

Dickdarmentzündungen hemmen die Butyratresorption im Kolonepithel – Schutzeffekte durch resistente Stärke Typ 3 (RS3) und RS3/Rutin

Inflammations of colon inhibit absorption of butyrate in colon epithelium – safety effects by resistant starch type 3 (RS3) and RS3/rutin

G. Jacobasch, H. G. Holzhütter, M. Kruschewski, H. Pforte, G. Dongowski

Zusammenfassung

Intrakolonale TNBS-Induktion führt im akuten Entzündungsstadium (Kolitistag 4 bis 6) bei mit einer Standarddiät ernährten Ratten zu einer signifikanten Anhäufung von kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im Dickdarm. SCFA sind die Endprodukte der bakteriellen Fermentation. Mit Hilfe eines mathematischen Modells konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt auf eine Unterdrückung der Resorption von SCFA durch den Monocarboxylattransporter 1 (SMCT1) zurückzuführen ist. Diese Hemmung wird durch das Zytokin TNF- α hervorgerufen und kann nur durch intrazelluläres Butyrat verhindert werden. Durch Futterzusätze von butyrogener resistenter Stärke Typ 3 (RS3) und noch effektiver durch die Kombination von RS3 und Rutin (Quercetinrutosid) wurde die Resorption von Butyrat aufrechterhalten. Die Entzündungsreaktionen klangen rascher ab und die Regeneration wurde früher eingeleitet. Durch die präbiotischen Wirkungen von RS3 und Rutin wurde außerdem die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota stabilisiert und die Immunabwehr der Kolonschleimhaut verbessert. RS3/Rutin-Zusätze zur Nahrung werden deshalb zur Prävention von Dickdarmerkrankungen empfohlen.

Kennwörter:

TNBS-Kolitis, Butyrat, SMCT1, mathematisches Modell der Butyratresorption, RS3, Rutin, Quercetin, PKC- δ , NF- κ B

Summary

Intracolonic TNBS-induction of rats fed with a standard diet show during the acute phase of inflammation (colitis day 4 to 6) an accumulation of short chain fatty acids (SCFA) produced by fermentation in the colon by the intestinal microbiota. By using a mathematical model we could show that this effect was due to a decrease of the absorption of SCFA by the monocarboxylate transporter 1 (SMCT1). The inhibition was caused by the cytokine TNF- α and can be prevented only by intracellular butyrate. Inhibition of butyrate absorption did not occur, if the standard diet was supplemented by RS3 or by the combination of RS3 and rutin (quercetin rutoside). Under these conditions the decrease of inflammatory reactions and the regeneration of the colon epithelium proceeded more efficiently. Furthermore, the prebiotic properties of RS3 und rutin stabilized the composition of the intestinal microbiota and improved the immunity resistance of the colonic mucosa. RS3/rutin supplementation of food may therefore be recommended for the preventive use of large bowel diseases.

Keywords:

TNBS-colitis, butyrate, SMCT1, mathematical model of butyrate absorption, RS3, rutin, quercetin, PKC- δ , NF- κ B

1. Einführung

Unter der Bezeichnung chronisch-entzündliche Dickdarmerkrankungen (IBD) werden Erkrankungen unterschiedlicher Genese zusammengefasst, für die Diarrhöen, blutig und schleimig durchsetzt, charakteristisch sind. Typisch ist weiterhin eine verstärkte Vaskularisierung der Dickdarmschleimhaut, die das Auftreten von Blutungen fördert. Zu den Ursachen, die die Pa-

thogenese von IBD begünstigen, zählen genetische Faktoren und Ernährungsmängel^[1]. Ein Defizit an Tryptophan beeinträchtigt z. B. das angeborene Immunsystem^[2] und eine zu geringe Zufuhr an Substraten (Präbiotika) und Flavonoiden den Stoffwechsel der intestinalen Mikrobiota^[3]. Umgekehrt hat ein zu hoher Gehalt der Nahrung an Fett, Fleisch, Fruktose und Glukose negative Effekte auf die Zusammensetzung der Bakterien im Dickdarm und begünstigt dadurch die

Entwicklung einer Dysbiose. Sie ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Gram negativen Bakterien, einen Verlust an Butyrat- und Laktatbildnern sowie die Ansiedlung pathogen wirkender Mikroorganismen^[4]. Die Dysbiose der intestinalen Mikrobiota beeinflusst die Mikrozirkulation, führt zu Störungen in der Resorptionsaktivität der Dickdarmschleimhaut und bewirkt Veränderungen im Immunsystem^[5, 6]. IBD können aber auch durch Infektionen, Schadstoffe, bestimmte Medikamente (z. B. Antibiotika, Zytostatika, nichtsteroidale antiinflammatorische Verbindungen) und Schäden der Kolonschleimhaut nach therapeutischen Bestrahlungen ausgelöst werden. Das bedeutet, dass die luminal Seite der Dickdarmbarriere zahlreichen proinflammatorischen und immunogen wirkenden Verbindungen ausgesetzt sein kann^[7].

Bei Entzündungen treten in der Kolonschleimhaut verstärkt Granulozyten, mononukleäre Phagozyten und T-Lymphozyten auf. Damit gehen eine Schwächung der Barrierefunktion und eine Beeinträchtigung der Struktur und Funktion der Kolonozyten einher. Diese Prozesse erleichtern weitere Schädigungen durch pathogen wirkende Mikroorganismen^[8, 9]. Die von den Bakterien freigesetzten Endotoxine greifen ebenso wie der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) in zelluläre Signalübertragungsprozesse ein, wodurch die Synthese von Proteinen u. a. auch für das Zytoskelett gehemmt und die Tight-Junction-Struktur beeinträchtigt wird^[10].

Durch das Zusammenwirken von angeborener unspezifischer und adaptiver spezifischer Immunantwort entwickelt sich aber in der akuten Phase einer IBD trotz einer Endotoxämie keine Sepsis und auch kein SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom)^[11]. Lipopolysaccharid (LPS) aus der Membran Gram negativer Bakterien sowie auch andere mikrobielle Toxine und methylierte bakterielle DNA-Produkte aktivieren den klassischen NF- κ B (Nuclear Factor kappa B)-Weg^[12]. Die freigesetzten NF- κ B-Dimere können über nukleäre Erkennungssequenzen in den Zellkern translozieren und führen dort u. a. zu einer vermehrten Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und den Interleukinen IL-1 und IL-6^[13]. TNF- α zeigt von allen proinflammatorischen Zytokinen das breiteste Wirkungsspektrum und eine besonders starke Entzündungsreaktion. TNF- α ist darüber hinaus auch ein Inhibitor des SMCT1 (Sodium dependent Monocarboxylate Transporter 1)^[14]. Der SMCT1 nimmt in den symbiotischen Wechselwirkungen zwischen der intestinalen Mikrobiota und dem Stoffwechsel der Kolon-epithelzellen eine Schlüsselrolle ein. Die Bakterien decken ihren Energiebedarf im anaeroben Milieu des Dickdarmes durch die Fermentation. Zu deren Endprodukten zählen vor allem die kurzkettigen Fettsäuren

(SCFA), Acetat, Propionat und Butyrat. Davon liegt der größte Anteil im Dickdarm dissoziiert vor und kann in dieser Form mit Hilfe des SMCT1 resorbiert werden. Butyrat wird dabei in den Kolonozyten zurückgehalten und von ihnen als das wichtigste Substrat für den aeroben Energiestoffwechsel und für viele Synthesen verwendet^[15]. Darüber hinaus greift Butyrat in epigenetische Kontrollprozesse ein und kann dadurch eine Vielzahl von Proteinen hoch und herunter regulieren^[16]. Die Nutzung von Butyrat für zelluläre Aufgaben setzt aber einen funktionsfähigen SMCT1 voraus. Der SMCT1 zählt zu den Proteinen, die ebenfalls durch Butyrat hoch reguliert und aktiv erhalten werden können, solange Butyrat in die Epithelzellen gelangt. TNF- α kann diesen Prozess verhindern, wenn seine Bildung über die Aktivierung von NF- κ B nicht ausreichend durch Butyrat unterdrückt werden kann^[17].

Der Zielstellung dieser experimentellen Studie lag die Arbeitshypothese zugrunde, dass in der akuten Phase einer Kolitis der SMCT1 gehemmt und damit die Resorption von SCFA verhindert wird. Um diese Annahme zu bestätigen und quantitative Aussagen über den Umfang der Resorptionshemmung von SCFA machen zu können, wurde ein mathematisches Modell erarbeitet, da *in vivo* die Rate der Resorption von SCFA nicht direkt messbar ist. Eine weitere Aufgabe bestand darin, zu überprüfen, wie weit durch die Zufuhr einer butyrogenen resistenten Stärke Typ 3 (RS3), eines ausgezeichneten Präbiotikum, oder durch eine Kombination von RS3 und des Flavonolrutinosid Rutin eine Hemmung des SMCT1 bei einer akuten Kolitis verhindert werden kann. Wenn das der Fall ist, sollte die klinische Manifestation einer induzierten Entzündung im Kolon abgeschwächt und die Regeneration der Darmschleimhaut beschleunigt werden können.

Der größte Teil des mit der Nahrung aufgenommenen Rutins wird im Kolon bakteriell unter Spaltung des C-Ringes im Flavonoidgerüst abgebaut und von den Bakterien als Substrat für den Energiestoffwechsel und für Synthesen genutzt^[18-20]. Außerdem kann resorbiertes Quercetin systemisch durch eine Beeinflussung posttranskriptionaler Mechanismen antiinflammatorische Wirkungen ausüben^[21, 22]. Dazu zählt auch die Hemmung von Entzündungsprozessen, die durch LPS-aktivierte mononukleäre Zellen initiiert werden. Die Synthese von TNF- α wird am empfindlichsten durch LPS gesteigert und am effektivsten durch Quercetin unterdrückt. Es war deshalb berechtigt, anzunehmen, dass systemisch durch Quercetin der negative Effekt von TNF- α auf Kontrollmechanismen der intestinalen Barrierefunktion abgeschwächt und einer Schädigung der Struktur und Funktion der Tight-Junction vorgebeugt werden kann^[23, 24].

Die experimentelle Ernährungsstudie wurde mit 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure (TNBS)-behandelten Ratten durchgeführt.

2. Material und Methoden

RS3: Das verwendete RS3-Präparat wurde aus einem synthetisierten Poly-1,4- α -D-Glukan (Polymerisationsgrad 51, Molekulargewicht 8300 g/Mol) durch Retrogradation gewonnen und anschließend einer Hitze-Feuchte-Behandlung unterzogen^[25]. Der RS3-Anteil betrug 80 %.

Rutin: Rutin war ein käufliches Präparat der Fa. Roth (Karlsruhe, Deutschland). Der Quercetinanteil betrug 50 %.

Induktion der Kolitis: Die TNBS-induzierte Kolitis wurde nach den Angaben von *Morris et al.* durchgeführt^[26]. Männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Deutschland), Anfangsgewichte 290–310 g, wurden nach 24-stündigem Fasten in einer leichten Äthernarkose über einen 8 cm proximal vom Anus entfernt fixierten Katheder 20 mg TNBS, gelöst in 0,25 ml 50 %igem Ethanol, ins Kolon injiziert. Nach der TNBS-Instillation wurden die Tiere 15 min in Ruhestellung gehalten.

Versuchsdurchführung: Untersuchungen wurden am Tag 0 vor der Induktion der Kolitis, am Tag 4 und 6 (maximale Symptomatik der Kolitis), am Tag 11 (beginnende Regenerationsphase) und am Tag 21 (weitgehender Abschluss der Regenerationsphase) durchgeführt.

Die Ratten wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die Kontrollgruppe K (n = 34) erhielt eine semisynthetische Diät in Form von Pellets (*Tab. 1*). Im Futter der Gruppe S (n = 24) waren 10 g der Stärke/100 g Futter gegen RS3 ausgetauscht. Die Diät der Gruppe SR (n = 24) enthielt zusätzlich neben RS3 noch Rutin (1,4 mg/100 g Futter). Die Pellets wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam Rehbrücke, Deutschland, hergestellt.

