
 65. Wutzke KD, Scholübbbers D. The metabolic effect of resistant starch and yoghurt on the renal and faecal nitrogen and ammonia excretion in humans as measured by lactose-[¹⁵N₂]ureide. Isot Environ Health Stud 2013; 49: 464–70
 66. Wutzke KD, Mix J. The metabolic fate of doubly labelled lactose-[¹³C,¹⁵N]ureide after pre-dosing with different ureides. Eur J Clin Nutr 2010; 64: 733–8
 67. Cloetens L, De Preter V, De Loor H, Rutgeerts P, Verbeke K. Does the biomarker ¹⁵N-lactose ureide allow to estimate the site of fermentation of resistant starch? Eur J Nutr 2008; 47: 217–23
 68. Wutzke KD, Glasenapp B. The use of ¹³C-labelled glycosyl ureides for evaluation of oro-caecal transit time. Eur J Clin Nutr 2004; 58: 568–72
 69. Tröndle A-S. Einfluss einer Enzyminduktion auf die Ammoniakentgiftung im Kolon nach Gabe von resistenter Stärke, gemessen anhand der Exkretion der Abbauprodukte von Lactose-[¹⁵N₂]ureid. Dissertation. Universität Rostock; 2020
 70. Wutzke KD, Schütt M. The duration of enzyme induction in oro-caecal transit time measurements. Eur J Clin Nutr 2007; 61: 1162–6
 71. Schoorl, N. Die Ureide, welche sich von den Zuckerarten ableiten. Chem Cent-Bl. 1901; 72: 775–6
 72. Schoorl, N. Die Ureide (Harnstoffe) der Zucker. Chem Cent-Bl. 1903; 74: 1079–80
 73. Geypens B, Bennink R, Peeters M, Evenepoel P, Mortelmans L, Maes B, Ghooos Y, Rutgeerts P. Validation of the lactose-[¹³C]ureide breath test for determination of oro-cecal transit time by scintigraphy. J Nucl Med 1999; 40: 1451–5
 74. Van den Driessche M, Van Malderen N, Geypens B, Ghooos Y, Veereman-Wauters G. Lactose-[¹³C]ureide breath test: a new, noninvasive technique to determine oro-cecal transit time in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 31: 433–8
 75. Jackson AA, Bundy R, Hounslow A, Murphy JL, Wootton SA. Metabolism of lactose-[¹³C]ureide and lactose-[¹⁵N,¹⁵N]ureide in normal adults consuming a diet marginally

- adequate in protein. Clin Sci (Lond) 1999; 97: 547–55
76. Wutzke KD, Tisztl M, Salewski B, Glass Ä. Dietary fibre-rich resistant starches promote ammonia detoxification in the human colon as measured by lactose- $[^{15}\text{N}_2]$ ureide. Isot Environ Health Stud 2015; 51: 488–96
 77. Di Bartolomeo F, Startek JB, Van den Ende W. Prebiotics to fight diseases: reality or fiction?: prebiotics counteract diseases. Phytother Res 2013; 27: 1457–73
 78. Steer T, Carpenter H, Tuohy K, Gibson GR. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. Nutr Res Rev 2000; 13: 229–54
 79. Wutzke KD, Schmidek KV. The effect of resistant starches on fat oxidation in healthy adults as measured by a $^{13}\text{CO}_2$ -breath test. Isot Environ Health Stud 2017; 53: 553–62
 80. Quetelet LAJ. A treatise on man and the development of his faculties. Obes Res 1994; 2: 72–85
 81. Fischer Analysen Instrumente GmbH. Gebrauchsanweisung FANci2. 2020. Verfügbar unter: https://fan-gmbh.de/wp-content/uploads/documents/fanci2var_handbuch.pdf
 82. DuBois-Formel. In: Wikipedia – Die freie Enzyklopädie. 2019. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Dubois-Formel&oldid=192438986>
 83. D’Angelo G, Di Rienzo T, Scaldaferrì F, Del Zompo F, Pizzoferrato M, Lopetuso L, Laterza L, Bruno G, Petito V, Campanale M. Tricks for interpreting and making a good report on hydrogen and ^{13}C breath tests. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013; 17: 90–8
 84. Campro Scientific. QuinTron Atemgasanalysegeräte Breath Tracker SC. 2021 [zitiert 8. Februar 2021]. Verfügbar unter: <http://www.quintron-eu.com/CS-quintron-german.pdf>
 85. Kaliumcyanat. In: Wikipedia: Die freie Enzyklopädie. 2020 [zitiert 28. März 2021]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Kaliumcyanat&oldid=203209172>
 86. Kjeldahlsche Stickstoffbestimmung. In: Wikipedia: Die freie Enzyklopädie. 2018 [zitiert 28. März 2021]. Verfügbar unter: https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Kjeldahlsche_Stickstoffbestimmung&oldid=175332377
 87. Wellek S, Blettner M. On the proper use of the crossover design in clinical trials. Dtsch Arztebl Online. 2012. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2012.0276>
 88. Hemmerich WA. Bonferroni-Korrektur 2021 [zitiert 28. Juli 2021]. Verfügbar unter: <https://statistikguru.de/lexikon/bonferroni-korrektur.html>

