

Lehrstuhl für Physiologie  
Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Technische Universität München

**Effekte von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Apfel- und Rotweintrester auf  
das Verdauungs- und Immunsystem bei Nutztieren**

Julia Maria Sehm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Agrarwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. Dieter R. Treutter
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. Heinrich H.D. Meyer 2. Univ.-Prof. Dr. Jürgen Polster

Die Dissertation wurde am 31.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.11.2006 angenommen.

**Vorwort**

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. H.H.D. Meyer für die Überlassung des Themas und die sehr guten Arbeitsbedingungen bedanken.

Dr. habil. M.W. Pfaffl danke ich für seinen fachlichen Ratschlag und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an die „Freunde und Förderer der Physiologie“ und das „Bayerische Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten“ für die Finanzierung dieses Projektes.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Dr. Lindermayer, Prof. Polster und Prof. Treutter für die sehr gute Zusammenarbeit.

Inge Celler, Tamara Dicker, Anja Härter, Marlene Kramler, Doreen Tetzlaff und Angela Sachsenhauser sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie sei Dank für ihre Unterstützung und die Vermittlung ihres methodischen Wissens.

Mein besonderer Dank gehört all den fleißigen Helfern des Schlachthofes Grub und des Lehrstuhl für Physiologie, die mich an den Schlachttagen tatkräftig unterstützt haben.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank den Studenten Katrin Beerbaum, Christian Biegel, Claudia Dummer und Katharina Werkstätter, die als Praktikanten oder im Rahmen von Semester- bzw. Bachelorarbeiten mitgeholfen haben.

Für das angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes, vor allem bei der „Denkerzentrale“, recht herzlich.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meinem Mann Thorsten und unserer Tochter Johanna, für die Unterstützung und die Geduld, ohne die ich diese Arbeit nie zu Ende gebracht hätte.

**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungen	VI
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. ABSTRACT	2
3. EINFÜHRUNG	3
3.1 Funktionelle Histologie des Darmes am Beispiel des Schweins	3
3.2 Darmimmunologie	5
3.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe - Flavonoide	6
3.4 Apfeltrester	8
3.5 Weintrester	9
4. FRAGESTELLUNG	10
5. MATERIAL UND METHODEN	11
5.1 Vorversuch	11
5.1.1 Zellkultur	11
5.1.2 Behandlung 1: Verschiedene Konzentrationen	11
5.1.3 Behandlung 2: Verschiedene Behandlungsabläufe	11
5.1.4 RNA Extraktion aus Zellkultur	11
5.1.5 Two-step RT-PCR	12
5.1.6 Statistik	12
5.2 Fütterungsversuch	12
5.2.1 Tiere	12
5.2.2 Futtermittel	13
5.2.3 Probengewinnung	13
5.2.4 Polyphenoluntersuchung in Futtermitteln, Darminhalten und Geweben	14
5.2.5 Kotuntersuchungen	14
5.2.6 Untersuchung des Blutes	14
5.2.7 Histologische Untersuchungen	14
5.2.8 RNA Extraktion aus Gewebe	15
5.2.9 One-step RT-PCR	15
5.2.10 Statistik	16
6. ERGEBNISSE	17
6.1 Zellkultur	17
6.1.1 Expressionsanalyse: Verschiedene Konzentrationen	17
6.1.2 Expressionsanalyse: Verschiedene Behandlungsabläufe	18

6.2	Fütterungsversuch	19
6.2.1	Allgemeine Wachstumsdaten	19
6.2.2	Polyphenole in Futter und Darminhalten	19
6.2.3	Bakterienzusammensetzung im Kot	20
6.2.4	Blutbild	20
6.2.5	Morphologie in Jejunum, Ileum und Colon	21
6.2.6	Expressionsanalysen	22
6.2.6.1	Blut	22
6.2.6.2	Gastrointestinaltrakt	23
6.2.6.3	Organe	23
7.	DISKUSSION	26
7.1.	Methodische Diskussion	26
7.1.1	Zellkultur	26
7.1.2	Histologie	27
7.1.3	Hochdurchsatz PCR	28
7.2.	Physiologische Diskussion	30
7.2.1	Zellkultur	30
7.2.2	Fütterungsversuch	31
8.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	37
9.	LITERATUR	39
	ANHANG	55
	Lebenslauf	55
	Betreute Arbeiten	56
	Publikationen	57

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AT	Ferkel, die mit 3,5% TS Apfeltrester in der Ration gefüttert worden sind
cDNA	komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
CP	crossing point
CT	threshold cycle
DMAZA	Dimethylaminozimtaldehyd
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetraessigsäure
EGCG	(-)-Epigallocatechin gallat
FKS	Fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
GKZ	Gesamtkeimzahl
HbE	Hämoglobingehalt pro Erythrozyt
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (insulin like growth factor)
IL	Interleukin
KBE	Koloniebildende Einheit
MCV	Volumen-Inhalt des Einzel-Erythrozyten (mean corpuscular volume)
NF $\kappa$ B	Nukleärer Faktor kappa B
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PP	Peyersche Platten
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RWT	Ferkel, die mit 3,5% TS Rotweintrester in TS gefüttert worden sind
RT	Reverse Transkription
SR	Ferkel, die mit der Standard-/Kontrollration gefüttert worden sind
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TS	Trockensubstanz
WBZ	Weißer Blutzellen

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Der Forschungsschwerpunkt dieser Doktorarbeit war die immun-modulatorische Wirkung von polyphenolreichen Treestern auf die Physiologie von wachsenden Ferkeln in der Zeit des Absetzens. Ein besonderer Aspekt war die Verwendung natürlicher Reststoffe aus der Getränkeherstellung, dem Apfel- und dem Rotweintrester.

In einem *in vitro* Vorversuch wurden primäre weiße Blutzellen mit den Polyphenolen Catechin und EGCG stimuliert. Zusammenfassend konnte man positive Effekte durch die Flavanoid-Behandlung sowohl auf die immunrelevanten Zytokine als auch auf die Expression der Transkriptionsfaktoren feststellen. Höhere Flavanoidgaben zeigten ausgeprägtere Einflüsse als geringere, wobei EGCG die mRNA Genexpression stärker veränderte als Catechin.

Im Fütterungsversuch wurden 78 Ferkel mit 3,5% TS Apfel- oder Rotweintrester bzw. einer Standardration gefüttert. Als Beobachtungszeitraum wurden die Tage um den Absetztermin gewählt, da dann die meisten immunrelevanten Veränderungen in der Umwelt und beim Futterwechsel stattfinden und die meisten Ferkelverluste zu verzeichnen sind.

Spuren der wichtigsten Polyphenolvertreter waren in den tierischen Organen und Geweben nachweisbar. Die beiden polyphenolreichen Fütterungen zeigten einen positiven Einfluss auf die Bakterienpopulationen im Colon. Die Anzahl der *E. coli* Bakterien wurde weniger, während sich die Anzahl der gesundheitsfördernden *Laktobazillen* erhöhte. Die Ergebnisse des Blutbildes zeigten, dass die Leukozytenzahl in der Kontrollgruppe anstieg, was auf eine Aktivierung des Immunsystems hinweist; in den Behandlungsgruppen zeigten sich keine Veränderungen.

In den darmmorphometrischen Studien via Histologie ergaben sich unterschiedliche Effekte der polyphenolreichen Fütterungen in Jejunum, Ileum und Colon. Die Lymphfollikelflächen der Peyerschen Platten im Ileum nahmen nur in der Kontrollgruppe zu, was wie im Falle des Blutbildes für eine Aktivierung des Lymphsystems in der nicht behandelten Kontrollgruppe spricht. In den Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass Caspase 3 im Jejunum mit der Zeit abreguliert, im Colon dagegen aufreguliert wurde. Die Veränderungen waren in den Behandlungsgruppen oft signifikant größer als in der Kontrollgruppe.

Die *in vivo* Studie zeigte, dass sich die beiden Tresterfütterungen bei den Ferkeln gesundheitsfördernd auswirkten. Sowohl die Darmflora als auch die Darmzotten wurden von beiden Tresterfütterungen positiv beeinflusst.

## 2. ABSTRACT

The main research focus of this doctoral thesis was the immunomodulatory effect of polyphenol-rich pomaces on the physiology of growing piglets undergoing the stage of weaning. A special aspect was the application of natural residues derived from beverage manufacturing, i.e. apple and red-wine pomace.

In a preliminary experiment conducted *in vitro*, primary white blood cells were stimulated with the polyphenols Catechin and EGCG. In summary, the positive effects of flavonoid treatment were determined on both the immune-relevant cytokines and the expression of transcription factors. Higher flavonoid administrations displayed more distinct effects, whereby EGCG modified mRNA gene expression more than Catechin.

In a feeding experiment, 78 piglets were fed with 3.5 percent dry matter apple or red-wine pomace. The days around the date of weaning were chosen as the period of observation, since most changes of immunological relevance in the environment and due to the change of nutrition take place during this time, which is also characterized by a maximum mortality rate among piglets.

Traces of the main polyphenol species were detectable in the organs and tissues of the animals. The two polyphenol-rich feedings displayed a positive influence on the bacterial populations in the colon. The number of *E. coli* cells reduced, whereas the number of health-supporting *Lactobacilli* increased. The results of the differential blood cell count revealed that the number of leukocytes increased in the control group, indicating an activation of the immune system. No alterations were found in the treatment groups.

Histomorphometric studies of the intestines showed various effects elicited by the polyphenol-rich feed on jejunum, ileum and colon. The surfaces of the lymph follicles of the ileal Peyer's plaques only increased in the control group, which is indicative of an activation of the immune system in the untreated controls, as had been revealed by the differential blood cell count. Expression analyses demonstrated that Caspase 3 activity was reduced in the jejunum, but induced in the colon. The changes in the treatment groups were often significantly greater than in the control group.

The *in vivo* study showed that both pomace feeding regimes produced positive health effects in piglets. Both the gut microflora and the intestinal villi were positively influenced by both pomace feeding regimes.