Die Tiere wurden in Edelstahlkäfigen bei Hell/Dunkelperioden von zwölf Stunden gehalten und sieben Tage vor der Induktion der Kolitis an die entsprechende Diät adaptiert. Sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Tötung der Tiere erfolgte an den entsprechenden Versuchstagen mittels Kohlendioxid. Von allen Tieren wurden Blutproben gewonnen und untersucht. Sofort nach der Eröffnung des Abdomens wurde die klinische Manifestation der Kolitis makroskopisch eingeschätzt. Danach wurden die Inhalte von Abschnitten des Gastrointestinaltraktes entnommen, gewogen und sofort eingefroren. Aliquote Anteile davon wurden für

Tab. 1: Zusammensetzung der Futterproben (g/100 g)

Tab. 1: Composition of the diets used (g/100 g)

Futterbestandteil	Kontrollfutter (K)	RS3-Futter (S)	RS3/Rutin-Futter (SR)
Weizenstärke ¹	63	53	53
RS3-Präparat	0	10	10
Rutin	0	0	0,00014 ^a
Casein ²	20	20	20
Sonnenblumenöl ³	5	5	5
Zellulose ⁴	5	5	5
Mineralstoffe ⁵	5	5	5
Vitamine ⁶	2	2	2

¹ Heller und Strauss, Berlin, Deutschland.

² Dauermilchwerk Peiting GmbH, Landshut, Deutschland.

³ Thomy GmbH, Karlsruhe, Deutschland.

⁴ Vivapur (Heweten 20), Rettenmaier & Söhne GmbH + Co., Ellwangen-Holzalmühle, Deutschland.

⁵ Altromin GmbH, Lage, Deutschland (Zusammensetzung der Mineralstoffmischung in mg/g: Ca, 185; P, 145; Na, 88; Mg, 16; K, 140; S, 34; Cl, 72; Fe, 4; Mn, 2; Zn, 0,6; Cu, 0,16; I, 0,008; Mo, 0,2; F, 0,08; Se, 0,004; Co, 0,002).

⁶ Altromin GmbH, Lage, Deutschland (Zusammensetzung der Vitaminmischung in mg/kg: Vitamin A, 225; Vitamin E, 8000; Vitamin K3, 10; Vitamin B1, 1000; Vitamin B2, 1000; Vitamin B6, 750; Vitamin B12, 1,5; Niacin, 2500; Pantothensäure, 2500; Folsäure, 500; Biotin, 10; Cholinchlorid, 50000; p-Aminobenzoesäure, 5000; myo-Inositol, 5000; Vitamin C, 20; Methionin, 3500; Vitamin D3, 500 IE).

^a berechnet auf den Quercetinanteil.

die Analysen von Metaboliten verwendet. Außerdem wurden Gewebeproben für die Bestimmung von Polyphenolen aufgearbeitet. Aus dem distalen Grenzgebiet der Entzündung wurden 2 cm Gewebe für histologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen, sofort in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und bei -80 °C eingefroren. Gewogen und eingefroren wurden auch Organe. Der Durchführung der experimentellen Studie wurde von der Ethikkommission der Freien Universität Berlin nach Paragraph 8 Absatz 1 zugestimmt, Genehmigungsnummer G0129/98.

Analysen: Zur Bestimmung der hämatologischen Parameter und des Differentialblutbildes wurde der Automat Technicon H.1E (Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland) genutzt. Die Trennung der SCFA erfolgte auf einer HP-FFAP-Säule (30 m × 0,53 mm) im GC-System von Hewlett-Packard (Waldbronn, Deutschland) bestehend aus dem HP Chromatographen 5890 Serie II, dem HP 7673 GC/SFC Injector, dem HP GC-Autosampler Controller, einem FID-Detektor und der Software-HP Chemstation. Der Split betrug 1:1. Als Trägergas wurde Helium eingesetzt^[nach 27]. Zur Analyse von Rutin und

anderen Polyphenolen erfolgte die Trennung der extrahierten phenolischen Verbindungen mittels einer RP-HPLC-Anlage (Fa. Jasco, Groß Umstadt, Deutschland) an einer LiChrospher MD-910 100 RP-18-Säule (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einem Acetonitril Gradienten in verdünnter Essigsäure. Zur Detektion wurden ein Diodenarray-Detektor L 4500A sowie ein elektrochemischer 12-Kanal-Coul-Array-Detektor (ESA, Milwaukee, USA) eingesetzt^[nach 28].

Für histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurden gewaschene und dehydrierte Proben in Histoplast (Shandon, Frankfurt, Deutschland) eingebettet und 2 µm dicke Schnitte hergestellt. Letztere wurden mit Toluol entwachst und rehydriert, bevor sie spezifisch gefärbt oder Reaktionen mit spezifischen Antikörpern vorgenommen wurden. An mit Hämalun und Eosin (H&E) gefärbten Schnitten wurde der Einfluss von RS3 auf die Tiefe der Krypten im Kolon bestimmt^[29]. Zur immunhistochemischen Analyse wurden Serienschnitte verwendet. Folgende Antikörper wurden eingesetzt: PKC-δ (Fa. Santa Cruz Biotechnology, USA), NF-κB p65 (Santa Cruz) und I-κB (Cell Signaling Technology, USA).

Die Bestimmung des Körperfettgehaltes erfolgte unter Anwendung der dual-energy x-ray Absorptiometrie^[30].

TNBS-Kolitis-Score: Der Score wurde in Anlehnung an frühere Arbeiten entwickelt^[31, 32]. Berücksichtigt wurden die Folgen der Entzündung nach einem Punktsystem, dazu zählten: ein Gewichtsverlust der Tiere, hämatologische Parameter, makroskopische und mikroskopische Veränderungen des Kolongewebes sowie Färbung und Konsistenz des Dickdarminhaltes. Die maximale Punktzahl betrug 18. Die Einteilung des Schwere-

grades der Entzündung wurde wie folgt festgelegt: 0–2 Punkte normal, 3–5 leichte, 6–10 mittelschwere bis schwere Entzündung und 11–18 hochgradige Entzündung.

Statistische Auswertung: Für die statistischen Analysen wurde das Statistical Package for Social Sciences Software SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) eingesetzt. Die Werte werden als Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Daten wurden durch einseitige ANOVA und dem Dunnett's t-Test analysiert. Wenn die Varianzen heterogen waren, wurden die Daten vor der Analyse Logarithmus-transformiert. Differenzen von $P < 0,05$ werden als signifikant angesehen. Eine „Sample Size Calculation“ wurde durchgeführt. Einige Ergebnisse werden graphisch mittels Box-Plots dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Gewichtszunahme und präbiotische RS3-Effekte

Die noch im Wachstum befindlichen Ratten dieser Studie adaptierten sich innerhalb einer Woche gut an die drei verschiedenen Fütterungsregimes und zeigten vergleichbare Gewichtszunahmen. Die Zufuhr des Präbiotikums in Form von RS3 bewirkte erwartungsgemäß in allen Darmabschnitten eine signifikante Gewichtszunahme der Inhalte (Tab. 2). Dieser Effekt ging mit einer entsprechenden Erhöhung der Wandgewichte im Gastrointestinaltrakt (GIT) einher, die am stärksten im Duodenum, Ileum und distalen Kolon ausgeprägt war (Tab. 3).

Tab. 2: Gewichte der Darminhalte von TNBS-Ratten; Tab. 2: Weights of intestinal contents of TNBS-rats

Gruppe	Tag	Duodenum (g Feuchtgewicht)	Ileum	Caecum (g Feuchtgewicht)	prox. Kolon	dist. Kolon
K	0	0,105 ± 0,031	0,880 ± 0,150	4,836 ± 0,797	0,938 ± 0,176	0,905 ± 0,178
	4	0,082 ± 0,022	0,724 ± 0,108	4,900 ± 0,425	1,147 ± 0,195	0,866 ± 0,107
	11	0,208 ± 0,051	0,258 ± 0,062	5,420 ± 0,910	0,887 ± 0,064	0,919 ± 0,171
	21	0,152 ± 0,050	0,242 ± 0,028	6,389 ± 0,255	1,264 ± 0,021	1,234 ± 0,060
S	0	0,162 ± 0,052	1,357 ± 0,312a	6,042 ± 0,423a	0,962 ± 0,169	1,015 ± 0,149
	4	0,087 ± 0,017	0,721 ± 0,062	6,727 ± 0,875b	1,403 ± 0,154a	1,322 ± 0,238a
	11	2,588 ± 0,445c	0,605 ± 0,145	5,733 ± 1,070	1,660 ± 0,206c	2,088 ± 0,684a
	21	3,701 ± 0,431c	0,438 ± 0,096a	9,128 ± 0,365c	1,571 ± 0,286	2,473 ± 0,684c
SR	0	0,062 ± 0,015a*	1,039 ± 0,098	8,207 ± 1,012c*	1,329 ± 0,195	2,269 ± 0,471c*
	4	0,098 ± 0,025	0,742 ± 0,223	10,632 ± 0,362c*	1,429 ± 0,412a*	2,166 ± 0,342c*
	11	0,385 ± 0,065c	0,648 ± 0,113c	9,191 ± 0,915c*	2,110 ± 0,228c*	2,237 ± 0,182c
	21	3,700 ± 0,431c	0,427 ± 0,074b	9,222 ± 0,822c	2,097 ± 0,362b*	2,436 ± 0,373

Versuchsgruppen: K, Kontrolle; S, resistente Stärke; SR, resistente Stärke + Rutin.

Werte sind Mittelwerte ± SEM (n = 4–6); *P < 0,05, ^bP < 0,005, ^cP < 0,001 (gegenüber demselben Versuchstag der Kontrollgruppe);

*P < 0,05 (gegenüber demselben Tag der S-Gruppe).

Tab. 3: Wandgewichte im Gastrointestinaltrakt von TNBS-Ratten; Tab. 3: Weights of gastrointestinal walls in TNBS-rats

Gruppe	Tag	Magen (g Feuchtgewicht)	Duodenum	Ileum	Caecum (g Feuchtgewicht)	prox. Kolon	dist. Kolon
K	0	1,555 ± 0,133	0,605 ± 0,082	0,595 ± 0,132	0,946 ± 0,174	0,284 ± 0,017	0,202 ± 0,064
	4	1,475 ± 0,076	0,466 ± 0,104	0,525 ± 0,174	0,839 ± 0,114	0,419 ± 0,094	0,459 ± 0,169
	11	1,646 ± 0,096	0,718 ± 0,113	0,677 ± 0,112	0,971 ± 0,161	0,469 ± 0,106	0,274 ± 0,026
	21	1,720 ± 0,020	0,724 ± 0,123	n. b.	0,885 ± 0,092	0,271 ± 0,024	0,288 ± 0,011
S	0	1,620 ± 0,145	0,941 ± 0,188b	1,177 ± 0,199c	1,047 ± 0,091	0,373 ± 0,038c	0,277 ± 0,028
	4	1,426 ± 0,134	0,594 ± 0,074a	0,484 ± 0,109	1,060 ± 0,115a	0,399 ± 0,080	0,374 ± 0,038
	11	1,767 ± 0,031a	1,057 ± 0,107c	0,858 ± 0,117a	1,392 ± 0,071c	0,408 ± 0,068	0,313 ± 0,076
	21	1,827 ± 0,078a	1,024 ± 0,167a	n. b.	1,396 ± 0,063c	0,366 ± 0,034b	0,344 ± 0,028b
SR	0	1,562 ± 0,050b	0,859 ± 0,127b	0,927 ± 0,174b	1,209 ± 0,067a*	0,382 ± 0,024c	0,256 ± 0,029
	4	1,606 ± 0,176	0,781 ± 0,234a	0,630 ± 0,115	1,324 ± 0,117c*	0,399 ± 0,064	0,372 ± 0,038
	11	1,832 ± 0,114a	1,096 ± 0,159b	0,732 ± 0,074	1,501 ± 0,050c*	0,415 ± 0,045	0,323 ± 0,046
	21	1,824 ± 0,077a	1,014 ± 0,141a	n. b.	1,421 ± 0,061c	0,358 ± 0,041b	0,304 ± 0,017*

Versuchsgruppen: K, Kontrolle; S, resistente Stärke; SR, resistente Stärke + Rutin.