89. Eisenmann A, Amann A, Said M, Datta B, Ledochowski M. Implementation and interpretation of hydrogen breath tests. *J Breath Res* 2008; 2: 046002
90. Jacobasch G, Schmiedl D, Kruschewski M, Schmehl K. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 201–11
91. Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, Schmulson M, Valdovinos M, Zakko S, Pimentel M. Hydrogen and methane-based breath testing in gastrointestinal disorders: The North American Consensus. *Am J Gastroenterol* 2017; 112: 775–84
92. Belobrajdic DP, Regina A, Klingner B, Zajac I, Chapron S, Berbezy P, Bird AR. High-Amylose wheat lowers the postprandial glycemic response to bread in healthy adults: a randomized controlled crossover trial. *J Nutr* 2019; 149: 1335–45
93. Cummings JH, Macfarlane GT. Gastrointestinal effects of prebiotics. *Br J Nutr* 2002; 87 [Suppl 2]: 145–51
94. Higgins JA. Resistant starch and energy balance: impact on weight loss and maintenance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2014; 54: 1158–66
95. Jenkins DJ, Vuksan V, Kendall CW, Würsch P, Jeffcoat R, Waring S, Mehling CC, Vidgen E, Augustin LS, Wong E. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr* 1998; 17: 609–16
96. Jenkins DJ, Kendall CW. Resistant starches. *Curr Opin Gastroenterol* 2000; 16: 178–83
97. Nordgaard I, Mortensen PB, Langkilde AM. Small intestinal malabsorption and colonic fermentation of resistant starch and resistant peptides to short-chain fatty acids. *Nutr* 1995; 11: 129–37
98. Unger K. Der Einfluss von resistenter Stärke auf die Fettsäureoxidation bei gesunden Erwachsenen. Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität Rostock; 2011
99. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 67–72
100. Olesen M, Rumessen JJ, Gudmand-Høyer E. Intestinal transport and fermentation of resistant starch evaluated by the hydrogen breath test. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48: 692–701
101. van Munster IP, de Boer HM, Jansen MC, de Haan AF, Katan MB, van Amelsvoort JM, Nagengast FM. Effect of resistant starch on breath-hydrogen and methane excretion in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 626–30

102. Rumessen JJ, Nordgaard-Andersen I, Gudmand-Høyer E. Carbohydrate malabsorption: quantification by methane and hydrogen breath tests. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 826–32
103. Erdrich S, Tan ECK, Hawrelak JA, Myers SP, Harnett JE. Hydrogen–methane breath testing results influenced by oral hygiene. *Sci Rep* 2021; 11: 1-26
104. Leitzmann P, Heine W, Wutzke KD, von Bismarck P, Dorlöchter L, Miera O, Bührle M, Cornelißen BW, Höcker C. Vergleichende Messungen von Magenentleerung, Blutglukose und oroökaler Transitzeit nach einer konventionellen Morgenmahlzeit und einem Kollath-Frühstück. *Eur J Nutr* 1998; 37: 31–37
105. Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol.* 1996; 81: 288–302
106. Cummings JH, Macfarlane GT. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol* 1991; 70: 443–59
107. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017; 19: 29–41
108. Morrison DJ, Dodson B, Preston T, Weaver LT. Gastrointestinal handling of glycosyl [¹³C]ureides. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 1017–24
109. Andrade C. Internal, External, and Ecological Validity in Research Design, Conduct, and Evaluation. *Indian J Psychol Med* 2018; 40: 498–9