### 3. EINFÜHRUNG

#### 3.1 Funktionelle Histologie des Darmes am Beispiel des Schweins

Der Intestinaltrakt umfasst ca. 5% des Körpergewichts und ist mit ca. 200 m<sup>2</sup> die größte Oberfläche des Körpers (Roitt et al., 1995; Löffler, 1994). Hier befindet sich auch der größte und komplexeste Anteil des Immunsystems (Roitt et al., 1995). Bei einem ausgewachsenen Schwein besteht der Intestinaltrakt aus durchschnittlich 18 m Dünndarm und 4 m Dickdarm. Der Dünndarm wird in Zwölffingerdarm (Duodenum), Leerdarm (Jejunum) und Hüftdarm (Ileum) unterteilt, der Dickdarm in Blinddarm (Caecum), Grimmdarm (Colon) und Mastdarm (Rectum).

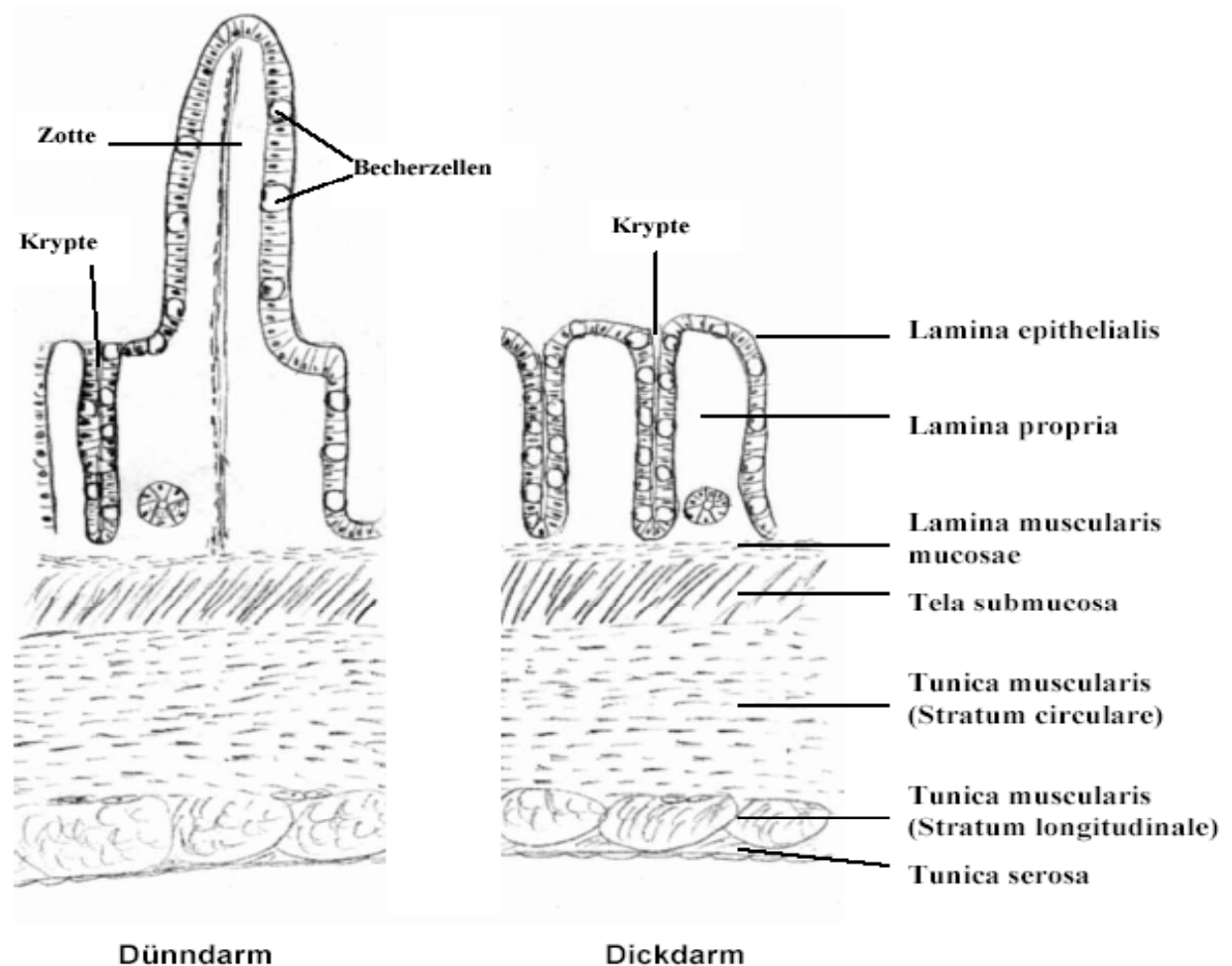


Abb. 1: Schematische Darstellung der Darmwandschichten (nach Görke, 2000)

Der Grundaufbau einer Darmwand ist in allen Segmenten identisch (Abb. 1). Die bedeutende Oberflächenvergrößerung wird in allen Darmsegmenten durch Zotten bzw. Krypten und Mikrovilli erreicht (Görke, 2000; Junqueira et al., 2002). Die Zotten verlieren von kranial nach kaudal langsam an Höhe (Liebich, 1999). Typisch für das



Ileum und das Jejunum sind die Kerckring-Falten. Sie ragen in das Darmlumen hinein und sind nur aus Mukosa und Submukosa aufgebaut (Junqueira et al., 2002).

Eine Besonderheit im Dünndarm stellen die Peyerschen Platten (PP) dar. Im Ileum nimmt die Zahl der Peyerschen Platten, im Vergleich zum Jejunum, zu (Kolb, 1991). Über diesen Peyerschen Platten befinden sich viele M-Zellen und nur wenige Becherzellen und eher kurze, unterschiedlich geformte Darmzotten. Das 70 cm bis 100 cm lange Ileum wird ausgezeichnet durch eine kontinuierliche PP (Görke, 2000). Nach der Geburt werden bei Schweinen keine neuen PP angelegt. Das Größenwachstum der PP wird von Haltungsbedingungen und Erregerexposition beeinflusst. Bei konventionell gehaltenen Ferkeln verdreifacht sich die Länge der jejunalen PP und ilealen PP bis zum 38. Lebensstag, während sich bei keimfrei gehaltenen Ferkeln die Länge der ilealen PP verdoppelt und die Länge der jejunalen PP gleich bleibt. Mikrobielle Antigene sind, wie Nahrungsantigene wichtig für die Entwicklung von aktiven Follikeln in den PP (Van Briel, 2002).

Die Epithelzellen am Grund der Krypten sind undifferenziert und teilen sich ständig mitotisch. Die Tochterzellen wandern bis zur Zottenspitze, differenzieren sich aus und erneuern abgeschilferte Zellen. Beim neugeborenen Schwein beträgt die Lebensdauer einer Deckepithelzelle 10-14 Tage, beim adulten 2-5 Tage (Klein, 2001; Junqueira et al., 2002). Wichtig bei der Zellerneuerung des Darmepithels sind einerseits die Zellproliferation und andererseits die Apoptose. Überflüssige Zellen werden durch diesen programmierten Zelltod zerstört.

Die Apoptose kann über zwei verschiedene Wege eingeleitet werden: Beim mitochondrialen Weg führen pro-apoptotische Proteine der Bax-Familie bei zellulärem Stress zur Aktivierung der Signalkaskade (Löffler und Petrides, 2003; Zimmermann et al., 2001). Der zweite Weg führt über sogenannte Todesrezeptoren wie den FAS-Rezeptor oder den TNF-Rezeptor (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor). Zytokine wie TNF oder Interferon- $\gamma$  bewirken eine verstärkte Rezeptorexpression (Zimmermann et al., 2001). Am Ende der intrazellulären Signalkaskaden steht die Caspase 3 als Schlüsselenzym der Apoptose. Sie aktiviert weitere Caspasen und DNAsen, die für die Fragmentierung der DNA verantwortlich sind (Enari et al., 1998; Lui et al., 1997).

Zur Apoptose können auch verschiedenste Umwelteinflüsse wie UV-Strahlen oder oxidativer Stress führen (Löffler und Petrides, 2003; Hug, 2000). Polyphenole z. B. spielen eine Rolle bei der Aktivierung der Apoptosekaskade in Krebszellen (Dong, 2000; Lin et al., 1999; Yang et al., 2002).

In den Darm gelangen nicht nur Nährstoffe, sondern auch verschiedenste Pathogene, deshalb befindet sich hier das größte Immunsystem des Körpers.

### 3.2 Darmimmunologie

Das darm-assoziierte Immunsystem gehört zum mukosa-assoziierten Immunsystem. Es stellt das System mit der größten Oberfläche dar und repräsentiert mit 80% den Hauptanteil des Gesamtimmunsystems (Krüger, 2005). Folgende Abwehrzellen arbeiten im Immunsystem des Darmes:

- Lymphfollikel der Peyerschen Platten (PP) mit B-Zellen und T-Zellen
- Kleine Lymphfollikel und Lymphozyten-Ansammlungen
- Intraepitheliale Lymphozyten
- Dendritische Zellen
- T-Zellen der Lamina propria: CD4, CD8,  $\gamma/\delta$
- Plasmazellen der Lamina propria
- Makrophagen
- Mastzellen (Van Briel, 2002)