Werte sind Mittelwerte ± SEM (n = 4–6); *P < 0,05, ^bP < 0,005, ^cP < 0,001 (gegenüber demselben Versuchstag der Kontrollgruppe);

*P < 0,05 (gegenüber demselben Tag der S-Gruppe); n. b., nicht bestimmt.

An den H&E-gefärbten Gewebsschnitten ließ sich darüber hinaus feststellen, dass RS3 auch zu einer regelmäßigeren Anordnung und Vertiefung der Krypten mit einem gesteigerten Gehalt an Becherzellen führte.

3.2 Verwertung von Rutin

Rutin und das Aglycon Quercetin, die modifizierten Verbindungen Isorhamnetin und Homovanillinsäure (HVA) sowie das Abbauprodukt 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure (3,4-DHPE) ließen sich nur im Gastrointestinaltrakt der Tiere nachweisen, deren Futter durch den kleinen Zusatz von Rutin ergänzt wurde. Die höchsten Rutinkonzentrationen wurden im Ileuminhalt mit über 0,6 µmol/kg Trockenmasse bestimmt. Die Quercetinspiegel waren z. T. geringer und erreichten nur im Mageninhalt Werte um 50 nmol/kg TM (Tab. 4). Die Konzentrationen der 3,4-DHPE lagen dagegen in allen Darminhalten im mikromolaren Bereich. Das traf jedoch nicht für die HVA zu.

Tab. 5 zeigt eine Zusammenstellung der Flavonoidbefunde in den Zellen der Schleimhaut des GIT sowie im Leber- und Nierengewebe. In den Magen- und Darmwänden waren mikromolare Rutinkonzentrationen vorhanden, die höchsten Werte wurden im proximalen Kolon festgestellt. Die Quercetinkonzentrationen waren um eine Größenordnung geringer und nahmen in der Dickdarmschleimhaut deutlich ab. Parallel dazu stieg die Isorhamnetinkonzentration an. Die höchsten 3,4-DHPE-Konzentrationen waren in den Wänden des Caecums und des proximalen Kolons nachzuweisen. Durch die Umwandlung des Aglycons in die nicht oxidativ wirksamen Verbindungen HVA und Isorhamnetin kann oxidativen Belastungen durch Quercetin vorgebeugt werden. Der Plasmaspiegel der Quercetinglucuronide betrug $4,23 \pm 1,63$ nMol/L. Rutin trat in der Leber und im Nierengewebe erwartungsgemäß nicht mehr auf, das Aglycon war glucuroniert vorhanden. Die Spiegel der phenolischen Verbindungen waren in der Niere,

Tab. 4: Rutin und Rutinmetabolite in Magen- und Darminhalten von TNBS-Ratten, deren Diät RS3/Rutin enthielt (d 21)

Tab. 4: Rutin and rutin metabolites in gastro-enteric contents of TNBS-rats fed a RS3/rutin supplemented diet (d 21)

Darminhalte	n	3,4-DHPE (µmol/kg TM)	HVA (nmol/kg TM)	Rutin (nmol/kg TM)	Quercetin (nmol/kg TM)	Isorhamnetin (nmol/kg TM)
Magen	7	0,05 ± 0,05	674,1 ± 152,5	235,9 ± 39,3	49,47 ± 18,13	0
Duodenum	8	10,55 ± 1,49	23,60 ± 49,95	343,8 ± 159,2	5,61 ± 12,86	0
Jejunum	9	6,69 ± 1,74	985,9 ± 398,9	295,7 ± 37,3	16,15 ± 10,55	0
Ileum	9	8,86 ± 2,32	1253,7 ± 250,7	661,5 ± 334,1	14,84 ± 3,30	0
Caecum	9	2,57 ± 1,01	860,2 ± 61,0	14,03 ± 8,73	27,04 ± 9,89	4,44 ± 0,63
prox. Kolon	7	2,51 ± 0,62	1551,3 ± 299,5	71,87 ± 57,15	19,13 ± 7,91	4,76 ± 2,85
dist. Kolon	7	2,57 ± 0,51	868,4 ± 269,7	12,32 ± 5,13	29,68 ± 11,87	5,71 ± 1,59

Werte sind Mittelwerte ± SEM. 3,4-DHPE, 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure; HVA, Homovanillinsäure; TM, Trockenmasse; n, Anzahl der Tiere.

Tab. 5: Rutin und Rutinmetabolite in Wänden des Gastrointestinaltraktes sowie Leber- und Nierengewebe von TNBS-Ratten, deren Diät RS3/Rutin enthielt (d 21)

Tab. 5: Rutin and rutin metabolites in walls of the gastrointestinal tract and in the tissue of liver and kidney from rats got a diet supplemented by RS3/rutin (d 21)

Darmwand bzw. Organ	n	3,4-DHPE ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse)	HVA ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse)	Rutin ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse)	Quercetin ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse)	Isorhamnetin ($\mu\text{mol/kg}$ Trockenmasse)
Magen	7	0	0,30 \pm 0,17	46,01 \pm 4,01	4,70 \pm 3,60	0,40 \pm 0,16
Duodenum	8	0,47 \pm 0,16	1,28 \pm 0,42	36,83 \pm 6,21	2,30 \pm 0,78	1,55 \pm 0,41
Jejunum	9	0	0,40 \pm 0,13	24,88 \pm 9,04	0,97 \pm 0,48	0,94 \pm 0,60
Ileum	9	0,19 \pm 0,18	1,90 \pm 0,94	40,92 \pm 21,38	4,28 \pm 3,96	3,97 \pm 2,15
Caecum	9	66,40 \pm 40,53	1,05 \pm 0,29	34,39 \pm 14,24	7,06 \pm 1,26	22,52 \pm 4,26
prox. Kolon	7	17,51 \pm 5,40	2,88 \pm 0,94	194,74 \pm 102,22	3,55 \pm 0,48	10,11 \pm 3,82
dist. Kolon	5	4,50 \pm 1,69	1,64 \pm 1,33	37,48 \pm 43,72	1,56 \pm 0,84	1,65 \pm 1,05
Leber	5	1,46 \pm 0,14	0,32 \pm 0,26		0,15 \pm 0,05	0,27 \pm 0,09
Niere	5	1,77 \pm 0,25	0,75 \pm 0,06		1,03 \pm 0,46	0,88 \pm 0,22

Werte sind Mittelwerte \pm SEM. 3,4-DHPE, 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure; HVA, Homovanillinsäure; TM, Trockenmasse; n, Anzahl der Tiere.

über die sie ausgeschieden werden können, höher als in der Leber. Da in der Leber ebenso wie in der Niere 3,4-DHPE bis zu mikromolaren Konzentrationen nachzuweisen war, ist davon auszugehen, dass in der Leber ein oxidativer Abbau des Flavonoidgerüsts möglich ist und 3,4-DHPE, das Endprodukt des Quercetinabbaus, sowohl über die Niere als auch über den enterohepatischen Kreislauf ausgeschieden werden kann.

3.3 Entzündungsreaktionen bei TNBS-Ratten

Die intrakolonale Installation des kontaktsensibilisierenden Allergens TNBS löste in den nachfolgenden Tagen eine akute Entzündungsreaktion aus, die zu einem kompletten Verlust der Schleimhaut in den betroffenen Arealen des distalen Kolons führte. Zum Teil ließen sich auch noch Schleimhautreste und eine deutlich verstärkte Muskelschicht finden. Das Maximum der Entzündung, das durch eine starke Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen charakterisiert war, wurde am vierten bis sechsten Tag nach der Induktion erreicht. Danach trat eine Regenerierung des Gewebes ein, die am elften Tag überprüft wurde. In dieser Periode war ein Einwachsen stark proliferierender, z. T. auch von hyperplastischen Krypten festzustellen, die einen verminderten Gehalt an Becherzellen aufwiesen. Nekrotische Reste von Krypten waren nicht mehr vorhanden. Die Infiltration von Entzündungszellen hatte abgenommen. In der Regenerationszone war ein Kryptbranching zu beobachten, das mit einer noch unregelmäßigen Architektur der Schleimhaut einherging. In der Tela submucosa im Bereich der neugebildeten Krypten waren z. T. noch leichte Ödeme und entzündliche Infiltrate zu finden. Nach 21 Tagen waren die Entzündungsprozesse bei

der verwendeten TNBS-Konzentration nahezu vollständig abgeschlossen und die durch die Noxe hervorgerufenen Ulzera nur noch als Narbengewebe zu erkennen. Die Architektur der Schleimhaut entsprach weitgehend wieder dem Ausgangsniveau und zeigte eine normale Anzahl von Becherzellen. Entzündliche Infiltrate waren nur noch vereinzelt in der Tela submucosa zu erkennen. Für die transmurale granulomatöse Entzündung, die durch TNBS ausgelöst wurde, waren Hyperämien, Ödeme, Verdickungen der Kolonschleimhaut und Ulzerationen typisch. In H&E-gefärbten Schnitten ließen sich in den verdickten Abschnitten der Kolonwand Infiltrationen von T-Zellen und Makrophagen sowie Cluster von Lymphozyten erkennen. Die durch TH-1-Zellen (T-Helferzellen Subpopulation 1) vermittelte adaptive zelluläre Immunantwort führte zur Produktion von großen Mengen an TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen.

Da durch TNBS außerdem die Toleranz der Darmschleimhaut gegenüber der eigenen intestinalen Mikrobiota verloren geht^[33], zeigt das verwendete TNBS-Modell Ähnlichkeiten zum Morbus Crohn, führte jedoch nicht zu einer chronischen Darmerkrankung. Es erwies sich somit für die Überprüfung der Aufgabenstellung als geeignet. Das klinische Bild wurde in der akuten Entzündungsphase von einem durchschnittlichen Gewichtsverlust von 25 g (wobei sich der Fettanteil am Körpergewicht um ca. 30 % verminderte), blutigen Diarrhöen und Anämie bestimmt. Die Hämatokritwerte, die Anzahl der Erythrozyten und der Hämoglobingehalt nahmen signifikant ab. Parallel dazu stiegen die MCV-Werte (Mean Corpuscular Volume) an, was auf eine vermehrte kompensatorische Ausschüttung junger unreifer erythroider Zellen zurückzuführen war.

Die Anämie war bei den Tieren, die das Kontrollfutter erhielten, signifikant stärker ausgeprägt als bei Ratten der RS3- und RS3/Rutin-Gruppe. Die Anämie blieb bis weit hinein in die Regenerationsperiode bestehen. Das Differentialblutbild zeigte während der akuten Entzündung eine starke Leukozytose mit einer Zunahme der neutrophilen Granulozyten. Diese Veränderungen klangen in der Regenerationsphase weitgehend ab. Im Vergleich zu den Ratten mit Kontrolldiät waren bei den Tieren, die RS3 bzw. RS3/Rutin zusätzlich aufnahmen, weniger Einblutungen, Schleimhautödeme und Infiltrationen festzustellen. Am Kolitis-Tag 21 war die Kolonschleimhaut bei den Tieren der RS3- und RS3/Rutin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe reicher an regenerierten Krypten. Diese zeigten außerdem einen höheren Gehalt an Muzin in den Becherzellen.