8 Thesen

- 1. Resistente Stärken sind ballaststoff- und amylosereiche Prebiotika, die im Colon durch die mikrobielle Flora fermentiert werden. Hierbei kommt es zur Bildung von kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere Butyrat, die zu einer Senkung des luminalen pH-Werts und der Hemmung der bakteriellen Proteaseaktivität im Colon führen. Dies fördert die vermehrte Stickstoffinkorporation in die Dünndarmbakterien.**
- 2. Durch die vermehrte Stickstoffinkorporation in die Darmbakterien sinkt die renale Stickstoff- und Ammoniakexkretion. Konsekutiv ist eine gesteigerte Stickstoffexkretion über die Faeces zu erwarten.**
- 3. Laktose-[¹⁵N₂]ureid ist eine geeignete und validierte Tracersubstanz zur Beurteilung des Stickstoffmetabolismus im Colon.**
- 4. Die Senkung der renalen ¹⁵N-Exkretion im Urin war statistisch signifikant.**
- 5. Bei der Fermentation von resistenten Stärken im Colon entstehen neben kurzkettigen Fettsäuren die Abbauprodukte Wasserstoff (H₂) und Methan (CH₄), die exhalativ eliminiert werden und deren Konzentration in der Ausatemluft durch Gaschromatographie gemessen werden kann.**
- 6. Die Supplementation von resistenten Stärken und deren Fermentation im Colon führt nicht zu einer signifikant erhöhten Konzentration von H₂ und CH₄.**
- 7. Laktose-[¹³C]ureid ist eine validierte und gut erforschte Tracersubstanz für die Bestimmung der oroökalen Transitzeit (OzTz) des Menschen.**
- 8. Laktose-[¹³C]ureid und Laktose-[¹⁵N₂]ureid werden während der Dünndarmpassage durch das Enzym β -Galactosidase in Galactose und Glukose-[¹³C]- bzw. Glukose-[¹⁵N₂]ureid gespalten. Die glykosylureidische Bindung ist resistent gegenüber den hydrolysierenden Enzymen des Dünndarms.**
- 9. Das nach Abspaltung der Galactose aus Laktose-[¹³C]ureid bzw. Laktose-[¹⁵N₂]ureid entstandene Glukose-[¹³C]- bzw. Glukose-[¹⁵N₂]ureid gelangt ohne weitere Verstoffwechselung in das Zökum. Dort wird die glykosylureidische Bindung durch das Enzym Glucoseureid-Hydrolase des Darmbakteriums *C. innocuum* gespalten. Es entstehen Glucose und [¹³C]- bzw. [¹⁵N₂]-Harnstoff.**
- 10. Der mit den stabilen Isotopen markierte Harnstoff wird über das Enzym Urease der mikrobiellen Flora in ¹³CO₂ und ¹⁵NH₃ gespalten. ¹³CO₂ wird expiratorisch**

eliminiert, während $^{15}\text{NH}_3$ über den Stickstoffmetabolismus entweder über den Urin oder die Faeces eliminiert wird.

11. Der $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest mit Laktose- ^{13}C ureid ermöglicht nach vorangegangener Induktion des Enzyms Glucoseureid-Hydrolase mit unmarkiertem Laktoseureid die zuverlässige und nichtinvasive Bestimmung der OzTz.
12. Das verwendete Gemisch aus resistenten Stärken bewirkte eine signifikante Verlängerung der OzTz. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass ballaststoffreiche und amylosehaltige resistente Stärken die Digestion verzögern.
13. Für die Enzyminduktion ist eine Dosis von 3x200mg unmarkiertes Laktoseureid - verabreicht am Tag vor der Tracereinnahme - ausreichend.
14. Eine Signalverstärkung nach Enzyminduktion ist für den $^{13}\text{CO}_2$ -Atemtest zur Bestimmung der OzTz belegt worden.
15. Die interindividuelle Variabilität der Probanden ist eine wahrscheinlich konfundierende Variable und kann einen Einfluss auf die Studienergebnisse haben.
16. Die Verwendung eines Gemischs aus verschiedenen resistenten Stärken mit einem hohen Ballaststoff- und Amylosegehalt verbessert die ökologische Validität der resistenten Stärken im Vergleich zu einer Supplementation von Monosubstanzen.
17. Anhand der statistisch nicht signifikanten Vorschalttests, die zur Evaluation des Studiendesigns vorgenommen wurden, konnte zweifelsfrei belegt werden, dass eine Auswaschphase von 5 Tagen zwischen den beiden Studienphasen ausreichend ist. Hierbei spielt die Reihenfolge, in der die Studienphasen absolviert wurden, keine Rolle.
18. Die kombinierte, komplexe Untersuchung des Einflusses des Stärkegemischs auf die Fermentationsprozesse im Colon ist in dieser Form in der internationalen Literatur bisher nicht beschrieben und stellt daher ein Novum dar.