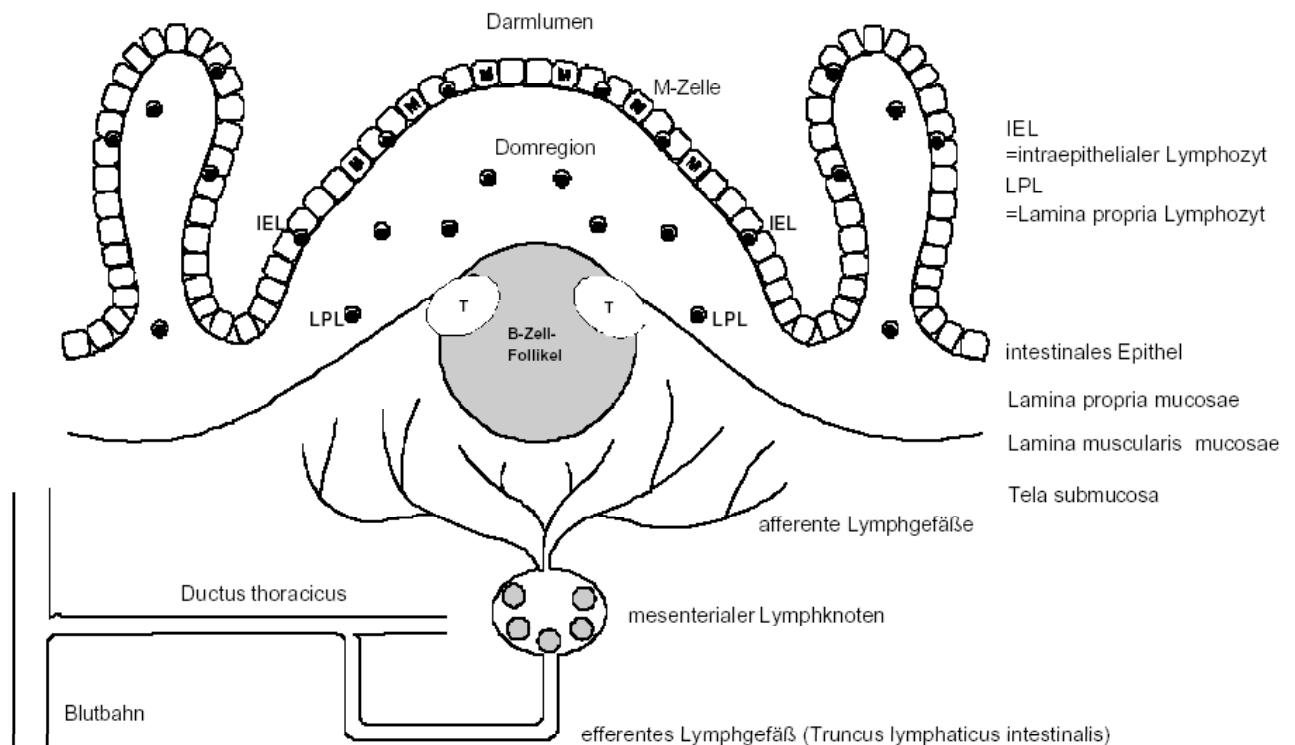


Abb. 2: Aufbau und Bestandteile des Darmimmunsystems (nach Hoffmann-Moujhadida, 2002)

Im Darmimmunsystem findet die Präsentation der Antigene, welche von den M-Zellen aufgenommen wurden, in der Domregion der Peyerschen Platten statt (Abb. 2). Diese führt zur Aktivierung und Proliferation von B- und T-Zellen in den Peyerschen Platten (Duchmann et al., 1999; Hoffmann-Moujahid, 2002; Mowat, 2003). Die antigenaktivierten T- und B-Zellen verlassen die Peyerschen Platten über afferente Lymphgefäße und gelangen dann in mesenteriale Lymphknoten (Roitt et al., 1995).

Zytokine sind regulatorisch wirkende, hormonähnliche Signalstoffe des Organismus, die die Aktivitäten des humoralen und zellulären Immunsystems steuern. Zytokine werden auch von intestinalen Epithelzellen gebildet (Ruemmele et al., 2002). Die verschiedenen Zytokine, die von einer bestimmten Zelle sezerniert werden, erzeugen über ein Zytokinnetzwerk vielfältige Wirkungen. Bestimmte Zytokine, wie TGF $\beta$ , Interleukin (IL) 1 $\alpha$  und IL-6 werden im intestinalen Epithelium ständig exprimiert und spielen eine Rolle für den basalen Influx der Immunzellen in die Mukosa, für das Wachstum der Epithelzellen und für die Homöostase (Stadnyk, 1994). Zytokine beeinflussen auch die Entwicklung und Reifung von Immunzellen und spielen eine entscheidende Rolle bei der Auslösung, Regulation und Beendigung einer Immunantwort (Janeway und Travers, 1997). TNF $\alpha$  z. B. wird von vielen Zelltypen als Reaktion auf eine Entzündung, Infektion oder Verletzung produziert, darunter auch Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten (Baud und Karin, 2001).

Neben einer effektiven Abwehr von Pathogenen muss das Darmimmunsystem zuverlässig harmlose Nahrungsantigene und Bakterien als solche erkennen und tolerieren, um überflüssige und schädliche Abwehrreaktionen zu vermeiden. Dies wird als orale Toleranz bezeichnet (Duchmann et al., 1999; Hoffmann-Moujahid, 2002). Es gibt neben den klassischen Nährstoffen auch Stoffe, die positive Einflüsse auf das Darmsystem oder den ganzen Organismus besitzen, ohne einen Nährwert im engeren Sinne zu haben. Dazu zählen Futterzusatzstoffe, wie Antibiotika, Probiotika, Prebiotika, Säuren oder auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.

### **3.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe - Flavonoide**

Man schätzt, dass es etwa 10.000 verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe im Pflanzenreich gibt, davon sind über 4.000 bereits identifiziert (Middleton et al., 2000). Zu ihnen zählen z. B. Carotinoide, Phytosterine, Polyphenole, Saponine, Terpene, Phytinsäure, Sulfide und Protease-Inhibitoren. Polyphenole werden in Phenolsäuren und Flavonoide unterschieden.

In den Pflanzen wirken Polyphenole antimikrobiell – als Schutz vor Insekten und gegen Wundstress (Feucht und Treutter, 1989). Viele Blütenfarben basieren auf Phenolbasis und sichern so das Überleben der Blütenpflanzen (Feucht und Treutter, 1989).

Die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden Polyphenole sind Flavonoide (Böhm et al., 1998). Man findet sie vor allem als Pigmente oder Bitterstoffe in Obst und Gemüse, wie zum Beispiel in blauen Trauben, Grapefruits oder Sojabohnen (Watzl und Leitzmann, 1999).

Strukturell gesehen bestehen alle Flavonoide aus zwei aromatischen und einem O-heterozyklischen Ring. Derzeit sind etwa 6.500 verschiedene Strukturen bekannt (Watzl und Rechkemmer, 2001). Anhand der strukturellen Unterschiede lassen sie sich in Gruppen einteilen, z. B. Flavone, Flavonole, Flavanole (Catechine) und Anthocyane (Watzl und Rechkemmer, 2001; Treutter 1989). Abgesehen von den meist als Aglykonen vorliegenden Flavanolen, die auch in oligomerer Form z. B. in Äpfeln und Rotwein gefunden werden, kommen die meisten Flavonoide als Flavonoidglykoside vor (Watzl und Rechkemmer, 2001). Typische Vertreter der Flavanole sind Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epigallocatechingallate (Lambert und Yang, 2003). Das Procyanidin B1 besteht aus je einem Molekül der monomeren Flavanole Catechin und Epicatechin. Das Procyanidin B2 besteht formal aus zwei Epicatechin-Einheiten, das Procyanidin C1 aus drei (Peterek, 2004).

Es wird angenommen, dass Flavonoide in der Nahrung sowohl antioxidative, antimikrobielle als auch antivirale Wirkung entfalten können (Watzl und Leitzmann, 1999; Watzl und Rechkemmer, 2001). Nach epidemiologischen Studien schützt eine polyphenolreiche Ernährung vor kardiovaskulären Krankheiten (Ness und Powles, 1997) und vor verschiedenen Krebsarten (Steinmetz und Potter, 1996). In Tierversuchen sind antikanzerogene Eigenschaften der Flavonoide gegen Dickdarm-, Brust- und Hautkrebs nachgewiesen worden (Watzl und Leitzmann, 1999; Watzl und Rechkemmer, 2001).

Der immun-modulatorische Charakter der Flavonoide äußert sich in einer Immunsuppression (Watzl und Leitzmann, 1999). Meist sorgen Flavonoide für eine Blockade von Enzymsystemen oder von Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, was sich in der Hemmung des Lymphozytenwachstums, der zytotoxischen T-Lymphozyten und der „Natural Killer Cells“ äußert. Die Antigenpräsentation durch Makrophagen, die Interleukin-2-Sekretion und Rezeptor-Expression sowie die Histaminfreisetzung aus Mastzellen werden ebenfalls behindert. Eine Immunantwort in Form von

Entzündungsreaktionen beziehungsweise allergischen Reaktionen könnte durch Flavonoide gehemmt oder abgeschwächt werden (Watzl und Leitzmann, 1999; Watzl und Rechkemmer, 2001).

Nach der Aufnahme von 300 ml Wein ist die PP-Konzentration im Darm mit ungefähr 3 mM sehr hoch. Dadurch können im Colon lokale antioxidative und antikanzerogene Effekte hervorgerufen werden (Watzl und Leitzmann, 1999; Watzl und Rechkemmer, 2001). Die vorhandenen Daten zur Absorption von Polyphenolen sind immer noch gering und oft kontrovers. *In vivo* Studien mit Ratten bzw. Menschen deuten an, dass die biologische Verfügbarkeit von Polyphenolen abhängig vom Experiment und der chemischen Struktur der jeweiligen Mischung der Polyphenole stark variiert (Hollman et al., 1995 und 1997). Es wird davon ausgegangen, dass Polyphenole konzentrationsabhängig aufgenommen werden (Carbonaro und Grant, 2005; Carbonaro et al., 2001). Zahlreiche pharmakologische Wirkungen der Flavonoide sind bereits nachgewiesen; tatsächlich können nur wenige Flavonoidpräparate eine ausgeprägte Wirksamkeit *in vivo* erzielen. Gründe für diese Diskrepanz sind möglicherweise ein partieller Abbau bzw. eine partielle Umsetzung von Flavonoiden durch die Darmflora (Spencer, 2003), eine unzureichende Resorption und eine rasche Ausscheidung und Metabolisierung nach erfolgter Resorption (Böhm et al., 1998).

In der Natur liegen Polyphenole in Verbindung mit anderen Nährstoffen vor, was sich wiederum auf die Aufnahme auswirkt (Böhm et al., 1998). Nicht nur Obst und Gemüse sind reich an Polyphenolen, sondern auch deren Trester (Sanchez-Rabaneda et al., 2004; Mazza, 1995).

### 3.4 Apfeltrester

Bei der Gewinnung von Apfelsaft fällt als Reststoff Apfeltrester an. Der durchschnittliche Gehalt an Polyphenolen beträgt 3 g/kg Frischgewicht in Äpfeln, und variiert von 0,5-11 g/kg (Stoll, 1997). Apfeltrester ist reich an sekundären Inhaltsstoffen; zirka 80% der Polyphenole verbleiben mit der Apfelschale im Trester. In Deutschland fallen jährlich ungefähr 250.000 Tonnen Apfeltrester an (FAOSTAT).