3.4 Kolitis-Score

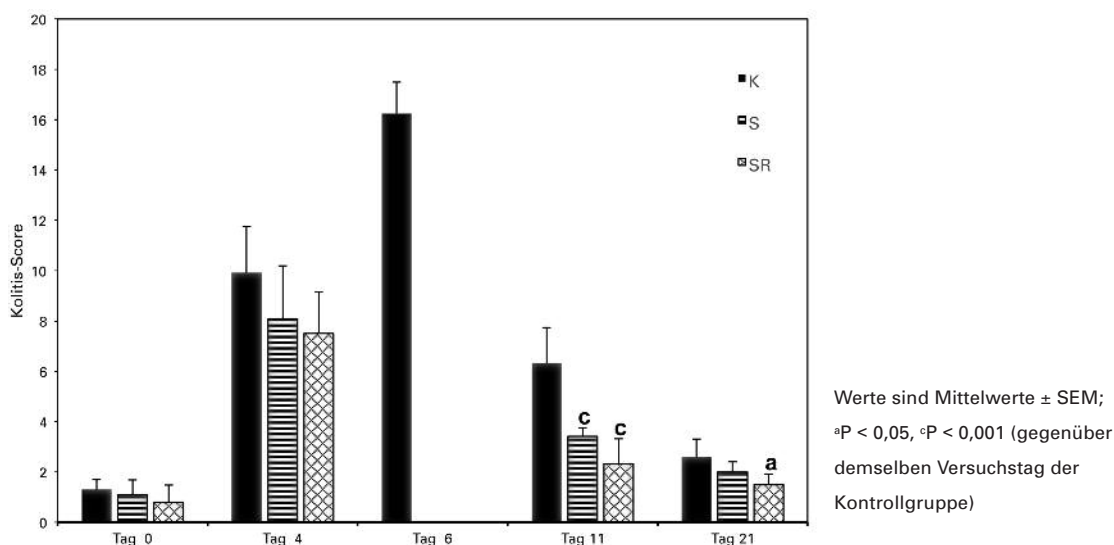
Die Unterschiede im Schweregrad der Entzündung während des Verlaufs der TNBS-Kolitis wurden bei den Tieren mit den drei verschiedenen Ernährungsregimen mit Hilfe des Kolitis-Scores verglichen (Abb. 1). Der Schädigungs-Score stieg am vierten Kolitis-Tag bei den Ratten der Kontrollgruppe bis auf durchschnittlich 9,9 an und lag mit 7,4 bei den Tieren der RS3/Rutin-Gruppe am niedrigsten. Der stärkste Schädigungsgrad trat bei zwei Tieren der Kontrollgruppe am sechsten Kolitis-Tag mit 16,2 Punkten auf. Signifikant geringer waren die Punktzahlen für den Schädigungs-Score bei der RS3- und RS3/Rutin-Gruppe im Vergleich zu den Tieren mit der Kontrolldiät am Tag 11 und auch am Tag 21.

3.5 SCFA-Konzentrationen in Dickdarmabschnitten

Wie wirkten sich die Entzündungsprozesse auf den Stoffwechsel der Bakterien und der Epithelzellen im Kolon aus? Die Ergebnisse von *in vitro* durchgeführten Fermentationsversuchen mit frisch entnommenen Proben des Koloninhaltes der Versuchstiere lieferten keinen Hinweis darauf, dass durch eine TNBS-Behandlung die Fermentationsraten verändert wurden. Signifikante Veränderungen in den SCFA-Konzentrationen traten aber *in vivo* im Lumen des Dickdarms auf. Sie waren am stärksten im distalen Kolon und im Rektum ausgeprägt, aber auch im proximalen Kolon und Caecum nachweisbar. Bei den TNBS-Tieren, die die Kontrolldiät erhielten, zeichnete sich im Lumen ein Anstau der SCFA ab. Hervorzuheben ist jedoch, dass dieser Effekt für Butyrat nicht bei den Tieren festzustellen war, deren Futter durch RS3 plus Rutin ergänzt worden war. Im Gegenteil, die Konzentrationen an Butyrat dieser Ratten verminderten sich sogar am vierten Tag in allen Dickdarmabschnitten, was eine verstärkte Resorption dieser SCFA vermuten ließ (Tab. 6a-c). Um diese Aussagen verdeutlichen zu können, wurden Differenzen zwischen den Butyrat-Konzentrationen der einzelnen Dickdarmkompartimente gebildet (Abb. 2). Obwohl diese Differenzen die Resultate aus den bakteriellen Bildungsraten und der Resorption der SCFA durch den SMCT1 widerspiegeln, deuten sie doch darauf hin, dass bei den Tieren, die die Standardkost erhielten, eine Hemmung der SCFA-Resorption in der akuten Entzündungsperiode eintrat. Eine verminderte Resorption von Butyrat war auch noch in der Regenerationsphase bis zum Ko-

Abb. 1. Verhalten des Scores im Verlauf der TNBS-Kolitis von Ratten bei verschiedenen Futterzusammensetzungen, Kontrolldiät (K), angereichert mit RS3 (S) oder RS3/Rutin (SR)

Fig. 1. Changes of the score during TNBS-colitis of rats fed with different compositions of food, control diet (K), supplemented by RS3 (S) or by RS3/rutin (SR)



Tab. 6a: Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in Caecuminhalten von TNBS-Ratten

Tab. 6a: Short-chain fatty acids (SCFA) in caecal contents of TNBS rats

Gruppe	Tag	Acetat ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht)	Propionat	Butyrat	Gesamt-SCFA	n
K	0	23,17 \pm 0,55	8,59 \pm 0,26	3,80 \pm 0,20	35,56 \pm 0,80	6
	4	26,86 \pm 0,76	8,40 \pm 0,43	3,80 \pm 0,30	39,05 \pm 0,88	10
	6	27,44 \pm 0,63	6,64 \pm 0,77	3,75 \pm 1,03	37,83 \pm 1,17	2
	11	27,55 \pm 1,24	7,75 \pm 0,27	3,71 \pm 0,20	39,02 \pm 1,13	10
	21	24,74 \pm 1,01	8,76 \pm 0,81	4,40 \pm 0,29	37,91 \pm 0,67	5
S	0	52,64 \pm 1,03c	10,97 \pm 0,58a	9,07 \pm 0,42c	72,61 \pm 0,62c	6
	4	48,02 \pm 1,12c	11,78 \pm 0,23b	12,04 \pm 0,54c	71,84 \pm 1,22c	6
	11	51,02 \pm 2,96c	12,33 \pm 0,27c	11,66 \pm 0,25c	75,00 \pm 2,96c	6
	21	58,26 \pm 1,93c	14,79 \pm 0,38c	12,57 \pm 1,71b	85,61 \pm 1,69c	6
SR	0	34,74 \pm 0,95c*	8,96 \pm 0,28*	8,66 \pm 0,56c	52,36 \pm 1,63c*	6
	4	37,26 \pm 0,71c*	10,08 \pm 0,68*	5,81 \pm 0,65a*	53,14 \pm 1,25c*	5
	11	43,39 \pm 2,01c	9,77 \pm 0,43b*	6,54 \pm 0,18c*	59,70 \pm 2,23c*	5
	21	39,83 \pm 1,06c*	10,13 \pm 0,52*	8,50 \pm 0,55c	58,45 \pm 1,39c*	6

Tab. 6b: Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in Inhalten des proximalen Kolons von TNBS-Ratten

Tab. 6b: Short-chain fatty acids (SCFA) in contents of proximal colon of TNBS rats

Gruppe	Tag	Acetat ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht)	Propionat	Butyrat	Gesamt-SCFA	n
K	0	11,70 \pm 0,32	3,21 \pm 0,24	1,40 \pm 0,11	16,31 \pm 0,49	6
	4	11,71 \pm 0,62	3,82 \pm 0,22	1,46 \pm 0,16	16,99 \pm 0,80	8
	6	30,02 \pm 1,35	5,90 \pm 0,40	3,04 \pm 0,57	38,98 \pm 0,40	2
	11	8,29 \pm 0,88	3,46 \pm 0,39	1,47 \pm 0,24	13,22 \pm 1,37	5
	21	9,15 \pm 0,44	3,27 \pm 0,14	1,26 \pm 0,11	13,69 \pm 0,57	4
S	0	45,14 \pm 0,88c	8,19 \pm 0,47c	5,30 \pm 0,38c	58,64 \pm 0,94c	6
	4	39,06 \pm 1,03c	8,63 \pm 0,22c	8,23 \pm 0,41c	55,92 \pm 1,28c	6
	11	43,32 \pm 2,50c	9,03 \pm 0,08c	8,32 \pm 0,57c	60,68 \pm 2,19c	6
	21	47,81 \pm 1,37c	10,18 \pm 0,42c	8,10 \pm 0,86c	66,08 \pm 1,49c	6
SR	0	30,51 \pm 1,03c*	6,76 \pm 0,36c*	4,67 \pm 0,45c*	41,94 \pm 1,64c*	6
	4	31,92 \pm 0,40c*	8,30 \pm 0,65c	3,40 \pm 0,27c	43,61 \pm 0,85c*	5
	11	35,23 \pm 2,10c	7,03 \pm 0,33c*	4,91 \pm 0,08c*	47,17 \pm 2,40c*	5
	21	32,99 \pm 1,22c*	8,49 \pm 0,51c*	6,77 \pm 0,47c*	48,26 \pm 1,34c*	6

Tab. 6c: Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in Inhalten des distalen Kolons von TNBS-Ratten

Tab. 6c: Short-chain fatty acids (SCFA) in contents of distal colon of TNBS rats

Gruppe	Tag	Acetat ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht)	Propionat	Butyrat	Gesamt-SCFA	n
K	0	11,84 \pm 0,36	2,36 \pm 0,19	1,19 \pm 0,19	15,39 \pm 0,39	6
	4	18,34 \pm 1,33	6,90 \pm 0,53	2,25 \pm 0,21	27,49 \pm 1,93	6
	6	32,92 \pm 1,41	11,13 \pm 1,41	4,75 \pm 0,39	48,79 \pm 2,43	2
	11	8,76 \pm 0,55	3,40 \pm 0,17	1,45 \pm 0,09	13,60 \pm 0,60	5
	21	8,63 \pm 0,67	2,98 \pm 0,33	1,36 \pm 0,10	12,97 \pm 1,02	4
S	0	40,71 \pm 0,80c	7,22 \pm 0,43c	3,97 \pm 0,40c	51,89 \pm 1,00c	6
	4	36,72 \pm 0,81c	7,78 \pm 0,21	6,70 \pm 0,50c	51,20 \pm 1,30c	6
	11	39,50 \pm 2,08c	7,72 \pm 0,08c	5,41 \pm 0,33c	52,63 \pm 1,74c	6
	21	40,88 \pm 1,29c	8,88 \pm 0,36c	6,40 \pm 0,57c	56,16 \pm 1,15c	6
SR	0	28,32 \pm 1,34c*	6,12 \pm 0,38c	4,09 \pm 0,27c	38,53 \pm 1,83c*	6
	4	27,00 \pm 0,98b*	6,90 \pm 0,63	2,57 \pm 0,21*	36,47 \pm 1,33a*	5
	11	27,97 \pm 1,62c*	5,90 \pm 0,51b*	3,94 \pm 0,32c*	37,82 \pm 2,34c*	5
	21	29,90 \pm 0,70c*	6,70 \pm 0,41c*	5,63 \pm 0,36c	41,23 \pm 0,76c*	6

Tab. 6d: Kurzkettige Fettsäuren (SCFA) in Faeces von TNBS-Ratten

Tab. 6d: Short-chain fatty acids (SCFA) in faeces of TNBS rats

Gruppe	Tag	Acetat ($\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewicht)	Propionat	Butyrat	Gesamt-SCFA	n
K	0	11,06 \pm 0,26	2,47 \pm 0,12	1,59 \pm 0,16	15,11 \pm 0,12	6
	4	23,89 \pm 2,72	8,35 \pm 0,98	2,86 \pm 0,30	35,09 \pm 3,83	5
	6	40,49	13,92	7,03	61,44	1
	11	10,63 \pm 0,27	4,53 \pm 0,09	1,97 \pm 0,15	17,13 \pm 0,41	3
	21	10,88 \pm 0,12	4,53 \pm 0,40	1,61 \pm 0,41	17,03 \pm 0,41	2
S	0	38,83 \pm 0,63c	5,31 \pm 0,35c	3,31 \pm 0,37b	47,62 \pm 0,70c	5
	4	30,78 \pm 0,14	5,51 \pm 0,13	5,01 \pm 0,04a	41,29 \pm 0,06	2
	11	37,38 \pm 1,87c	6,41 \pm 0,36b	3,82 \pm 0,28b	47,62 \pm 2,03c	5
	21	35,72 \pm 0,19c	7,21 \pm 0,44a	5,47 \pm 0,45a	48,41 \pm 0,56c	5
SR	0	26,48 \pm 1,25c*	5,28 \pm 0,32c	3,22 \pm 0,25c	34,98 \pm 1,67c*	5
	4	21,45 \pm 2,36	7,06 \pm 1,44	1,96 \pm 0,48*	30,46 \pm 3,32	2
	11	22,88 \pm 1,43b*	5,19 \pm 0,62	3,25 \pm 0,23a	31,32 \pm 1,67b*	3
	21	23,76 \pm 0,49c*	5,47 \pm 0,52	4,08 \pm 0,18b	33,30 \pm 0,90c*	4