9 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Isotopenzusammensetzung des menschlichen Körpers einer 70kg schweren Person modifiziert nach [46]..... | 12 |
| Abbildung 2: Laktose- ^{13}C , ^{15}N -ureid (modifiziert nach [8]) | 15 |
| Abbildung 3: Metabolismus des Laktose- ^{13}C , ^{15}N -ureids nach [48,68]..... | 16 |
| Abbildung 4: Isotopenverhältnis-Massenspektrometer | 27 |
| Abbildung 5: Das Studienprotokoll (schematisch)..... | 30 |
| Abbildung 6: Konzentration der H_2 -Exhalation zu Beginn des Analysezeitraums (LW; entspricht Zeitpunkt 0min auf der x-Achse) und über einen Zeitraum von 6h im Verlauf | 36 |
| Abbildung 7: Konzentration der CH_4 -Exhalation zu Beginn des Analysezeitraums (LW, entspricht Zeitpunkt 0min auf der x-Achse) und über einen Zeitraum von 6h im Verlauf | 37 |
| Abbildung 8: $^{13}\text{CO}_2$ -Anreicherung in der Exhalation ohne (LV) und mit Supplementation (SV) des Gemischs aus RS nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid | 38 |
| Abbildung 9: Kumulative prozentuale ^{13}C -Exhalation nach Einnahme des ^{13}C -LU im Vergleich von LV und SV nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid. | 39 |
| Abbildung 10: Mittelwert und einfache Standardabweichung der ^{13}C -CPDR 14h nach Einnahme der Tracersubstanz ^{13}C - LU..... | 43 |
| Abbildung 11: Die OzTz ohne (LV) und mit (SV) Einnahme des Gemischs aus RS nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid. | 45 |
| Abbildung 12: Die Gesamtstickstoffexkretion im Urin 48h in LV und nach Stärkegabe (SV)..... | 47 |
| Abbildung 13: ^{15}N -Exkretion ohne (LV) und mit (SV) Supplementation des Gemischs aus RS..... | 50 |
| Abbildung 14: mittlere $^{15}\text{NH}_3$ -Exkretion ohne (LV) und mit Supplementation (SV) des Gemisches aus RS 24h nach Einnahme der Tracersubstanz | 53 |
| Abbildung 15: Die renale und faecale ^{13}C -Exkretion 48h bzw. 72h nach Einnahme der Tracersubstanz | 55 |