Die Apfelschale enthält hauptsächlich Procyanidine, Catechin, Epicatechin, Phoridzin und Quercetinkonjugate als Polyphenole. Dabei sind Quercetinkonjugate ausschließlich in der Apfelschale vorhanden (Escarpa und Gonzalez, 1998). Apfelschalen besitzen zwei- bis sechsmal so viele Phenole und zwei- bis dreimal so viele Flavonoide als das Fruchtfleisch (Wolfe et al., 2003).

Inhaltsstoffe von Äpfeln zeigten in Zellkulturversuchen antiproliferative Eigenschaften (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003; da Silva Porto et al., 2003). Viele epidemiologische Studien beweisen eine Beziehung zwischen dem Konsum von Äpfeln und einem reduzierten Risiko von chronischen Erkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs und Asthma (Woods et al., 2003; Willett, 2002; Ames et al., 1993). *In vitro* Studien und Tierversuche haben gezeigt, dass der Konsum von Äpfeln die Lipidoxidation inhibiert und das Cholesterin reduziert (Boyer und Liu, 2004).

In der Schweinefütterung ist bereits bekannt, dass Apfeltrester die durch das Mykotoxin Deoxynivalenol verursachte Wachstumsreduktion vermindert (Gutzwiller und Stoll, 2005).

### 3.5 Weintrester

Rot- und Weißweintrester fallen bei der Weinerzeugung an. Während weiße Trauben direkt nach der Ernte mit den Stielen gepresst werden, werden bei der Rotweinerstellung die Trauben erst entrappt, d. h. die Beeren werden vom Stiel entfernt und als Maische mit dem Zusatz von Hefe zur Gärung gebracht. Nach drei bis fünf Tagen Gärung wird die Maische abgewirzt (=ausgepresst). Bei beiden Weinsorten bleibt der Trester als Reststoff übrig. Ein Liter Rotwein enthält etwa 2 g Polyphenole (Scalbert und Williamson, 2000). 1999 wurden in Deutschland 10.000.000 Hektoliter Wein angebaut (70% Weißwein, 30% Rotwein). Das bedeutet, dass jährlich ungefähr 2.500.000 Tonnen Trester anfallen (Weinstatistik, 1999). Im Trester verbleiben beim Pressen circa zwei Drittel der Polyphenole (Mazza, 1995).

Wein enthält eine Reihe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie zum Beispiel phenolische Säuren, Stilbene und Flavonoide (Soleas et al., 1997). Im Rotwein sind vor allem Anthocyane enthalten. Die Flavonoide kommen überwiegend in der Traubenhaut und in den Kernen vor, Flavonole und Anthocyane in der Haut, Catechine und Leukoanthocyane in den Kernen. Im Rotwein machen Flavonoide circa 85% der gesamten Phenole aus (Soleas et al., 1997).

#### 4. FRAGESTELLUNG

In der EU sind Antibiotika als Leistungsförderer in der Tierernährung seit 1. Januar 2006 (Verordnung (EG) Nr. 183/2003 Artikel 11 Absatz 2) verboten. Vier verschiedene Wirkungen sind bisher für die positiven Effekte der antibiotischen Leistungsförderer nachgewiesen: Inhibition von subklinischen Infekten, Reduktion von wachstumshemmenden mikrobiellen Metaboliten, Reduktion des Nährstoffverbrauchs durch Bakterien und Erhöhung der Nährstoffaufnahme durch eine dünnere Darmwand (Francois, 1962; Visek, 1978; Anderson et al., 1999).

Um die Darmgesundheit der Tiere zu gewährleisten und um finanzielle Verluste durch geringere tägliche Zunahmen und Totalverluste zu minimieren, werden alternative Futterzusätze, wie Probiotika, Prebiotika, Synbiotika, organische Säuren und deren Salze, Enzyme, Kräuter, Seltene Erden und Pflanzenextrakte wie sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe diskutiert (Bach Knudsen, 2001; Scalbert and Williamson, 2000; Bezkorovainy, 2001; Recht, 2005).

In dieser Studie sollen verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, als Reinsubstanzen und als natürliches Gemisch im Trester auf ihre positive Wirkung auf das Entzündungsgeschehen, die Darmmorphologie, das Darmimmunsystem und die Darmflora von Absetzferkeln getestet werden.

Ziel dieser Dissertation war erstens die Auswirkungen von den Polyphenolen Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) und Catechin auf Entzündungsmarker *in vitro* zu testen. Zweitens sollten polyphenolreicher Apfel- und Rotweintrester *in vivo* auf seine Fähigkeit, die Darmgesundheit und das Entzündungs- und Apoptosegeschehen zu beeinflussen, untersucht werden. Dabei sollten moderne biotechnologische Techniken wie Histologie, HPLC und two-step RT-PCR eingesetzt und eine real-time one-step RT-PCR etabliert werden.

Durch den komplexen Aufbau des Fütterungsversuches waren nicht nur die Einflüsse der polyphenolreichen Fütterungen mit einer Kontrollfütterung eingehend zu vergleichen werden, sondern durch die Tiere in einer definierten Wachstumsphase vor und während des Absetzens zu untersuchen.

## **5. MATERIAL UND METHODEN**

### **5.1 Vorversuch**

Im Vorversuch wurden weiße Blutzellen (WBZ) einer laktierenden Milchkuh in Zellkultur genommen und mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Flavanoiden, Catechin und Epigallocatechingalat (EGCG), behandelt. Zur Simulation eines Immunstimulus behandelte man die WBZ zusätzlich mit Concanavalin A (ConA), einem T-Zell spezifischen Mitogen, in verschiedenen Konzentrationen und Behandlungsabläufen.

#### *5.1.1 Zellkultur*

Das Blut wurde bei der Entnahme mit Ethylendiaminetraessigsäure (EDTA) stabilisiert und auf Eis gelagert. Nach Abtrennung der WBZ wurden diese in Zellmedium aufgenommen und ausgesät (Sehm et al., 2005).

#### *5.1.2 Behandlung 1: Verschiedene Konzentrationen*

Zwei Tage nach dem Aussäen der Zellen fand die Stimulation der WBZ mit verschiedenen Konzentrationen ConA (0; 0,01; 0,1 und 1 µg/ml Medium) statt. Sechs Stunden danach erfolgte die Behandlung mit den verschiedenen Konzentrationen EGCG (95% rein, aus grünem Tee extrahiert, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) oder Catechin (Sigma-Aldrich). Jede Flavanol-Konzentration (0; 0,1; 1; 10; 30 und 100 µM) wurde mit jeder ConA-Konzentration kombiniert und mit jeweils fünf Wiederholungen getestet (Sehm et al., 2005).

#### *5.1.3 Behandlung 2: Verschiedene Behandlungsabläufe*

Im zweiten Zellkulturversuch fand die ConA Stimulation einmal sechs Stunden vor und einmal sechs Stunden nach der Flavanol-Behandlung bzw. gleichzeitig mit dieser statt. Die erste Gabe ConA bzw. EGCG/Catechin erfolgte jeweils nach 24 Stunden. Die Konzentration von ConA betrug 0,1 µg/ml Medium, von EGCG bzw. Catechin 0, 30 und 100 µM.

#### *5.1.4 RNA Extraktion aus Zellkultur*

Die Zellen wurden geerntet und die Gesamt-RNA mit TriFast (peqlap, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert. Die RNA Konzentration wurde spektrometrisch ermittelt und eine RT durchgeführt (Sehm et al., 2005).



### 5.1.5 Two-step RT-PCR

Die relative Quantifizierung der cDNA (respektive mRNA) erfolgte mit dem LightCycler (Roche Diagnostics) für die Gene GAPDH, cFos, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und Histon H3 (Sehm et al., 2005). Die  $\Delta\Delta$ CP (crossing point)-Methode (Schmittgen, 2001; Livak und Schmittgen, 2001) wurde mit GAPDH als Referenzgen durchgeführt. Positive  $\Delta\Delta$ CP Werte entsprechen einer Hochregulierung, negative  $\Delta\Delta$ CP Werte einer Abregulierung der mRNA Genexpression, verglichen mit der Kontrollgruppe.

	FOR	REV	EMBL Zugangsnummer	Produkt- länge	Annealing °C
GAPDH	gc ttc act acc atg gag aag g	tca tgg atg acc ttg gcc ag	U 85042	197 bp	60°C
cFos	act cca ggc gga gac aga	ggg gaa ggc ctc ctc aga	AY 322482	302 bp	59°C
TNF $\alpha$	taa caa gcc ggt agc cca cg	gca agg gct ctt gat ggc aga	AF 011926	256 bp	62°C
IL-1 $\beta$	ttc tct cca gcc aac ctt cat t	atc tgc agc tgg atg ttt cca t	M 37211	198 bp	60°C
IL-6	atg aat ccc gct tca caa gcg c	ccg aat agc tct cag gct gaa ctg	NM 173923	200 bp	60°C
Histon H3	act ggc tac aaa agc cgc tc	act tgc ctc ctg caa agc ac	BT 020962	232 bp	60°C

**Tab. 1:** Primer für bovine Sequenzen, die im Zellkulturversuch verwendet wurden

### 5.1.6 Statistik

Für die Statistik fand das Programm Sigma Stat (SPSS Science, Chicago, USA) Verwendung. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mittels TWO WAY ANOVA (Polyphenol-Konzentration und ConA Konzentration). P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die Werte der EGCG bzw. Catechin-Behandlungsgruppen wurden mit der unbehandelten Kontrollgruppe derselben ConA Konzentration verglichen.