Versuchsgruppen: K, Kontrolle; S, resistente Stärke; SR, resistente Stärke + Rutin. Werte sind Mittelwerte \pm SEM; ^aP < 0,05, ^bP < 0,005, ^cP < 0,001 (gegenüber demselben Versuchstag der Kontrollgruppe); *P < 0,05 (gegenüber demselben Tag der S-Gruppe); n, Anzahl der Tiere

itis-Tag 21 deutlich zu erkennen. Diese Hemmung war im Rektum und distalen Kolon stärker als im proximalen Kolon ausgeprägt. Zusätze von RS3 bzw. von RS3/Rutin zum Futter verhinderten offensichtlich die SMCT1-Hemmung. Die Werte unter diesen Diäten ließen vielmehr auf eine verstärkte Aufnahme von Butyrat

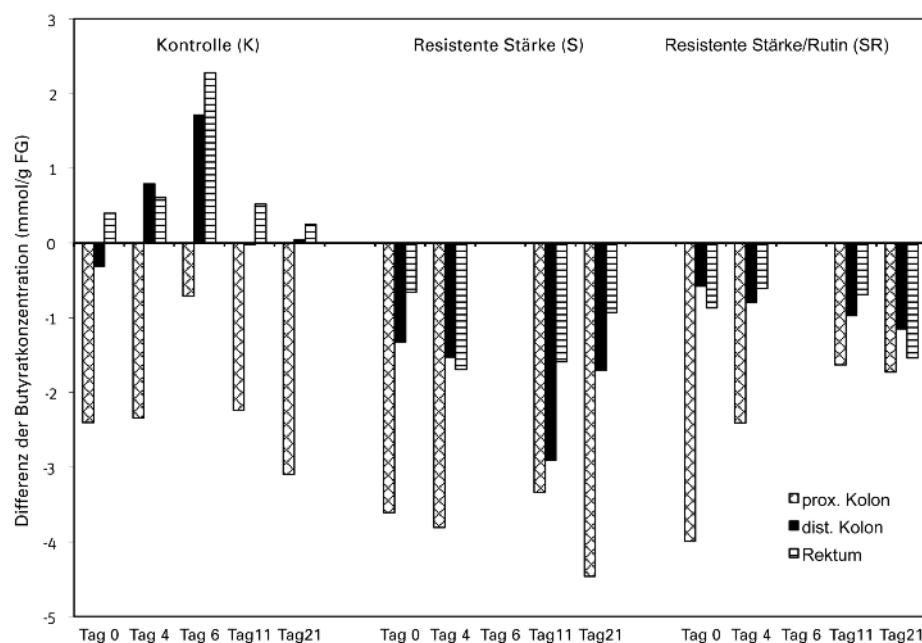
durch die Epithelzellen dieser Tiere schließen, was als Hinweis auf einen höheren Bedarf an Butyrat für die notwendigen Reparaturprozesse zu werten ist. Um diese wichtigen Aussagen verifizieren zu können, wurde ein mathematisches Resorptionsmodell unter Nutzung der experimentellen Daten erarbeitet.

Abb. 2. Scheinbare Hemmung der Butyratresorption im Dickdarm bei TNBS-Kolitis

Die Abb. zeigt die Differenzen der Butyratkonzentrationen zwischen den einzelnen Dickdarmabschnitten während der TNBS-Kolitis von Ratten bei unterschiedlichen Futterangeboten (K, S oder SR)

Fig. 2. Apparent inhibition of butyrate absorption in the large intestine during TNBS-colitis

The fig. shows the differences of the butyrate concentrations between the different parts of the large intestine during TNBS-colitis of rats fed different diets (K, S or SR)



3.6 Entwicklung des mathematischen Modells zur Einschätzung der SCFA-Resorptionsraten

Das mathematische Modell basiert auf folgenden Annahmen:

1. Es erfolgt eine gleichgerichtete distale Bewegung des Chymus mit konstanter Geschwindigkeit (Modellparameter kt).
2. Die Flüssigkeitsvolumina in den Kompartimenten sind konstant.
3. Die bakterielle Bildung der SCFA und deren Resorption ist proportional zur Gesamtmenge der Bakterien im jeweiligen Kompartiment.
4. Die kinetischen Prozesse werden durch eine Massen-Wirkungs-Kinetik beschrieben (d. h. keine Sättigungsbedingungen).
5. Der Verdauungsprozess ist über das betrachtete Zeitintervall stationär (konstante Reaktions- und Transportraten).

Kinetik der Kohlenhydratpolymere

$$\frac{dRS3(i)}{dt} = \frac{kt}{\Omega(i)} (RS3(i-1) - RS3(i)) - kc B(i) RS3(i) \quad (1.1)$$

Der erste Term auf der rechten Seite von (1.1) beschreibt die Aufnahme von RS3 aus dem Kompartiment $(i-1)$ und die Freisetzung in das Kompartiment $(i+1)$, der zweite Term die Spaltung von RS3 zu SCFA.

Kinetik der SCFA

$$\frac{dSCFA(i)}{dt} = kc RS3(i) B(i) + \frac{kt}{\Omega(i)} (SCFA(i-1) - SCFA(i)) - ke(i) SCFA(i) \quad (1.2)$$

Der erste Term auf der rechten Seite von (1.2) beschreibt die Bildung der SCFA durch die Degradation von RS3, der zweite Term die Aufnahme der SCFA aus dem Kompartiment $(i-1)$ und die Freisetzung in das Kompartiment $(i+1)$, der dritte Term beschreibt die Aufnahme der SCFA in Epithelzellen.

Abkürzungen

- kt , konstante Rate der Chymus-Translokation durch das Intestinum;
- kc , Abbaurate der Kohlenhydratpolymere zu SCFA pro Bakterienzellkolonie;
- $B(i)$, Anzahl der Kolonien der bakteriellen SCFA-Bildung und deren Verwertung im Kompartiment i ;
- $ke(i)$, Rate der epithelialen SCFA-Aufnahme im Kompartiment i ;
- $\Omega(i)$, Flüssigkeitsvolumen des Kompartiments

Stationäre Lösung von (1.1)/(1.2)

Für die Kompartimente $i = 2, 3, \dots, n$ gilt

$$RS3(i) = RS3(1) a_i \quad (2.1)$$

$$SCFA(i) = SCFA(1) \prod_{v=2}^i C_v + RS3(1) \sum_{v=2}^i a_v kc(v) \prod_{\mu=v}^i C_\mu \quad (2.2)$$

oder genauer

$$SCFA(2) = (SCFA(1) + RS3(1) a_2 kc(2)) C_2$$

$$SCFA(i) = (SCFA(i-1) + RS3(1) a_i kc(i)) C_i \quad (2.3)$$

dabei sind

$$C_i = \frac{1}{1 + ke(i)}$$

$$a_i = \prod_{\mu=2}^i \frac{1}{1 + kc(\mu)} \quad (3)$$

$$kc(v) = B(v) \Omega(v) \frac{kc}{kt}$$

$$ke(v) = \Omega(v) \frac{ke(v)}{kt} \quad (4)$$

Die Geschwindigkeitskonstanten $kc(v)$ und $ke(v)$, definiert in (4), bestimmen die Geschwindigkeit der bakteriellen SCFA-Bildung und deren epitheliale Aufnahme *relativ* zur Translokationsrate kt des Chymus.

Weitere Vereinfachungen

- (i) Die Konzentration der Bakterien ist in allen Kompartimenten gleich, d. h. $B(i) = \text{konst.} = B$
- (ii) Die Kompartimente haben ein identisches Volumen (d. h. gleiches Volumen der Proben, die aus verschiedenen Segmenten des Intestinums entnommen wurden); $\Omega(i) = \text{konst.} = \Omega$

Mit diesen Vereinfachungen gilt

$$kc(v) = B \Omega \frac{kc}{kt} = kc^*(v)$$

und folglich

$$a_i = \prod_{\mu=2}^i \frac{1}{1 + kc^*(\mu)} \quad (5)$$

Die Gleichungen (2.1) bis (2.3) vereinfachen sich ebenfalls zu

$$RS3(i) = RS3(1) \prod_{\mu=2}^i \frac{1}{1 + kc^*(\mu)} \quad (i=2, \dots, n) \quad (6)$$

und

$$SCFA(2) = (SCFA(1) + RS3(1) a_2 kc^*) C_2$$

$$SCFA(i) = (SCFA(i-1) + RS3(1) a_i kc^*) C_i \quad (7)$$

Die Neuordnung der Gleichungen (7) ergibt eindeutige Ausdrücke für die Koeffizienten C_i :

$$C_2 = \frac{SCFA(2)}{SCFA(1) + RS3(1) \frac{kc^*}{1 + kc^*}}$$

$$C_i = \frac{SCFA(i)}{SCFA(i-1) + RS3(1) \frac{kc^*}{(1 + kc^*)^{i-1}}} \quad (i = 3, \dots, n) \quad (8)$$

Entsprechend der Gleichung (3) stehen die unbekannteren Aufnahmeleistungen $ke(i)$ in Beziehung zu den Koeffizienten C_i durch $ke(i) = 1/C_i - 1$, d. h. bei Anwendung der Gleichungen (8)

$$ke(i) = \frac{SCFA(i-1) + RS3(1) \prod_{\mu=2}^i \frac{1}{1 + kc^*(\mu)}}{SCFA(i)} - 1 \quad (9)$$

Die Gleichung (9) berücksichtigt, dass die gemessenen Veränderungen in der Konzentration der SCFA in den verschiedenen Kompartimenten sowohl auf die epitheliale Aufnahme als auch auf die fortlaufende Abnahme von RS3 zurückzuführen sind.

Berücksichtigt wird weiterhin, dass sich die Abbaugeschwindigkeit von RS3 nicht signifikant weder in gesunden noch in kranken Tieren oder bei Zusatz von Rutin unterscheidet, d. h. der Term

$$a_i = \prod_{\mu=2}^i \frac{1}{1 + kc^*(\mu)}$$

in der Gleichung (9) ist gleich in allen betrachteten Situationen. Dadurch kann die relative Veränderung der Resorptionsraten, wenn zwei experimentelle Fälle I und II verglichen werden, vereinfacht angegeben werden durch

$$\frac{ke_I(i)}{ke_{II}(i)} = \frac{SCFA_I(i-1)/SCFA_I(i) + RS3(1) a_i / SCFA_I(i) - 1}{SCFA_{II}(i-1)/SCFA_{II}(i) + RS3(1) a_i / SCFA_{II}(i) - 1} \quad (i = 2, \dots) \quad (10)$$

Unter der Annahme, dass die Konzentration der resistenten Stärke um Größenordnungen kleiner ist als die Konzentration der Monosaccharid-Einheiten und der aus ihnen gebildeten SCFA-Moleküle, kann der zweite Term im Zähler und Nenner der Gleichung (10) vernachlässigt werden. Dadurch lässt sich diese Formel reduzieren zu

$$\frac{ke_I(i)}{ke_{II}(i)} = \frac{SCFA_I(i-1)/SCFA_I(i) - 1}{SCFA_{II}(i-1)/SCFA_{II}(i) - 1} \quad (i = 2, \dots) \quad (11)$$

3.7 Anwendung des mathematischen Modells

Mit diesem mathematischen Modell ließ sich eine gute Anpassung zwischen den gemessenen und errechneten Werten für die Konzentrationen der SCFA erreichen und damit belegen, dass das mathematische Modell

trotz der vorgenommenen Vereinfachungen die Tendenz des nicht monotonen Verlaufs im Verhalten der SCFA-Spiegel in den Dickdarmkompartimenten korrekt beschreibt. Mit Hilfe von Gleichung (11) können die relativen Veränderungen in der Resorptionsrate der SCFA-Konzentrationen berechnet werden (s. Tab. 7). Die SCFA-Konzentrationen im Caecum wurden dabei als Referenzwerte genommen.