10 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Klassifikation der Typen natürlich vorkommender resistenter Stärken RS | 10 |
| Tabelle 2: Isotopenhäufigkeit der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff..... | 12 |
| Tabelle 3: Liste der Studienteilnehmer/innen | 20 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung des verwendeten Gemischs aus resistenten Stärken (RS)..... | 29 |
| Tabelle 5: Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung des Parameters H ₂ -Exhalation | 34 |
| Tabelle 6: signifikante Unterschiede zwischen Leerphase (LV) und Intervention (SV) im Vorschalttest des Parameters CH ₄ -Exhalation..... | 35 |
| Tabelle 7: ¹³ C- kumulative Exhalation (CPDR) der Probanden im Vergleich LV und SV nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid | 41 |
| Tabelle 8: Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung des Parameters ¹³ C-CPDR | 42 |
| Tabelle 9: OzTz der Probanden sowie Mittelwert (MW) und einfache Standardabweichung (SD) nach Induktion mit unmarkiertem Laktoseureid | 44 |
| Tabelle 10: p-Werte des Vorschalttests über die Wahrscheinlichkeit eines Carry-Over-Effekts und des T-Tests zur Beurteilung der Signifikanz des Behandlungseffekts | 45 |
| Tabelle 11: Gesamt-N-Exkretion im Urin | 46 |
| Tabelle 12: Teststatistik der Untersuchung auf Normalverteilung der Gesamtstickstoffexkretion | 47 |
| Tabelle 13: Signifikanztestung der Gesamtstickstoffexkretion im Urin..... | 48 |
| Tabelle 14: Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) der ¹⁵ N-Exkretion in Urin und Faeces..... | 49 |
| Tabelle 15: Ergebnisse der Signifikanztestung im Vorschalttest und des Behandlungseffekts für die renale und faecale ¹⁵ N-Exkretion | 51 |
| Tabelle 16: Die mittlere ¹⁵ NH ₃ -Exkretion im Urin [%] 48h nach Einnahme der Tracersubstanz | 52 |
| Tabelle 17: Ergebnisse der Signifikanztestung der mittleren ¹⁵ NH ₃ -Urinexkretion nach 48h | 53 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 18: ^{13}C -Urin-Exkretion 48h und ^{13}C -Faeces-Exkretion 72h nach Einnahme der Tracersubstanz | 54 |
| Tabelle 19: Ergebnisse der statistischen Analysen der renalen und faecalen ^{13}C -Exkretion .. | 56 |

11 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine als die angegebenen Hilfsmittel oder Quellen verwendet habe. Die aus den angegebenen Quellen wörtlich oder indirekt übernommenen Passagen wurden als solche kenntlich gemacht.

Rostock, im Mai 2022

Sarah Scheel, geb. Michalski

12 Lebenslauf

Sarah Scheel



Daten zur Person: geb. am 02.08.1989 in Schwerin
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

| | |
|-------------|--------------------------------------|
| 1996 - 2000 | Grundschule Willi Bredel in Schwerin |
| 2000- 2008 | Gymnasium Fridericianum Schwerin |
| 2008 | Abitur |

Hochschulbildung:

| | |
|-------------|--|
| 2008 - 2015 | Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock |
| 08/2011 | 1. Abschnitt der ärztlichen Staatsexamensprüfung (Physikum) |
| 10/2014 | 2. Abschnitt der ärztlichen Staatsexamensprüfung |
| 12/2015 | 3. Abschnitt der ärztlichen Staatsexamensprüfung |
| 12/2015 | Approbation als Ärztin |

Praktische Ausbildung im Studium:

| | |
|--------------------|--|
| 02 /2012 - 03/2012 | Famulatur Innere Medizin DRK Krankenhaus Grevesmühlen |
| 07/2012 - 08/2012 | Famulatur Gynäkologie und Geburtshilfe Universitätsfrauenklinik am Klinikum Südstadt Rostock |
| 02/2013 | Famulatur Allgemeinmedizin, Praxis Dipl. med. Böse in Schwerin |
| 08/2013 - 09/2013 | Sommerakademie Innere Medizin Klinikum Ernst von Bergmann Potsdam |
| 02/2014 | Famulatur Notaufnahme und Rettungsstelle Helios Kliniken Schwerin |
| 11/2014 - 10/2015 | Praktisches Jahr |

Innere Medizin: Klinikum Ernst von Bergmann Potsdam

Pädiatrie: Helios Kliniken Schwerin und NICU Jewish General
Hospital Montreal, Kanada

Chirurgie: Helios Kliniken Schwerin

Beruflicher Werdegang:

| | |
|-------------------|---|
| Seit 01/2016 | Ärztin in Weiterbildung zur Fachärztin für Anästhesiologie und Intensivmedizin, UKSH Campus Lübeck |
| 01/2021 | Anerkennung der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin durch die Ärztekammer Schleswig-Holstein |
| 04/2021 - 03/2022 | Studienärztin in einer Probandenstudie für ein Promotionsvorhaben am CBBM Universität zu Lübeck, Institut für Gesundheitswissenschaften |
| Seit 03/2022 | Studienärztin POET-Pain Studie am UKSH Lübeck |