## 5.2 Fütterungsversuch

### 5.2.1 Tiere

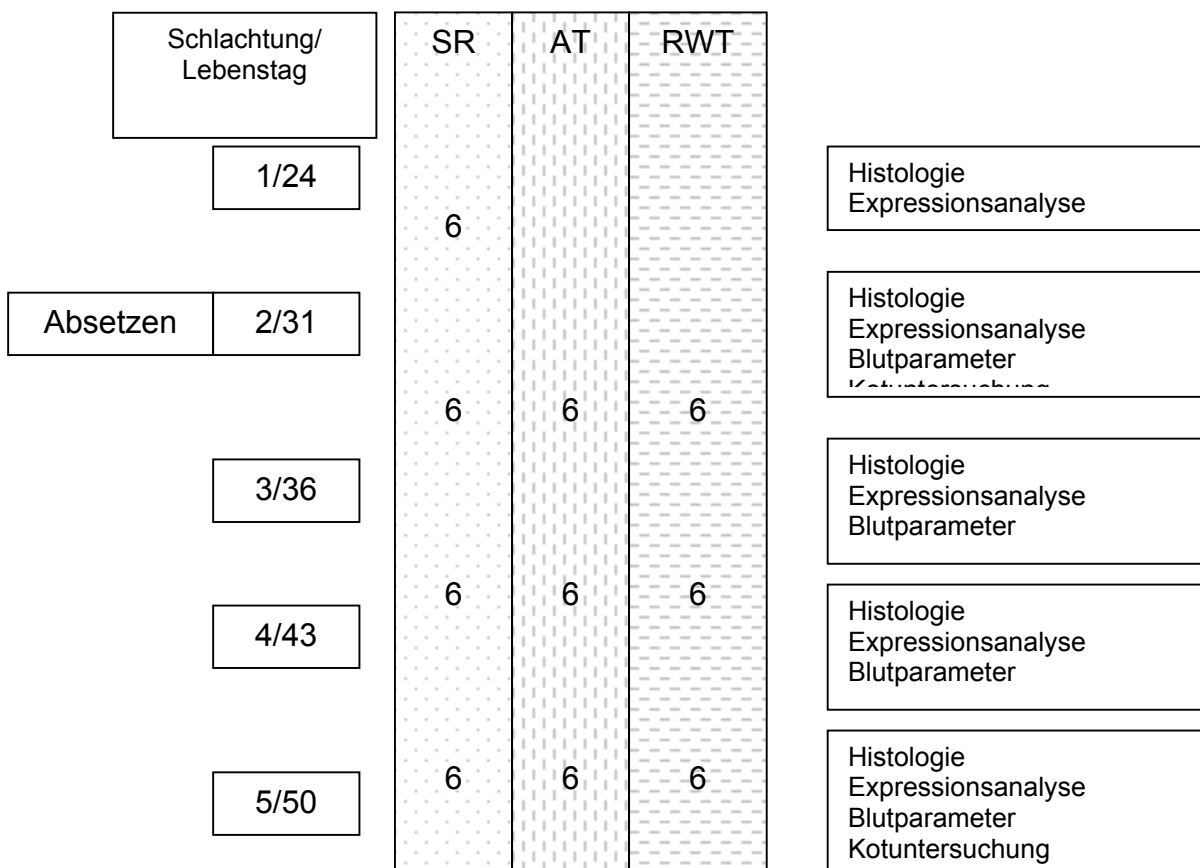
Der Fütterungsversuch umfasste insgesamt 78 Ferkel [Piétrain x (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)]. 30 Kontrolltiere wurden mit einem handelsüblichen Ferkelfutter (SR), je 24 Ferkel mit jeweils 3,5% Trockensubstanz (TS) getrocknetem Apfeltrester (AT) bzw. Rotweintrester (RWT) angereicherter Standardration gefüttert. Die Tiere wogen zu Versuchsbeginn  $7,5 \pm 1,8$  kg und waren durchschnittlich 24 ( $\pm 1,1$  Tage) alt. Eine Gruppe bestand jeweils aus drei weiblichen und drei männlichen, kastrierten Tieren.

**5.2.2 Futtermittel**

Der Apfeltrester wurde von der Fachhochschule Weihenstephan, der Weintrester vom Weingut Armin Loos (Weingut Loos in Dingolshausen) zur Verfügung gestellt. Die Trester wurden aus dem üblichen Verfahren entnommen, auf -20°C gekühlt und anschließend in der Versuchsstation Grub getrocknet. Im Lehrstuhl für Obstbau wurden die verschiedenen Futtermittel auf Polyphenole getestet (s. 4.2.2). Energie, Fett, Protein und Eiweiß waren in den verschiedenen Rationen ausbalanciert (Sehm et al., in press).

**5.2.3 Probengewinnung**

Vor dem Absetzen wurden sechs Kontrollproben, beim Absetzen und an den anderen drei Tagen von jeder Fütterungsgruppe sechs Proben genommen (Abb. 3). Das Gewicht von Lebendgewicht, Schlachtkörper, Leber, Milz und von beiden Nieren wurde ermittelt. Es zwei Blutproben, eine für die RNA-Extraktion und eine für ein großes Blutbild, gewonnen.



**Abb. 3: Probenschema:**

Probennahme an fünf verschiedenen Tagen, beim ersten Termin wurden 6 Kontrolltiere, dann jeweils 6 Kontrolltiere (SR) und jeweils 6 mit Apfel- (AT) bzw. Rotweintrester (RWT) gefütterte Ferkel geschlachtet.

Von Leber, Milz, Niere, mesenterialen Lymphknoten, Magen, Jejunum, Ileum, Colon und Muskel entnahm man circa 0,5 cm<sup>3</sup> große Gewebeproben für die RNA-Extraktion und froor sie sofort in flüssigem Stickstoff ein. Von Jejunum, Ileum, Colon und mesenterialen Lymphknoten wurden zusätzlich Gewebeproben in 3,7%iger Formaldehydlösung für die histologischen Untersuchungen fixiert. Bei der 2. und bei der 5. Schlachtung wurden Inhaltsproben aus dem Colon genommen. Von den 18 ältesten Tieren wurden sowohl Inhaltsproben von Magen und Colon, als auch Gewebeproben von Ileum, Leber und Niere für eine Polyphenolanalyse eingefroren.

### 5.2.4 Polyphenoluntersuchung in Futtermitteln, Darminhalten und Geweben

In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Obstbau (Prof. Treutter) fanden die Untersuchungen von Futtermitteln, Darminhaltsproben und Gewebeproben auf Polyphenole statt.

Die Phenole wurden mit Ethanol bzw. mit Säure extrahiert (Sehm et al. in Vorbereitung). Die Trennung und quantitative Bestimmung der phenolischen Inhaltsstoffe der Proben erfolgten durch eine Kombination aus einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion (bei 280nm) und einer Nachsäulenderivatisierung (Treutter, 1989). Mit der Zumischung von DMAZA entstehen vorübergehend selektive Bindungen des Reagenz an Flavanole. Diese Derivatisierungsprodukte können bei einer Wellenlänge von 640nm sensitiv detektiert werden (Treutter, 1989).

### 5.2.5 Kotuntersuchungen

Die Kotproben wurden beim Tiergesundheitsdienst Bayern in Grub auf die Gesamtzahl der aeroben und anaeroben Bakterien, *Streptococci*, *Lactobacilli*, *E. coli* und *C. perfringens* nach der Methode von Bollmann getestet (Bollmann, 2002).

### 5.2.6 Untersuchung des Blutes

Das große Blutbild wurde in einem tierärztlichen Labor erstellt (vetmed Labor, Ludwigsburg, Deutschland). Dabei wurden Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten bestimmt. Leukozyten wurden in Lymphozyten, Monozyten, segmentkernige, stabkernige, basophile und eosinophile Granulozyten unterschieden.

### 5.2.7 Histologische Untersuchungen

In den drei Darmabschnitten Jejunum, Ileum und Colon sind HE-Übersichtsfärbungen durchgeführt worden (Sehm et al., in press). In Jejunum und Ileum wurden je drei

Zottendicken, Kryptentiefen und Zottenlängen, im Colon Zottendicken und Kryptentiefen aller 78 Tiere vermessen. Daraus wurde eine idealisierte Zottenfläche errechnet. Die Ermittlung der Flächen der PP, ebenfalls als Mittelwert aus drei Werten, erfolgte per Hand. Außerdem wurden zehn Epithelzellen im jejunalem Zottenrand vermessen (Sehm et al., in press).

### 5.2.8 RNA Extraktion aus Gewebe

Jeweils 50mg Gewebe wurden auf 500 µl TriFast (PeqLab) eingewogen und mit Hilfe vom UltraTurrax (IKA, Staufen, Germany) zerkleinert. Danach verlief die Extraktion der Gesamt-RNA und die Messung der RNA-Menge und Qualität analog zur Zellkultur (Sehm et al., 2005).

### 5.2.9 One-step RT-PCR

Im Gegensatz zu der Zellkultur wurde die Expressionsanalyse im Tierversuch im one-step-Verfahren durchgeführt. Um im Hochdurchsatz arbeiten zu können, wurde der ep realplex Cycler (Eppendorf, Hamburg) mit 96-well-Format verwendet. Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgte für Histon, NFκB, TNFα, IL-10, IGF-1, Cyclin D1 und Caspase 3 (Sehm et al., accepted).

	For	Rev	EMBL Zugangsnummer	Produkt- länge	Annealing °C
Histon	act cgc tac aaa agc cgc tc	act tgc ctc ctg caa agc ac	NM 213930	232	60
NFκB	ggt gga gaa ctt tga gcc tc	cca gag acc tca tag ttg tcc	NM 003998	230	58
TNFα	ccc cca gaa gga aga gtt tc	ttg gcc cct gaa gag gac	X 57321	246	60
IL-10	act tta agg gtt acc tgg gtt g	gta gac acc cct ctc ttg ga	NM 214041	349	60
IGF-1	cgc atc tct tct atc tgg cc	ctg agc ctt ggg cat gtc	X 15726	311	60
Cyclin D1	tcc tgt gct gcg aag tgg a	ggt cca ggt agt tca tgg c	BC 014078	246	60
Caspase 3	tgt gtg ctt cta agc cat gg	agt tct gtg cct cgg cag	NM 214131	160	60

**Tab. 2:** Primersequenzen (sus), die im Fütterungsversuch verwendet wurden

Die Crossing Points (CP) wurden mit der CT(threshold cycle)-Methode (Eppendorf Software) ermittelt. Der CT Wert ist die Zyklenzahl, an der das Signal das zehnfache des Grundrauschens erreicht. Die anschließende Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse erlaubte das Überprüfen der Produkte. Die relative Quantifizierung erfolgte mit Histon als Referenzgen. Die CP der Zielgenexpression wurde mittels ΔΔ-CP-Methode (Schmittgen, 2001; Livak und Schmittgen 2001) mit der Histon Expression standardisiert.