Die in Tab. 7 zusammengefassten berechneten Resorptionsraten von SCFA durch die Epithelzellen erlauben folgende Schlussfolgerungen:

1. Die TNBS-Kolitis führt bei den Ratten, die die Standarddiät aufnehmen, zu einer drastischen Hemmung der SCFA-Resorption. Diese Hemmung war erwartungsgemäß in der akuten Entzündungsphase am stärksten im Rektum und distalen Kolon ausgeprägt, wo die Resorption von SCFA vollständig zum Erliegen kam. Die Hemmung war aber auch im proximalen Kolon und sogar im Caecum noch nachweisbar, obwohl die TNBS-Induktion nur im distalen Kolon erfolgte und auch nur dort Ulzerationen auftraten.

2. Substitution von RS3 im Futter schwächte die Hemmung der SCFA-Resorption deutlich ab, konnte sie aber nicht vollständig verhindern. Durch den Futterzusatz von RS3/Rutin wurden dagegen präventive Bedingungen geschaffen, durch die eine Hemmung der SCFA-Resorption auch in der akuten Phase der Kolitis verhindert wurde. Dadurch war es möglich, während des Krankheitsverlaufes mehr SCFA und damit auch Butyrat aus dem Lumen des Dickdarmes zu resorbieren, die Entzündungsreaktionen abzuschwächen und eine beschleunigte Regeneration der Darmschleimhaut einzuleiten.

3.8 Einfluss von RS3 und RS3/Rutin auf die Expression von PKC- δ und NF- κ B

Immunhistochemische Befunde unterstreichen, dass RS3 und die Kombination von RS3 und Rutin durch die Aufrechterhaltung der Butyratresorption die Entzündungsreaktion abschwächen und zu einer schnelleren Regeneration führen. Zwei Parameter, die Proteinkinase C- δ (PKC- δ) und NF- κ B, die auf den Entzündungsablauf Einfluss nehmen, sollen das veranschaulichen (Abb. 3). PKC- δ ist im gesunden Kolon-epithel, in fixen und mobilen Zellen der Lamina propria, Tela submucosa, der Gefäßwand und im Plexus myentericus nachweisbar. Im Epithel tritt das PKC-Isoenzym im Cytosol und membrangebunden im luminalen Kryptenviertel auf. Durch RS3-Zufuhr nahm die Immunreaktivität (IR) zu und erstreckte sich im Epithel bis ins zweite Kryptenviertel. Der Futterzusatz von RS3/Rutin schwächte diesen Effekt ab. In den Stromazellen veränderten RS3 und RS3/Rutin die cytosolische

Tab. 7: Nahrungszusätze von RS3 und RS3/Rutin verhindern eine Hemmung des SMCT1 bei Darmentzündungen

Tab. 7: Addition of RS3 and RS3/rutin to diets prevents inhibition of SMCT1 during intestinal inflammation

Kontrollgruppe

	vor Caecum	Caecum	prox. Kolon	dist. Kolon	Rektum
KH	103,382562				
SCFA	22,1922904				
kc		0,21	0,14	0,12	0,08
ke(0)		0,15	1,74	0,54	0,35
ke(4)		0,07	1,42	0,00	0,00
ke(6)		0,00	0,24	0,00	0,00
ke(11)		0,12	1,92	0,65	0,13
ke(21)		0,08	2,25	0,71	0,08

RS3-Gruppe

	vor Caecum	Caecum	prox. Kolon	dist. Kolon	Rektum
RS3	206,765125				
SCFA	44,3845809				
ke(0)		0,11	0,60	0,43	0,31
ke(4)		0,39	0,28	0,10	0,23
ke(11)		0,33	0,24	0,15	0,11
ke(21)		0,18	0,29	0,18	0,16

RS3/Rutin-Gruppe

	vor Caecum	Caecum	prox. Kolon	dist. Kolon	Rektum
RS3	155,073843				
SCFA	33,2884356				
ke(0)		0,15	0,62	0,39	0,32
ke(4)		0,13	0,58	0,52	0,45
ke(11)		0,01	0,59	0,55	0,46
ke(21)		0,04	0,52	0,46	0,44

Konzentrationen von RS3 und SCFA in $\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht bei Eintritt des Chymus in das Caecum.

kc, Abbauraten der Kohlenhydratpolymere zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) pro Bakterienzellkolonie; ke(i), Rate der epithelialen

SCFA-Aufnahme im Kompartiment i; KH, Kohlenhydrate; RS3, resistente Stärke Typ 3.

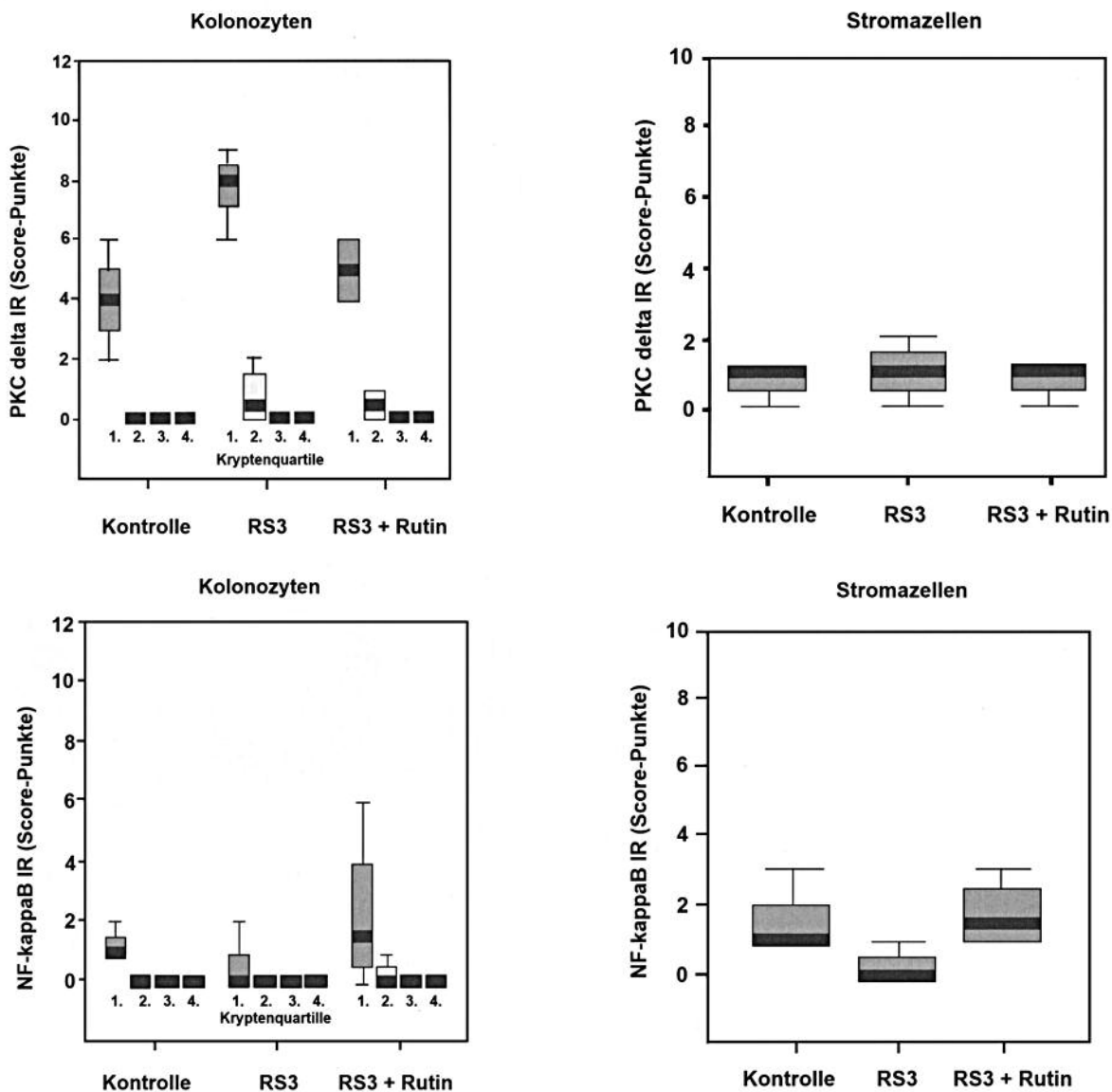
PKC- δ -Konzentration nur geringfügig. Während der Entzündung nahm die PKC- δ -IR erwartungsgemäß in den infiltrierenden mobilen Zellen der Tiere, die das Standardfutter erhielten, signifikant zu. Die hohe PKC- δ -Expression im Saumepithel kann als ein Schutzeffekt gewertet werden; denn das Enzym kann effektiv die Kontrolle von Apoptose und Proliferation über die Aktivität der Cdk2 (Cyklin-abhängige Kinase) und den Transkriptionsfaktor STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription) modulieren.

Die Hemmung des NF- κ B-Komplexes ist in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ein wichtiger Ansatzpunkt (z. B. Mesalazin). Die Lokalisation der NF- κ B-IR entsprach der der PKC- δ . Unter der Zufuhr von RS3 und Rutin nahm die IR von NF- κ B leicht zu und erstreckte sich im Epithel bis in das zweite

Kryptenviertel. Im Verlauf der Entzündung war eine Zunahme der NF- κ B im Bereich dysplastischer Krypten zu verzeichnen und auch am Kryptengrund festzustellen. In der akuten Phase der Entzündung war auch eine kernständige Lokalisation von NF- κ B nachzuweisen. Diese Veränderungen waren bei Tieren unter der Zufuhr von RS3 sowie RS3/Rutin geringer ausgeprägt. Eine IR von I κ B- α war nur bei Tieren mit Standardfutter festzustellen. Auffällig war, dass Veränderungen in der PKC- δ -Konzentration zeitlich immer früher auftraten als die in den NF- κ B-Mustern, was ein Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen den beiden Parametern sein kann. Eine ausführlichere Dokumentation histochemischer Befunde dieser Studie ist in den Promotionsarbeiten von *Marinovic*^[29] und *Florian*^[34] zu finden.

Abb. 3. Einfluss der Futterzusammensetzung (K, S, SR) auf die Lokalisation und Immunreaktivität von PKC- δ und NF- κ B in Kolonepitel- und Stromazellen gesunder Ratten

Fig. 3. Influence of the diets (K, S, SR) on the localization and intensity of the immune reactivity of PKC- δ and NF- κ B in colonocytes and stroma cells of healthy rats



4. Diskussion

Die Funktionsfähigkeit des Kolonepithels setzt die Realisierung von zwei Anforderungen voraus: erstens die Bereitstellung ausreichender Mengen an Butyrat aus der Fermentation der intestinalen Mikrobiota und zweitens die Resorption von Butyrat durch den SMCT1. Sie wurden in dieser experimentellen TNBS-Studie mit dem Zusatz von butyrogener RS3 sowie RS3 plus Rutin zum Standardfutter erfüllt. Beide Zusätze zeigten protektive Effekte bei der TNBS-Kolitis der Ratten. Die klinische Manifestation der Entzündung wurde abgeschwächt und die Erneuerung des geschädigten Darm-

epithels früher und effektiver eingeleitet. Auch die Kontrollmechanismen der Apoptose wurden eher wieder normalisiert^[35]. Butyrat und Rutin bzw. dessen Aglycon Quercetin bewirkten antiinflammatorische Wirkungen über eine Vielzahl von Mechanismen. Das in dieser Studie verwendete Präbiotikum (RS3) wurde auch im Entzündungsstadium sehr gut fermentiert und ergab einen hohen SCFA-Anteil an Butyrat, obwohl Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota nicht auszuschließen waren^[3, 4, 9, 36].