Interessen und gesellschaftliches Engagement:

| | |
|---------------|---|
| seit 09/2015 | Mitgliedschaft und Engagement Deutsche Gesellschaft für interdisziplinäre Notfall- und Akutmedizin (DGINA), Board Young DGINA |
| 2008- 2020 | DRK Bereitschaft und Katastrophenschutz, Kreisverbände Schwerin und Rostock |
| Seit 2020 | Ehrenamtliches Engagement bei der Stiftung für Junge Erwachsene mit Krebs: TREFFPUNKTE Rostock und Lübeck, Tandempartnerschaften für Betroffene |
| Fremdsprachen | Englisch: fließend Französisch: Sprachdiplom DELF Level B2 (2008) |
| Sport | Volleyball, Wandern, Zirkeltraining Kraft/Ausdauer, Laufen |

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen:

- Herrn Prof. Dr. K.D. Wutzke für die Themenvergabe, für die engagierte und geduldige Betreuung und die uneingeschränkte Unterstützung während der gesamten Zeit des Promotionsvorhabens.
- Frau B. Salewski für die Unterstützung bei der Probenanalyse und der Zusammenstellung der Messergebnisse.
- Frau PD Dr. habil. Ä. Glass für die statistische Beratung und die Unterstützung und das Feedback zu der statistischen Auswertung der Ergebnisse.
- Herrn M.sc. (Psychologie) A. Bernhardt für das Lektorat dieser Arbeit und den wertvollen Austausch auf fachlicher wie persönlicher Ebene.
- Meiner Familie sowie meinen langjährigen Freunden für die Unterstützung und den Glauben an mich bei der Anfertigung der Promotionsschrift über die vergangenen Jahre.
- All meinen Proband/innen, die durch ihre freiwillige Teilnahme an der Studie und ihr Durchhaltevermögen die Entstehung dieser Promotion ermöglicht haben.
- Der Firma Campro Scientific Berlin für die Drittmittelbereitstellung für diese Studie.

Ein besonderer Dank aus tiefstem Herzen gilt meinem lieben Ehemann Christian und unserer wundervollen Tochter Linnea für die Liebe, die Freude und die Hoffnung, die sie jeden Tag in allen Lebenssituationen geben und gegeben haben und die mir immer wieder große Motivation und Inspiration gewesen ist. Ihr habt mir stets den Rücken für die Fertigstellung dieser Arbeit freigehalten und gestärkt.

Anhang

| Wasserstoffexhalation Leerphase (LV) | | | | | | |
|---|----|---------|---------|------------|---------------------|---------|
| Messzeitpunkt [min] | N | Minimum | Maximum | Mittelwert | Std.- Abweichung | Varianz |
| Leerwert | 18 | 3,00 | 39,00 | 13,5556 | 10,29690 | 106,026 |
| 30 | 18 | 2,00 | 46,00 | 13,9722 | 12,53052 | 157,014 |
| 60 | 18 | 3,00 | 29,00 | 12,0278 | 7,63597 | 58,308 |
| 90 | 18 | 2,00 | 36,00 | 9,7778 | 7,84073 | 61,477 |
| 120 | 18 | 2,00 | 32,00 | 8,3889 | 6,59223 | 43,458 |
| 150 | 18 | 3,00 | 23,00 | 7,5556 | 4,91363 | 24,144 |
| 180 | 18 | 1,00 | 21,00 | 7,6389 | 5,26868 | 27,759 |
| 210 | 18 | 2,00 | 17,00 | 8,1481 | 4,68964 | 21,993 |
| 240 | 18 | 3,00 | 29,00 | 10,9167 | 8,17502 | 66,831 |
| 270 | 18 | 2,00 | 44,00 | 13,4814 | 13,33895 | 177,927 |
| 300 | 18 | 3,00 | 63,00 | 16,6111 | 19,28162 | 371,781 |
| 330 | 18 | 3,00 | 61,00 | 16,7037 | 17,09095 | 292,100 |
| 360 | 18 | 3,00 | 56,00 | 16,1111 | 14,19254 | 201,428 |