### *5.2.10 Statistik*

Für die statistischen Berechnungen wurde Sigma Stat 2.03 (SPSS Science, Chicago, USA) verwendet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mittels TWO WAY ANOVA (Zeitpunkt und Fütterung). Die Apfeltrester- und die Rotweintrestergruppe wurde mit der Kontrollgruppe zum jeweiligen Zeitpunkt verglichen (P Werte unter 0,05 signifikant). Zusätzlich wurden lineare Regressionen über die Zeit von den drei Fütterungsgruppen berechnet.

## 6. ERGEBNISSE

### 6.1 Zellkultur

Alle getesteten Gene zeigten einen Scheitelpunkt in der Schmelzkurvenanalyse (LightCycler Software 3.5; Roche Diagnostics, Mannheim) und eine Einzelbande in einer hochauflösenden 4%igen Agarose-Gelelektrophorese. Weder ConA-Stimulation noch Catechin- bzw. EGCG-Behandlung beeinflusste die mRNA Expression des Referenz-Gens GAPDH (Sehm et al., 2005).

#### 6.1.1 Expressionsanalyse: Verschiedene Konzentrationen

Im ersten Zellkulturansatz, in dem zuerst mit ConA und dann mit EGCG bzw. Catechin stimuliert wurde, reduzierte sich die Gesamt-RNA-Menge jedes Zellkulturansatzes durch die Polyphenolgabe. Bei Catechin ( $p < 0,005$ ) war die Reduktion durchgehend, bei EGCG ( $p < 0,001$ ) wurde bei niedrigeren Konzentrationen bis zu 1  $\mu\text{M}$  eine Induktion der Gesamt-RNA-Konzentration festgestellt (Sehm et al., 2005).

Catechin verursachte eine Aufregulierung der  $\text{TNF}\alpha$  mRNA Expression ( $p < 0,05$ ), besonders bei geringen ConA Konzentrationen. EGCG erhöhte  $\text{TNF}\alpha$  mRNA Expression nur in Konzentrationen bis zu 1  $\mu\text{M}$ . Hohe ConA Gaben überlagerten die Effekte von EGCG und Catechin.

Die Behandlung mit den beiden Flavonoiden beeinflusste die IL-6 und IL-1 $\beta$  Expressionshöhen nicht. ConA hatte nur wenig Effekt auf die Induktion oder Repression der Genexpression von IL-6 und IL-1 $\beta$  in der untersuchten bovinen Zellkultur.

Die RNA-Synthese von Histon H3 war über die Konzentrationen hinweg gleichmäßig, unabhängig von Flavanol und ConA Stimulation, wie man es von einem Referenz-Gen erwartet (Sehm et al., 2005). Lediglich bei einer Flavanolgabe von 10-30  $\mu\text{M}$  ohne Stimulation mit ConA waren die Histon mRNA Expressionslevels erhöht (Tabelle 3).

PP in $\mu\text{M}$	Catechin	EGCG
0	0,00 $\pm$ 0,96	0,07 $\pm$ 0,65
0,1	1,21 $\pm$ 0,26	0,09 $\pm$ 0,68
1	0,60 $\pm$ 0,83	-0,68 $\pm$ 0,23
10	2,43 $\pm$ 0,27 ***	1,77 $\pm$ 0,91 **
30	1,50 $\pm$ 0,74 *	1,92 $\pm$ 0,56 **
100	0,77 $\pm$ 0,26	-0,09 $\pm$ 0,31

Tab. 3:  $\Delta\Delta\text{CP}$  der Histon Expression der WBZ, die mit Catechin bzw. EGCG stimuliert, aber ohne ConA inkubiert wurden

p-Werte \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

6.1.2 Expressionsanalyse: Verschiedene Behandlungsabläufe

Beide Flavanoidstimulationen hatten Einfluss auf die verschiedenen RNA Synthesen; Catechin hatte weniger Einfluss als EGCG (Tabelle 4). Die verschiedenen Behandlungsreihenfolgen hatten unterschiedliche Effekte auf die RNA Expressionen.

Erfolgte der ConA Stimulus nach der Flavonoid-Behandlung, regulierte diese Kombination mit EGCG die mRNA Expression von cFos und TNF $\alpha$  ab. Catechin hatte einen abregulierenden Effekt auf die mRNA Expression von cFos, TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ .

Die gleichzeitige Behandlung bewirkte eine Abregulation der TNF $\alpha$  Expression mit EGCG und eine Aufregulation der cFos Expression mit Catechin.

Erfolgte zuerst die ConA und dann die Flavonoidgabe, wurde cFos in der EGCG-Gruppe hochsignifikant abreguliert und Histon H3 hochsignifikant aufreguliert. Bei der Catechin-Behandlung fand eine starke Aufregulierung von TNF $\alpha$ , IL-6 und Histon H3 statt.

Effekt von Flavanol	ConA Behandlung vor EGCG Stimulation	Gleichzeitige Behandlung	ConA Behandlung nach EGCG Stimulation	ConA Behandlung vor Catechin Stimulation	Gleichzeitige Behandlung	ConA Behandlung nach Catechin Stimulation
cFos	↓↓↓		↓↓		↑↑↑	↓↓↓
TNF $\alpha$		↓↓	↓	↑↑↑		↓
IL-6	↓			↑↑↑		↓
IL-1 $\beta$						↓↓↓

**Tab. 4: Einfluss von EGCG und Catechin auf die mRNA Expression in verschiedenen Kombinationen mit ConA Stimulierung**

Die WBZ wurden mit ConA (0,1  $\mu$ g/ml Medium) und verschiedenen EGCG bzw. Catechin Konzentrationen (30; 100  $\mu$ M) stimuliert. Es wurde eine TWO WAY ANOVA durchgeführt und die flavanoid-behandelten Gruppen mit der Kontrollgruppe ohne EGCG/Catechin verglichen

↑ Aufregulierung

↓ Abregulierung

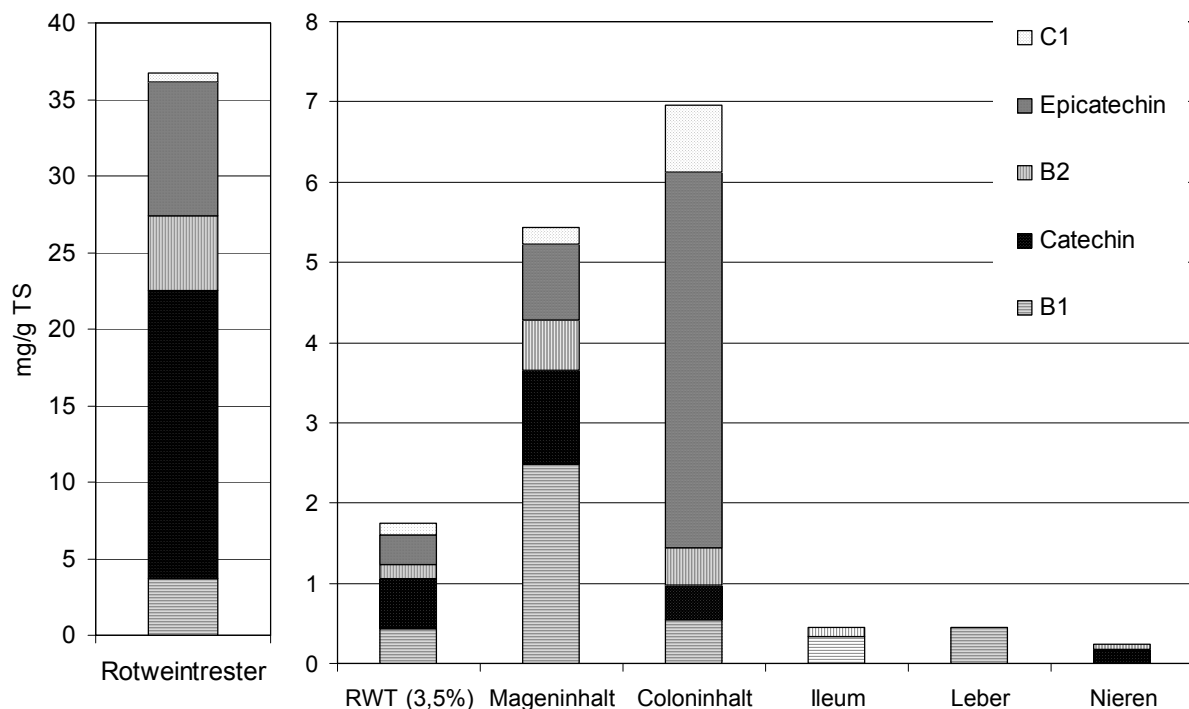
↓ = p<0,05, ↓↓ = p <0,01, ↓↓↓ = p < 0,001;

## 6.2 Fütterungsversuch

### 6.2.1 Allgemeine Wachstumsdaten

Alle Tiere waren während des Versuchs gesund, manche Tiere schieden einen weichen Kot aus. Keines der Tiere musste während der Versuchszeit medizinisch behandelt werden. Zwischen den verschiedenen Behandlungen zeigten sich weder Unterschiede bei der Aufnahme von Futter und Energie noch bei den täglichen Zunahmen. Die täglichen Futtermengen beliefen sich in der ersten Woche nach dem Absetzen auf 0,13 kg/Tag, auf 0,31 kg/Tag in der zweiten und auf 0,55 kg/Tag in der dritten Woche. An den verschiedenen Schlachterminen hatten die Tiere ein durchschnittliches Gewicht von  $8,6 \pm 0,7$  kg, dann  $7,5 \pm 1,1$  kg,  $8,7 \pm 1,0$  kg,  $10,8 \pm 1,4$  kg und  $13,15 \pm 1,6$  kg. Die Lebend- und Schlachtgewichte nahmen mit dem Lebensalter zu; zwischen den Fütterungsgruppen zeigten sich jedoch keine Unterschiede.