Zu den Butyrat-abhängigen Aufgaben im Kolon zählt die Stimulation der Kontraktion, wodurch die Transit-

zeit verkürzt und die Bildung von sekundären Gallensäuren vermindert^[37] wird. Die Resorption von Butyrat wird ebenso wie die der anderen SCFA durch die Aktivität des SMCT1 bestimmt. Da es sich dabei um einen Natrium-gekoppelten Cotransport mit einer Na⁺-Substrat-Stöchiometrie von 2:1 handelt, wird zugleich auch die Resorption von Na⁺, Cl⁻ und Wasser aus dem Darmlumen stimuliert. Ein Verlust der Aktivität des SMCT1 begünstigt deshalb das Auftreten von Diarrhöen, hemmt die Na⁺/K⁺-ATPase und den Na⁺/K⁺-Austauscher^[3]. Butyrat erfüllt in den Kolonozyten ein breites Spektrum von Aufgaben: Es ist das wichtigste Substrat für den oxidativen Stoffwechsel und damit für die aerobe ATP-Gewinnung und wird weiterhin für Synthesen verwandt^[15]. Darüber hinaus greift Butyrat in epigenetische Regulationsmechanismen ein. Durch seine Eigenschaft als Inhibitor von Histondeacetylasen kann Butyrat die Histone H3 und H4 hyperacetylieren und dadurch die Expression zahlreicher Gene verändern^[3, 38–40]. Zu den Genen, die hoch reguliert werden, zählt auch der SMCT1^[41]. Darüber hinaus wird durch Butyrat eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA für den Transporter erreicht. Butyrat kann weiterhin die Synthese von Tight-Junction-Proteinen und Muzin steigern, was zur Intaktheit der Barrierefunktion und zur Stärkung der Immunabwehr der Kolonschleimhaut beiträgt. Zu den Prozessen, auf die diese SCFA regulatorisch Einfluss nehmen, gehören weiterhin der Zellzyklus, die Differenzierungsvorgänge, die Apoptose, der Citratzyklus, die Atmungskette, die Fettsäureoxidation und die Synthese vieler Transkriptionsfaktoren einschließlich NF-κB und der transkriptionalen Aktivität des β-Catenin/TCF4-Komplexes^[38].

In dieser Arbeit wurde erstmals unter Verwendung der experimentell bestimmten SCFA-Konzentrationen mit Hilfe der mathematischen Modellierung belegt, dass bei den TNBS-Tieren, die mit der Standarddiät ernährt wurden, die Aktivität des SMCT1 während der akuten Entzündung vollständig zum Erliegen kommt (Tab. 7). Das war nicht der Fall bei TNBS-Ratten, deren Futter durch RS3 oder RS3/Rutin ergänzt wurde. Die Hemmung der Resorption von Butyrat aus dem Lumen des Dickdarmes hatte zur Folge, dass alle zuvor erwähnten zellulären Effekte von Butyrat entfielen. Der ATP- und GTP-Spiegel sowie die Gesamtkonzentrationen der Adenin- und Guaninnukleotide in den Epithelzellen nahmen ebenso wie der Spiegel an reduziertem Glutathion ab^[17]. Diese Befunde machen verständlich, dass die Epithelzellen bei einer akuten Entzündung energetische und oxidative Belastungen nicht mehr ausreichend kompensieren können. Das wirkt sich negativ auch auf die Integrität der Zellmembran und ihre Barrierefunktion aus, wodurch mikrobielle Schädigungen

erleichtert werden^[13, 36]. Maßgeblich beteiligt sind daran die Zytokine TNF-α und INFγ, die die Translation der zytoprotektiven Hitzeschockproteine Hsp25 und Hsp70 spezifisch durch eine Stimulierung der RNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) und des eukaryotischen Initiationsfaktors 2α (eIF-2α) hemmen^[42]; dadurch geht ihre Schutzfunktion in der Oberfläche des Kolonepithels verloren. Weiterhin erhöht TNF-α die Permeabilität der epithelialen Tight-Junction-Struktur und senkt somit die Aktivität des mukosalen Immunsystems^[3]. Um einen Schutzeffekt gegenüber Schädigungen durch Lipidhydroxyperoxide aufrecht erhalten zu können, werden im Oberflächenepithel und besonders am Kryptengrund des Kolonepithels die Cyclooxygenase-2 und Glutathionperoxidase-2 hoch reguliert^[34]. TNF-α kann außerdem in Kolonepithelzellen die Expression der Protein Tyrosin-Phosphatase N2 (PTPN2) steigern, wodurch Signalübertragungen durch die mitogen-aktivierte Proteinkinase und die Induktion inflammatorischer Mediatoren abgeschwächt werden. Dieser Effekt spielt wahrscheinlich auch bei chronischen Dickdarm-entzündungen eine wichtige Rolle^[43]. Die bei akuten Entzündungen erfolgende Hochregulation des hoch affinen Glukosetransporters 1 in der luminalen Zellmembran der Kolonozyten trägt zwar zur Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel bei^[44], kompensiert jedoch nicht den Ausfall von Butyrat bei epigenetischen Kontrollmechanismen. In den zurückliegenden Jahren wurde zwar mehrfach auf einen Defekt in der Butyratoxidation im entzündeten Kolon hingewiesen^[44–46], aber erst vor kurzer Zeit im Promotor des SMCT1 ein putatives Butyrat-Response Element identifiziert, das durch diese SCFA stimuliert werden kann^[40, 41, 48]. Die spezifische konzentrationsabhängige Erhöhung des SMCT1 und die Stabilisierung seiner mRNA durch Butyrat benötigen zwar keine Mitwirkungen von Tyrosinkinase oder Protein-Serin/Threoninkinasen, aber die von NF-κB (p65)^[41, 49]. Die Hemmung des SMCT1 wird im Epithel durch TNF-α ausgelöst, das bei akuter Inflammation in großen Mengen gebildet und sezerniert wird. TNF-α vermindert dosisabhängig den mRNA-Spiegel für den SMCT1 und unterbindet damit die Expression dieses Transporters^[46]. Das Zytokin ist deshalb maßgeblich für den Tod der Kolonozyten bei Entzündungen verantwortlich. Da eine SMCT1-Hemmung jedoch nur durch intrazelluläres Butyrat wieder aufzuheben ist, trägt die resorbierte SCFA entscheidend zum Überleben der Epithelzellen bei. TNF-α tritt als Oligotrimer in löslicher und gebundener Form auf. Für die Signalübertragung existieren in der Zellmembran zwei spezifische Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2), die sich in ihren intrazellulären Domänen und damit in ihrer Signalübertragung und Funktion unter-

scheiden. Das erklärt das komplexe Wirkungsspektrum dieses Zytokins, von dem viele inflammatorische Reaktionen initiiert werden. Die Entscheidung darüber, ob die Zellen bei hohen TNF- α -Spiegeln überleben oder untergehen, wird durch Wechselwirkungen zwischen den Mitgliedern der TNF-Ligandenfamilie und denen der TNF-Rezeptorfamilie bestimmt^[50]. TNF- α greift auch in die Transkription von nicht codierenden Mikro-RNAs (miRNAs) ein und damit in posttranskriptionale Kontrollmechanismen^[49]. Dadurch entfällt die Translation von ca. 100 miRNAs. Bisher sind 38 miRNAs bekannt, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind^[51-54].

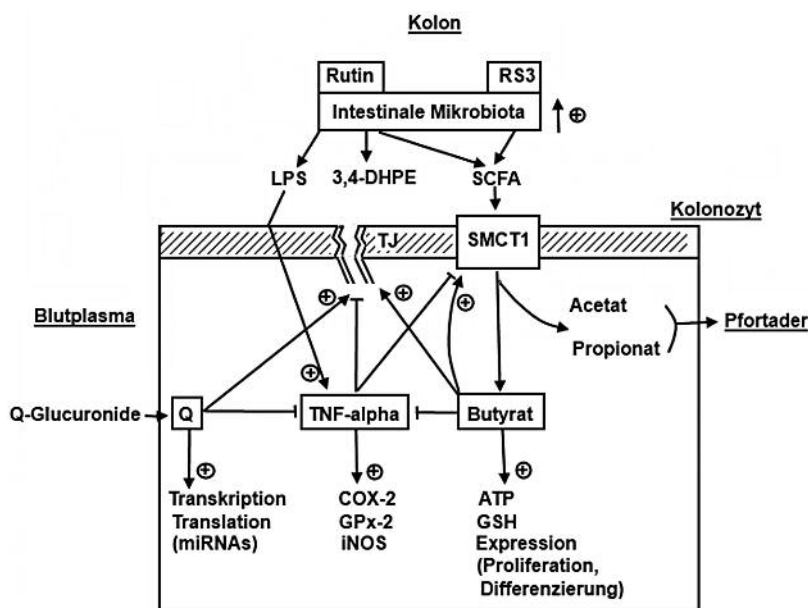
Spezies- und zellspezifische antiinflammatorische Eigenschaften wurden für mehrere Flavonoide und die Polyphenole Resveratrol und Curcumin beschrieben^[22]. Sie ergänzen sich bei Dickdarmentzündungen mit denen des Butyrats, wie in dieser tierexperimentellen Studie gezeigt wurde. Bei Rutin, das zusammen mit RS3 im Futter angeboten wurde, sind ebenfalls systemische Wirkungen von solchen zu unterscheiden, die mit der intestinalen Mikrobiota verbunden sind. Der größte Teil des Rutins wird von den Bakterien im Kolon verstoffwechselt und trägt zur Stabilisierung einer Mikrobiota bei, die fähig ist, die Ansiedlung und Vermehrung pathogener Mikroorganismen zu unterdrücken. Die systemischen antiinflammatorischen Wirkungen des resorbierten Quercetins beruhen hauptsächlich auf Wechselwirkungen mit miRNAs, d. h. sie greifen in posttranskriptionale Kontrollmechanismen ein.

Durch Quercetin kommen dadurch folgende Effekte zustande:

1. Der durch TNF- α induzierte Transkriptionsfaktor NF- κ B wird in intestinalen Epithelzellen gehemmt^[56].
2. Verminderung der durch LPS induzierten Proliferation und Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten und Hemmung der Synthese von TNF- α in LPS-stimulierten mononukleären Zellen^[57].
3. Abnahme der Infiltration von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Darmschleimhaut und Verminderung der Synthese von COX2 und iNOS^[53, 55].
4. Unterdrückung eines aktiven NF- κ B-Signals in aktivierten Makrophagen^[58].
5. In LPS-stimulierten mononukleären Zellen senkt Quercetin die durch INF- γ induzierte Aktivität der Transkriptionsfaktoren STAT1, STAT3 und von NF- κ B (p65)^[21].
6. Die intestinale Barrierefunktion verbessert Quercetin durch eine Verstärkung der Tight-Junction-Strukturen^[24].
7. Als Inhibitor von Histonacetyltransferasen kann das Flavonol die Cofaktorrekutierung des Chromatins und damit die Expression von zahlreichen Genen verändern^[22].

Abb. 4 fasst die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde zusammen. Sie unterstreichen die essentielle Bedeutung der SMCT1-Aktivität für die Funktionserhaltung des Kolonepithels. Die Hemmung dieses für die Resorption von Butyrat unverzichtbaren Transporters in den Epithelzellen des Kolons kann durch die Zufuhr von butyrogener RS3 und Rutin mit der Nahrung ver-

Abb. 4. Protektive Wirkungen von resistenter Stärke Typ 3 (RS3) und von Rutin bzw. Quercetin auf das Kolonepithel
Fig. 4. Protective effects of resistant starch type 3 (RS3) and rutin respectively quercetin on the colon epithelium



hindert werden. Die Kombination von RS3 und Rutin wird als Nahrungsergänzung für die Prävention von Dickdarmentzündungen empfohlen.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Dr. *Morana Bauer-Marinovic*, Dr. *Simone Florian*, Dr. *Katrin Müller-Schmehl* und Dr. *Detlef Schmiedl* für ihre wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der Experimente und der Auswertung der Ergebnisse.