| Methanexhalation Leerphase (LV) | | | | | | |
|--|----|---------|---------|------------|---------------------|---------|
| Messzeitpunkt [min] | N | Minimum | Maximum | Mittelwert | Std.- Abweichung | Varianz |
| Leerwert | 18 | 2,00 | 34,00 | 10,4444 | 9,02430 | 81,438 |
| 30 | 18 | 2,00 | 30,00 | 11,1111 | 9,94626 | 98,928 |
| 60 | 18 | 1,00 | 51,00 | 11,2778 | 13,01947 | 169,507 |
| 90 | 18 | 2,00 | 28,00 | 9,5556 | 9,00472 | 81,085 |
| 120 | 18 | 2,00 | 27,00 | 8,8889 | 8,25967 | 68,222 |
| 150 | 18 | 2,00 | 29,00 | 8,1667 | 8,48701 | 72,029 |
| 180 | 18 | 1,00 | 24,00 | 8,1389 | 7,67694 | 58,935 |
| 210 | 18 | 1,00 | 25,00 | 7,8611 | 7,70371 | 59,347 |
| 240 | 18 | 3,00 | 27,50 | 8,1944 | 7,20935 | 51,975 |
| 270 | 18 | 2,00 | 39,00 | 8,6389 | 9,39306 | 88,230 |
| 300 | 18 | 2,00 | 35,00 | 9,5000 | 9,75132 | 95,088 |
| 330 | 18 | 2,00 | 39,00 | 9,4722 | 9,95057 | 99,014 |
| 360 | 18 | 2,00 | 31,00 | 9,3333 | 9,95874 | 99,176 |

| Wasserstoffexhalation Interventionsphase (SV) | | | | | | |
|--|----|---------|---------|------------|---------------------|---------|
| Messzeitpunkt [min] | N | Minimum | Maximum | Mittelwert | Std.- Abweichung | Varianz |
| Leerwert | 18 | 3,00 | 53,00 | 16,4444 | 13,04843 | 170,261 |
| 30 | 18 | 3,00 | 42,00 | 16,3611 | 12,28558 | 150,935 |
| 60 | 18 | 3,00 | 36,00 | 14,8611 | 11,29785 | 127,641 |
| 90 | 18 | 3,00 | 26,00 | 12,1667 | 8,67213 | 75,206 |
| 120 | 18 | 3,00 | 18,00 | 9,3611 | 5,66155 | 32,053 |
| 150 | 18 | 2,00 | 36,00 | 10,3333 | 8,69753 | 75,647 |
| 180 | 18 | 3,00 | 25,00 | 9,7222 | 6,64039 | 44,095 |
| 210 | 18 | 2,00 | 22,00 | 9,0000 | 5,67761 | 32,235 |
| 240 | 18 | 2,00 | 28,00 | 9,6111 | 6,54522 | 42,840 |
| 270 | 18 | 3,00 | 46,00 | 12,6944 | 12,09173 | 146,210 |
| 300 | 18 | 2,00 | 33,00 | 13,5556 | 9,40727 | 88,497 |
| 330 | 18 | 3,00 | 67,00 | 16,8333 | 17,29417 | 299,088 |
| 360 | 18 | 3,00 | 55,00 | 15,7500 | 13,07248 | 170,890 |

| Methanexhalation Interventionsphase (SV) | | | | | | |
|---|----|---------|---------|------------|---------------------|---------|
| Messzeitpunkt [min] | N | Minimum | Maximum | Mittelwert | Std.- Abweichung | Varianz |
| Leerwert | 18 | 1,00 | 31,00 | 10,3333 | 9,62228 | 92,588 |
| 30 | 18 | 1,00 | 32,00 | 10,0000 | 10,23259 | 104,706 |
| 60 | 18 | 1,00 | 38,00 | 10,2778 | 11,07624 | 122,683 |
| 90 | 18 | 1,00 | 37,00 | 9,5000 | 10,60105 | 112,382 |
| 120 | 18 | 1,00 | 33,00 | 8,6944 | 10,10698 | 102,151 |
| 150 | 18 | 1,00 | 33,00 | 9,4444 | 10,47811 | 109,791 |
| 180 | 18 | 2,50 | 40,00 | 9,8611 | 11,74459 | 137,935 |
| 210 | 18 | 1,00 | 37,00 | 9,5000 | 10,80441 | 116,735 |
| 240 | 18 | 3,00 | 40,00 | 9,8889 | 11,58035 | 134,105 |
| 270 | 18 | 1,00 | 35,00 | 9,4444 | 10,17623 | 103,556 |
| 300 | 18 | 1,50 | 27,00 | 9,1389 | 8,92420 | 79,641 |
| 330 | 18 | 2,00 | 27,00 | 9,5000 | 8,52850 | 72,735 |
| 360 | 18 | 2,00 | 26,00 | 9,3611 | 8,37329 | 70,112 |