### 6.2.2 Polyphenole in Futter und Darminhalten



**Abb. 4: Polyphenolgehalte**

Der Gehalt von 5 phenolischen Leitsubstanzen im Rotweintrester, in der gemischten Rotweintresteration, in Magen- und Coloninhalt, in Geweben von Ileum, Leber und Niere in mg/g TS, Epicatechin und Catechin sind Monomere, C1, B2 und B1 Polymere



Fünf Flavanole wurden als Leitsubstanzen ausgewertet (Abb. 4). Catechin und Epicatechin sind Monomere. Das Procyanidin B1 besteht aus je einem Molekül der monomeren Flavanole. Das Procyanidin B2 besteht formal aus zwei Epicatechin-Einheiten, das Procyanidin C1 aus drei (Peterek, 2004).

Die Polyphenolanalysen ergaben, dass sich C1, B2 und Epicatechin in der Trockenmasse relativ zu dem Futter anreichern (Abb. 4). Die verschiedenen Gewebe enthielten Spuren der einzelnen Polyphenole (Sehm et al., in Vorbereitung).

### 6.2.3 Bakterienzusammensetzung im Kot

Die RWT wiesen einen weicheren Kot auf als die beiden anderen Fütterungsgruppen. Die aerobe Gesamtkeimzahl nahm während des Versuches über alle Fütterungsgruppen hinweg zu, die Anzahl der anaeroben Keime wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten auf. Die Anzahl der *Streptococci* / *Enterococci* nahm sowohl in der SR, als auch in der RWT zu, während sie sich bei der AT nicht veränderte. In der zweiten Messung wiesen die AT und die RWT einen signifikanten Anstieg der Anzahl der *Laktobazillen* zur ersten Messung auf (Sehm et al., in Vorbereitung).

### 6.2.4 Blutbild

Der Verlauf der verschiedenen getesteten Blutparameter ist in Tabelle 5 dargestellt. Stabkernige ( $0\pm 0$ ), basophile ( $0,32\pm 0,78$ ) and eosinophile Granulozyten ( $0,48\pm 1,05$ ) kamen in so geringer Anzahl vor, dass sie nicht statistisch ausgewertet wurden. Die Zahl der Leukozyten stieg in der SR über die Zeit an. Hämoglobingehalt und Hämatokrit fielen über die Zeit ab. Beide Parameter veränderten sich in den Tresterfütterungen stärker als in der SR. Die Anzahl der Thrombozyten veränderte sich nur in der RWT, dort nahm sie hoch signifikant zu (Sehm et al., in Vorbereitung).

		Verlauf der Regulation über 21 Tage		p	Pearson Korrelation Koeffizient
Erythrozyten	SR	Erythrozyten - SR	= 6,720 + (0,0066 * Tage)		R = 0,092
T/l	AT	Erythrozyten - AT	= 6,467 - (0,0170 * Tage)		R = 0,281
	RWT	Erythrozyten - RWT	= 6,829 - (0,0263 * Tage)		R = 0,317
Hämoglobin g/l	SR	Hämoglobin - SR	= 125,38 - (0,421 * Tage)		R = 0,403
	AT	Hämoglobin - AT	= 129,73 - (0,752 * Tage)	**	R = 0,583
	RWT	Hämoglobin - RWT	= 127,37 - (0,698 * Tage)	**	R = 0,513
Hämatokrit %	SR	Hämatokrit - SR	= 41,367 - (0,198 * Tage)	*	R = 0,507
	AT	Hämatokrit - AT	= 42,917 - (0,345 * Tage)	***	R = 0,659
	RWT	Hämatokrit - RWT	= 42,017 - (0,307 * Tage)	**	R = 0,554
Leukozyten G/l	SR	Leukozyten - SR	= 15,745 + (0,280 * Tage)	*	R = 0,421
	AT	Leukozyten - AT	= 14,590 + (0,253 * Tage)		R = 0,395
	RWT	Leukozyten - RWT	= 12,950 + (0,301 * Tage)		R = 0,492
Segmentkernige Granulozyten G/l	SR	Segm. Gr. - SR	= 59,717 + (0,102 * Tage)		R = 0,056
	AT	Segm. Gr. - AT	= 64,567 + (0,093 * Tage)		R = 0,055
	RWT	Segm. Gr. - RWT	= 56,033 + (0,362 * Tage)		R = 0,206
Lymphozyten G/l	SR	Lymphozyten - SR	= 34,450 - (0,031 * Tage)		R = 0,015
	AT	Lymphozyten - AT	= 28,050 + (0,091 * Tage)		R = 0,048
	RWT	Lymphozyten - RWT	= 36,750 - (0,429 * Tage)		R = 0,235
Monozyten G/l	SR	Monozyten - SR	= 3,617 - (0,031 * Tage)		R = 0,059
	AT	Monozyten - AT	= 6,067 - (0,193 * Tage)		R = 0,377
	RWT	Monozyten - RWT	= 2,600 + (0,240 * Tage)	*	R = 0,419
Thrombozyten G/l	SR	Thrombozyten - SR	= 302,820 - (3,326 * Tage)		R = 0,189
	AT	Thrombozyten - AT	= 404,050 - (5,088 * Tage)		R = 0,327
	RWT	Thrombozyten - RWT	= 499,973 - (10,742 * Tage)	***	R = 0,627

Tab. 5: Blutparameter

Regression der Blutparameter über 19 Tage (von Tag 31 bis 50) der Ferkel. Fütterung mit Standardration (SR), 3,5% Apfeltrester (AT) und 3,5% Rotweintrester (RWT),  
p-Werte \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; \*\*\* = p<0.001 und Pearson Korrelations-Koeffizient

### 6.2.5 Morphologie in Jejunum, Ileum und Colon

Die Veränderung der gemessenen Parameter im Jejunum waren in der SR am größten. Die Zotten der RWT veränderten sich am wenigsten. Im Ileum fallen die Veränderungen im Vergleich zum Jejunum weniger einheitlich aus. Betrachtet man aber die einzelnen

Beobachtungszeitpunkte und wertet diese mit einer TWO WAY ANOVA aus, ist erkennbar, dass die Villihöhe der SR nach dem Absetzen signifikant abnimmt, die polyphenolreichen Fütterungsgruppen aber keine Veränderungen zeigen. Die geringsten Veränderungen sind im Colon in der SR zu finden, die größten in der AT.

Die Lymphfollikelflächen im Ileum nahmen bei den SR am stärksten zu. Bei den RWT und AT veränderten sich die PP nur geringfügig.

Um festzustellen, ob die Ursache der Längenveränderungen im Zellwachstum oder im Zellenzuwachs liegt, wurden im Jejunum Epithelzellen ausgezählt. Dabei ließen sich keine Veränderungen der Zellgröße durch die verschiedenen Fütterungen oder über die Zeit feststellen (Sehm et al., in press).

### 6.2.6 Expressionsanalysen

Weder die verschiedenen Behandlungszeitpunkte noch die Art der Fütterung beeinflussten die extrahierte Gesamt-RNA-Mengen und die Transkriptionsaktivität des Referenz-Gens Histon während des Versuches in den verschiedenen Organen und Geweben. Fünf verschiedene Faktoren wurden in einer one-step RT-PCR untersucht, IL-10, TNF $\alpha$  und NF $\kappa$ B als anti- und pro-inflammatorische Marker, Caspase 3 und Cyclin D1 als Apoptose und Zellzyklusmarker (Sehm et al., accepted).

#### 6.2.6.1 Blut

Faktor	Fütterungsgruppe	Tag 31	Tag 50
IL-10	SR	0 $\pm$ 2.65	1.8 $\pm$ 2.28
	AT	0.63 $\pm$ 2.09	3.51 $\pm$ 0.91
	RWT	1.95 $\pm$ 0.91	1.83 $\pm$ 1.09
TNF $\alpha$	SR	0 $\pm$ 2.28	1.81 $\pm$ 2.41
	AT	<b>0.07<math>\pm</math>1.92<sup>1</sup></b>	<b>3.42<math>\pm</math>0.68<sup>1</sup></b>
	RWT	2.13 $\pm$ 1.32	1.78 $\pm$ 1.68
NF $\kappa$ B	SR	0 $\pm$ 2.75	2.02 $\pm$ 2.55
	AT	<b>0.84<math>\pm</math>2.11<sup>1</sup></b>	<b>3.99<math>\pm</math>0.56<sup>1</sup></b>
	RWT	3.03 $\pm$ 1.53	2.41 $\pm$ 1.13
Caspase 3	SR	0 $\pm$ 2.5	1.86 $\pm$ 2.76
	AT	<b>0.81<math>\pm</math>2.13<sup>1</sup></b>	<b>3.98<math>\pm</math>0.54<sup>1</sup></b>
	RWT	2.29 $\pm$ 1	2.24 $\pm$ 1.01
Cyclin D1	SR	0 $\pm$ 2.16	2.11 $\pm$ 2.43
	AT	0.75 $\pm$ 2.13	3.82 $\pm$ 0.38
	RWT	2.74 $\pm$ 1.32	2.3 $\pm$ 1.53

**Tab. 6: Expressionsanalyse Blut**

$\Delta\Delta$ CP-Werte, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=6, \* Werte unterschieden sich vom ersten Beobachtungszeitpunkt innerhalb der Fütterungsgruppe (P<0,05)

Zwischen den verschiedenen Zeitpunkten gab es nur signifikante Unterschiede innerhalb der Apfeltrestergruppe.  $\text{TNF}\alpha$  ( $p=0,033$ ),  $\text{NF}\kappa\text{B}$  ( $p=0,024$ ) und Caspase 3 ( $p=0,019$ ) mRNA Expression nahmen während des Versuchszeitraumes signifikant zu (Sehm et al., in Vorbereitung).

#### 6.2.6.2 *Gastrointestinaltrakt*

Die mRNA Expressionen des Gastrointestinaltraktes wurden über Regressionsanalysen ausgewertet und sind in der Tabelle 7 zusammengefasst. Zwischen den verschiedenen Fütterungsgruppen zeigten sich innerhalb eines Zeitpunkts keine Unterschiede. Im Gastrointestinaltrakt gab es keine signifikanten Regulierungen der mRNA Expression von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  über die Zeit hinweg.

Die mRNA Expression von  $\text{TNF}\alpha$  nahm während der Zeit im Jejunum ( $p=0,008$ ), im Ileum ( $p=0,038$ ) und im Colon ( $p=0,013$ ) ab, im Magen fiel sie zuerst und stieg dann an. Die mRNA Expression von Caspase 3 war im Ileum ( $p<0,001$ ) und im Colon ( $p<0,001$ ) über den Versuchszeitraum hochreguliert. Cyclin D1 war im Colon nach unten reguliert ( $p=0,007$ ). Ein Abfall der IL-10 mRNA Expression wurde im Jejunum ( $p=0,031$ ), eine Steigung im Colon ( $p<0,001$ ) festgestellt (Sehm et al., accepted).