Abkürzungen

Cdk2, Cyklin-abhängige Kinase; 3,4-DHPE, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure; GIT, Gastrointestinaltrakt; GTP, Guanosintriphosphat; H&E, Hämalun und Eosin; Hsp, Hitzeschockprotein; HVA, Homovanillinsäure; IBD, chronisch-entzündliche Dickdarmerkrankungen (engl.: Inflammatory Bowel Disease); IκKβ, Iκ-Kinase-β; IL, Interleukin; INF-γ, Interferon γ; IR, Immunreaktivität; K, Kontrollgruppe; LPS, Lipopolysaccharid; MCV, Mean Corpuscular Volume; miR, Mikro-RNA; mRNA, Messenger RNA; NF-κB, Nuclear Factor kappa B; PKC-δ, Proteinkinase C-δ; PKR, RNA-abhängige Proteinkinase; PTPN2, Tyrosin-Phosphatase N2; RS3, resistente Stärke Typ 3; S, Gruppe erhielt RS3 im Futter; SCFA, kurzkettige Fettsäuren (engl.: Short-Chain Fatty Acids); SIRS, Systemic Inflammatory Response Syndrom; SMCT1, Sodium dependent Monocarboxylate Transporter 1; SR, Gruppe erhielt RS3/Rutin im Futter; STAT, Signal Transducer and Activator of Transcription; TNBS, 2,4,6-Trinitrobenzonsulfonsäure; TNF-α, Tumor Nekrose Faktor α

Literatur

- [1] *Gentschew L., Ferguson L.R.*: Role of nutrition and microbiota in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Mol Nutr Food Res* 2012; 56: 524–535.
- [2] *Hashimoto T. et al.*: ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 2012; 487: 477–481.
- [3] *Jacobasch G., Dongowski G.*: Ballaststoffe/Präbiotika: Biologische Wirkungen und gesundheitsfördernde Effekte in der Prävention. In: *Erbersdobler H.F., Meyer A.H.* (Hrsg.): *Praxishandbuch Functional Food. Diätetische & angereicherte Lebensmittel. Ernährungswissenschaft, Recht, Marketing*, 49. aktualisierte Lieferung, Behr's Verlag, Hamburg, 2011, 1–99.
- [4] *Morgan X.C. et al.*: Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* 2012; 13: R79.
- [5] *Seidler U. et al.*: Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1072: 262–275.
- [6] *Schley P.D., Field C.J.*: The immune-enhancing effects of dietary fibres and probiotics. *Br J Nutr* 2002; 87 (Suppl. 2): S221–S230.
- [7] *Comito D., Romano C.*: Dysbiosis in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel diseases. *Int J Inflamm* 2012; 2012: Article ID 687143.
- [8] *Sansonetti P.*: New aspects of intestinal bacterial invasion (in Französisch). *Gastroenterol Clin Bio* 2002; 26 (Suppl. 5): B24–B31.
- [9] *Sasaki M., Klapproth J.M.A.*: The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct* 2012; 2012: Article ID 704953.
- [10] *Han X. et al.*: Tumor necrosis factor alpha blockade induces an anti-inflammatory growth hormone signalling pathway in experimental colitis. *Gut* 2007; 56: 73–81.
- [11] *Bonizzi G., Karin M.*: The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25: 280–288.
- [12] *Hayden M.S., Ghosh S.*: Shared principles in NF-κB signaling. *Cell* 2008; 132: 344–362.
- [13] *Tateishi H., Mitsuyama K., Toyonaga A., Toyomose M., Tanikawa K.*: Role of cytokines in experimental colitis: relation of intestinal permeability. *Digestion* 1997; 58: 271–281.
- [14] *Gupta N., Martin P.M., Prasad P.D., Ganapathy V.*: SLC5A8 (SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci* 2006; 78: 2419–2425.
- [15] *Roediger W.E.*: Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of rat colon. *Gastroenterology* 1982; 83: 424–429.
- [16] *Tabuchi Y., Arai Y., Konto N., Takeguchi N., Asano S.*: Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1287–1294.
- [17] *Jacobasch G.*: Antiinflammatorische und antikanzerogene Wirkungen von resistenten Stärken und Flavonoiden. *Sitzungsber. Leibniz-Sozietät* 2003; 58: 65–80.
- [18] *Braune A., Gütschow M., Engst W., Blaut M.*: Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 5558–5567.
- [19] *Braune A., Blaut M.*: Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated

- ed human intestinal bacterium. *Environ Microbiol* 2011; 13: 482–498.
- [20] *Simmering R., Pforte H., Jacobasch G., Blaut M.*: The growth of a flavonoid-degrading intestinal bacterium, *Eubacterium ramulus*, is stimulated by dietary flavonoids *in vivo*. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 40: 243–248.
- [21] *Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M., Moilanen E.*: Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediat Inflamm* 2007: Article ID 45673.
- [22] *Jacobasch G.* (Hrsg.): *Flavonoide – ein Geschenk der Pflanzen*. UNI-MED Verlag AG Bremen – London – Boston, 2013.
- [23] *Schmitz H.* et al.: Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) regulates the epithelial barrier function in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112: 137–146.
- [24] *Suzuki T., Hara H.*: Quercetin enhances intestinal barrier function through the assembly of zonula occludens-2, occludin, and claudin-1 and the expression of claudin-4 in caco-2 cells. *J Nutr* 2009; 139: 965–974.
- [25] *Jacobasch G., Schmiedl D., Dongowski G.*: Struktur-Funktions-Beziehungen von resistenten Stärken Typ 3. Teil 1: Präparierung und thermische Stabilität von resistenten Stärken Typ 3. *Ernährung/Nutrition* 2012; 37: 53–73.
- [26] *Morris G.P.* et al.: Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795–803.
- [27] *Schmiedl D., Bäuerlein M., Bengs H., Jacobasch G.*: Production of heat-stable, butyrogenic resistant starch. *Carbohydr Polym* 2000; 43: 183–193.
- [28] *Pforte H., Hempel J., Jacobasch G.*: Distribution kinetics of a flavonoid extract in the gastrointestinal tract of rats. In: *Eisenbrand G., Dayan A.D., Elias P.S., Grunow W., Schlatter J.* (Eds.): *Carcinogenic and Anticarcinogenic Factors in Food*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000, 498–501.
- [29] *Marinovic M.*: Veränderungen der PKC-Isoenzym-, der NF- κ B- und der β -Catenin-Muster bei der kolorektalen Karzinogenese und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen; Effekt der resistenten Stärke Typ III am TNBS- und DMH-Modell. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Potsdam, 2003.
- [30] *Plank L.D.*: Dual-energy X-ray absorptiometry and body composition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 305–309.
- [31] *Kruschewski M., Foitzik T., Perez-Canto A., Hübotter A., Buhr H.J.*: Changes of colonic mucosal microcirculation and histology in two colitis models: an experimental study using intravital microscopy and a new histological scoring system. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2336–2343.
- [32] *Geboes K., Dalle I.*: Influence of treatment on morphological features of mucosal inflammation. *Gut* 2002; 50 (Suppl. III): iii37–iii42.
- [33] *Neurath M., Fuss I., Strober W.*: TNBS-Colitis. *Intern Res Immunol* 2000; 19: 51–62.
- [34] *Florian S.*: Immunhistochemische Charakterisierung pathologischer Veränderungen bei der sporadischen und hereditären kolorektalen Karzinogenese und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen; Präventionsstrategien mit resistenter Stärke Typ III – experimentelle Studien am TNBS- und DMH-Modell. Dissertation, Charité-Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin der Freien und Humboldt-Universität zu Berlin, 2003.
- [35] *Jacobasch G., Schmiedl D., Kruschewski M., Schmehl K.*: Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel disease. *Int J Colorect Dis* 1999; 14: 201–211.
- [36] *Garcia-Lafuente A.* et al.: Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Gastrointest Liver Physiol* 1997; 272: G10–G14.
- [37] *Dongowski G., Jacobasch G., Schmiedl D.*: Structural stability and prebiotic properties of resistant starch type 3 increase bile acid turnover and lower secondary bile acid formation. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 9257–9267.
- [38] *Daly K., Shirazi-Beechey S.P.*: Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 2006; 25: 49–62.
- [39] *Marks P.* et al.: Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 194–202.
- [40] *Cuff M.A., Lambert D.W., Shirazi-Beechey S.P.*: Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *J Physiol* 2002; 539: 361–371.
- [41] *Borthakur A.* et al.: Regulation of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) promoter by butyrate in human intestinal epithelial cells: Involvement of NF- κ B pathway. *J Cell Biochem* 2008; 103: 1452–1463.
- [42] *Hu S.* et al.: Translational inhibition of colonic epithelial heat shock proteins by INF- γ and TNF- α in intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007; 133: 1893–1904.

- [43] *Scharl M. et al.*: Protein tyrosine phosphatase N2 regulates TNF α -induced signalling and cytokine secretion in human intestinal epithelial cells. *Gut* 2011; 60: 189–197.
- [44] *Thibault R. et al.*: Butyrate utilization by the colonic mucosa in inflammatory bowel diseases: a transport deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 684–695.
- [45] *Roediger W.E.*: The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 1980; 2: 712–715.
- [46] *Thibault R. et al.*: Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2007; 133: 1916–1927.
- [47] *Simpson E.J. et al.*: *In vivo* measurement of colonic butyrate metabolism in patients with quiescent ulcerative colitis. *Gut* 2000; 46: 73–77.
- [48] *Cuff M.A., Shirazi-Beechey S.P.*: The human monocarboxylate transporter, MCT1: genomic organization and promoter analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 1048–1056.
- [49] *Papantonis A. et al.*: TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *EMBO J* 2012; 31: 4404–4414.
- [50] *Hehlhans T., Männel D.N.*: The TNF-TNF receptor system. *Biol Chem* 2002; 383: 1581–1585.
- [51] *Ma X., Becker Buscaglia L.E., Barker J.R., Li Y.*: MicroRNAs in NF- κ B signaling. *J Med Cell Bio* 2011; 3: 159–166.
- [52] *Contreras J., Rao D.S.*: MicroRNAs in inflammation and immune responses. *Leukemia* 2012; 26: 404–413.
- [53] *Camuesco D. et al.*: The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 908–918.
- [54] *Boesch-Saadatmandi C. et al.*: Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155. *J Nutr Biochem* 2011; 22: 293–299.
- [55] *Wu F. et al.*: MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology* 2008; 135: 1824–1835.
- [56] *Ruiz P.A., Braune A., Hölzlwimmer G., Quintanilla-Fend L., Haller D.*: Quercetin inhibits TNF-induced NF- κ B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal endothelial cells. *J Nutr* 2007; 137: 1208–1215.
- [57] *Nakamura M., Omura S.*: Quercetin regulates the inhibitory effect of monoclonal non-specific suppressor factor β on tumor necrosis factor- α production in LPS-stimulated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72: 1915–1920.
- [58] *Cho S.-Y. et al.*: Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinase and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem* 2003; 243: 153–160.

Adresse der Autoren

Prof. Dr. Gisela Jacobasch, Holger Pforte,
Dr. Gerhard Dongowski
Deutsches Institut für Ernährungsforschung
Potsdam-Rehbrücke
Arthur-Scheunert-Alle 114–116, 14558 Nuthetal*

*Prof. Dr. Hermann-Georg Holzhütter
Universitätsmedizin Berlin (Charité)
Institut für Biochemie, Abteilung Mathematische
Systembiochemie
Charitéplatz 1, 10117 Berlin*

*Dr. Martin Kruschewski
Abt. für Allgemein-, Thorax- und Gefäßchirurgie,
Universitätsklinikum Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30, 12200 Berlin*

**korrespondierende Autorin
G.K.Jacobasch@t-online.de*

*Eingelangt am: 14.5.2013
Akzeptiert am: 11.8.2013*