Wasserstoffexhalation: t-Test bei unabhängigen Stichproben zur statistischen Untersuchung auf das Vorliegen eines Carryover-Effekts (Summen der Messzeitpunkte) und eines signifikanten Einflusses der Intervention (Differenzen der Messzeitpunkte) für normalverteilte Parameter

| Messzeitpunkt | Levene-Test der Varianzgleichheit | T-Test für die Mittelwertgleichheit |
|----------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| | Signifikanz | Signifikanz. (2-seitig) |
| | | |
| Leerwert (Differenz) | ,077 | ,561 |
| Leerwert (Summe) | ,992 | ,288 |
| 30min (Differenz) | ,804 | ,607 |
| 30min (Summe) | ,538 | ,715 |
| 60min (Differenz) | ,789 | ,415 |
| 60min (Summe) | ,365 | ,951 |
| 90min (Differenz) | ,480 | ,368 |
| 90min (Summe) | ,853 | ,665 |
| 120min (Differenz) | ,212 | ,566 |
| 150min (Differenz) | ,929 | ,209 |
| 180min (Differenz) | ,589 | ,259 |
| 210min (Differenz) | ,878 | ,628 |
| 210min (Summe) | ,497 | ,611 |
| 240min (Differenz) | ,498 | ,550 |
| 360min (Differenz) | ,265 | ,840 |

Wasserstoffexhalation: Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Parametern

| Messzeitpunkt | Mann-Whitney-U | Asymptotische Signifikanz (2-seitig) |
|--------------------|----------------|--------------------------------------|
| 120min (Summe) | 32,000 | ,477 |
| 150min (Summe) | 35,000 | ,656 |
| 180min (Summe) | 24,000 | ,154 |
| 240min (Summe) | 39,000 | ,929 |
| 270min (Differenz) | 37,500 | ,824 |
| 270min (Summe) | 34,500 | ,625 |
| 300min (Differenz) | 38,000 | ,859 |
| 300min (Summe) | 33,000 | ,534 |
| 330min (Differenz) | 39,000 | ,929 |
| 330min (Summe) | 32,500 | ,505 |
| 360min (Summe) | 29,000 | ,328 |

| Methanexhalation: t-Test bei unabhängigen Stichproben zur statistischen Untersuchung auf das Vorliegen eines Carryover-Effekts und eines signifikanten Einflusses der Intervention bei normalverteilten Parametern | | |
|---|--|--|
| Messzeitpunkt | Levene-Test der Varianzgleichheit | T-Test für die Mittelwertgleichheit |
| | Signifikanz | Signifikanz |
| | | |
| 60min (Differenz) | ,306 | ,576 |

| Methanexhalation: Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Parametern | | |
|--|----------------------------|--------------------|
| Messzeitpunkt | Mann-Whitney-U-Test | Signifikanz |
| Leerwert (Differenz) | 35,500 | ,685 |
| Leerwert (Summe) | 16,500 | ,036 |
| 60min (Summe) | 23,000 | ,130 |
| 90min (Differenz) | 37,000 | ,788 |
| 90min (Summe) | 12,500 | ,014 |
| 120min (Differenz) | 35,000 | ,654 |
| 120min (Summe) | 19,500 | ,068 |
| 150min (Differenz) | 35,000 | ,653 |
| 150min (Summe) | 16,500 | ,036 |
| 180min (Differenz) | 29,500 | ,347 |
| 180min (Summe) | 19,000 | ,061 |
| 210min (Differenz) | 26,000 | ,207 |
| 210min (Summe) | 21,000 | ,089 |
| 240min (Differenz) | 35,500 | ,687 |
| 240min (Summe) | 21,500 | ,098 |
| 270min (Differenz) | 32,500 | ,502 |
| 270min (Summe) | 24,500 | ,166 |
| 300min (Differenz) | 37,500 | ,823 |
| 300min (Summe) | 23,000 | ,130 |
| 330min (Differenz) | 26,000 | ,206 |
| 330min (Summe) | 22,000 | ,109 |
| 360min (Differenz) | 34,000 | ,592 |
| 360min (Summe) | 22,500 | ,119 |