#### 6.2.6.3 *Organe*

Die Regressionsanalysen der mRNA-Expression in den Organen sind in Tabelle 8 dargestellt. In den mesenterialen Lymphknoten, den Nieren und der Milz gab es nur signifikante Veränderungen in der IL-10 und der Caspase-3 mRNA-Expression.

Die Expression von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  (AT;  $p<0,001$ , RWT;  $p<0,01$ ),  $\text{TNF}\alpha$  (AT;  $p<0,01$ ), IL10 (AT;  $p<0,05$ , RWT;  $p<0,05$ ), IGF-1 (AT;  $p<0,001$ , RWT  $p<0,05$ ), Cyclin D1 (AT;  $p<0,001$ , RWT;  $p<0,001$ ) und Caspase 3 (AT;  $p<0,001$ , RWT;  $p<0,001$ ) veränderte sich signifikant in der Leber. Alle beobachteten Genexpressionen steigerten sich in AT und RWT über die 26 Tage (Sehm et al., accepted).

	Gewebe	SR				AT				RWT			
		Verlauf der Regulation innerhalb von 26 Tagen		p	r <sup>2</sup>	Verlauf der Regulation innerhalb von 26 Tagen		p	r <sup>2</sup>	Verlauf der Regulation innerhalb von 26 Tagen		p	r <sup>2</sup>
<b>NFκB</b>	Magen	-				-6,53	***	0,63		-7,90	***	0,68	
	Jejunum	-1,86	*	0,46		-				-			
	Ileum	-				-				-			
	Colon	-				+1,61	*	0,44		-			
<b>TNFα</b>	Magen	-				-1,74	*	0,41		-			
	Jejunum	-2,35	**	0,57		-				-			
	Ileum	-				-				-2,63	**	0,52	
	Colon	+0,94	***	0,29		+1,48	**	0,47		-			
<b>IL-10</b>	Magen	-				-1,44	*	0,39		-			
	Jejunum	-				-				+3,80	**	0,58	
	Ileum	-				-				-1,70	*	0,39	
	Colon	-				-				+2,35	***	0,63	
<b>IGF-1</b>	Magen	-				-				-			
	Jejunum	-1,67	*	0,40		-				-			
	Ileum	-				-				--			
	Colon	-				-				+2,02	*	0,37	
<b>Cyclin D1</b>	Magen	-				-3,28	***	0,67		-3,64	***	0,71	
	Jejunum	-				-3,69	**	0,55		-2,89	*	0,49	
	Ileum	-				-				+2,36	*	0,55	
	Colon	-1,25	**	0,50		-1,07	*	0,36		-			
<b>Caspase 3</b>	Magen	-				-				-			
	Jejunum	-2,11	**	0,50		-2,86	*	0,43		-3,72	**	0,50	
	Ileum	-				-				+2,25	***	0,63	
	Colon	+0,78	*	0,24		+1,09	*	0,37		+1,32	**	0,51	

Tab. 7: Expressionsanalyse GIT

Trend der Regression der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Werte von Tag 24 bis 50 im Gastrointestinaltrakt, ein positiver Trend bedeutet eine Aufregulation, ein negativer Trend eine Abregulation ; p-Werte: \* = p<0.05; \*\* = p<0.01; \*\*\* = p<0.001, nur signifikante Werte sind gezeigt

	Gewebe	SR			AT			RWT		
		Verlauf der Regulation innerhalb von 26Tagen	p	r <sup>2</sup>	Verlauf der Regulation innerhalb von 26Tagen	p	r <sup>2</sup>	Verlauf der Regulation innerhalb von 26Tagen	p	r <sup>2</sup>
<b>NFκB</b>	<b>Leber</b>	-			+3,98	***	0,71	+3,46	**	0,61
	<b>Niere</b>	-			-			-		
	<b>Muskel</b>	-			-			-9,10	**	0,50
<b>TNFα</b>	<b>Leber</b>	-			+2,13	**	0,49	-		
	<b>Niere</b>	-			-			-		
	<b>Muskel</b>	-			+1,87	*	0,44	-		
<b>IL-10</b>	<b>mes Lymph</b>	-1,28	*	0,37	-			-		
	<b>Milz</b>	-			+1,89	**	0,47	-		
	<b>Leber</b>	-			+6,86	*	0,53	+6,94	*	0,49
	<b>Niere</b>	+7,90	**	0,58	+2,34	*	0,45	-		
	<b>Muskel</b>	+11,91	***	0,65	-			-		
<b>IGF-1</b>	<b>Leber</b>	-			+3,15	***	0,66	+2,19	*	0,42
	<b>Niere</b>	-			-			-		
	<b>Muskel</b>	-			-2,81	*	0,41	-		
<b>Cyclin D1</b>	<b>Leber</b>	-			+2,83	***	0,65	+3,77	***	0,60
	<b>Niere</b>	-			-			-		
	<b>Muskel</b>	-			-			-		
<b>Caspase 3</b>	<b>mes Lymph</b>	-			-			-		
	<b>Milz</b>	-			+1,56	*	0,42	-		
	<b>Leber</b>	-			+8,66	***	0,78	+8,89	***	0,83
	<b>Niere</b>	+1,34	*	0,40	-			-		
	<b>Muskel</b>	+1,95	*	0,44	-			-2,73	*	0,41

Tab. 8: Expressionsanalyse Organe

Trend der Regression der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Werte von Tag 24 bis 50 in Organen, Muskel und Lymphknoten, ein positiver Trend bedeutet eine Aufregulation, ein negativer Trend eine Abregulation ; p-Werte: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; nur signifikante Werte sind gezeigt

## 7. DISKUSSION

### 7.1. Methodische Diskussion

#### 7.1.1 Zellkultur

Es ist bekannt, dass primäre Zellkulturen und etablierte Zelllinien unterschiedlich auf Behandlung mit Polyphenolen reagieren (Borska et al., 2003; Chen et al., 1998; Middleton et al., 2000; Kuo, 2002). Deswegen wurde für den Zellkulturversuch die primäre bovine WBZ gewählt. Primäre Zellkulturen, die als Modell dienen, haben gegenüber stabil transformierten Zelllinien den Vorteil, dass sie nativ gewonnen werden und einer Gewebekultur gleichkommen und somit eher mit der nativen Situation vergleichbar sind (Bodine und Komm, 2002; Murakami und Sekiya, 1998). Stabil transformierte Zelllinien sind potenziell unsterblich und sind oft aus Krebsgewebe entnommen. Grundsätzlich ist es schwierig, Zellkulturergebnisse auf einen kompletten Organismus zu übertragen, da die Zellen aus dem Zell-Zell-Kontakt und dem Zell-Verband herausgelöst sind und deshalb die verschiedenen Interaktionen mit angrenzenden Geweben und Organen fehlen.

Die Etablierung der Primärzellen erfolgte gemäß der Arbeitsgruppe Pfaffl (Prgomet et al., 2005). Der standardisierte Versuchsaufbau ermöglichte es, viele Stimulationskombinationen durchzuführen und zu vergleichen. Das Medium enthielt fötales Kälberserum (FKS), in dem wie in allen Seren viele verschiedene Inhaltsstoffe vorhanden sind. Die genaue inhaltliche Zusammensetzung sowie die Mengenverteilung der einzelnen Substanzen unterliegen der individuellen Variationsbreite und sind nur bedingt durch den Hersteller beeinflussbar (Lindl und Bauer, 1994). Daher ist bei allen Versuchsansätzen dieselbe Charge FKS verwendet worden.

Die verwendeten Stimulationssubstanzen sind isolierte Reinsubstanzen, die eine immer gleiche Behandlung ermöglichten. Die Behandlung mit einzelnen Flavanolen kann nur Modell sein, da in der Nahrung Polyphenole als unterschiedliche Metaboliten und immer in Kombination mit anderen Nähr- und Wirkstoffen vorkommen (Watzl und Rechkemmer, 2001; Watzl und Leitzmann, 1999). Ein Vorteil der Zellkultur gegenüber dem Tierversuch ist die Möglichkeit, definierte Dosen an den Zielzellen einzusetzen. Außerdem kann man so unphysiologisch hohe Dosen anwenden, die ein Tier nicht aufnehmen kann bzw., die dem Tier schaden könnten.

### 7.1.2 Histologie

Bei der Gewebeentnahme ist es wichtig, an den jeweils identischen oder zumindest vergleichbaren Körperstellen und Organpositionen Gewebestücke zu entnehmen. Man kann dabei den gleichen prozentualen Abstand oder den gleichen absoluten Abstand von den Übergängen der verschiedenen Darmabschnitte verwenden (Görke, 2000). Um eine Vermessung der gesamten Darmabschnitte zu vermeiden, wurde hier der absolute Abstand gewählt.

Bei der Fixierung der Gewebestückchen in 3,7%-igem Formalin kommt es zur Gewebeschrumpfung (Romeis, 1989). Daher ist es sinnvoll, die Fixierung standardisiert durchzuführen und das Gewebe gleich lang zu fixieren. Das war nicht exakt möglich, da die Probenentnahme den ganzen Tag in Anspruch nahm, aber die Proben am Folgetag gleichzeitig im Einbettautomaten weiter behandelt werden mussten. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass sich bei der Fixierung die Gewebeteile in sich verdrehen können und die Zotten nicht optimal dargestellt werden können, wenn sie schräg angeschnitten werden. Deshalb wurden jeweils Darmabschnitte und Dünnschnitte gewählt, in denen die Zotten in voller Länge dargestellt waren. Die Vermessungen erfolgten auf diesen Abbildungen an den längsten Zotten. Mit der Einbettungsmethode von Görke (2000) könnte man diese Verdrehungen vermeiden. Das Gewebe wird bei diesem Verfahren direkt bei der Schlachtung mit Stecknadeln plan auf einem Styroporblock befestigt.

Die HE-Färbung ist eine etablierte Übersichtsfärbung und sehr gut geeignet, die Zotten darzustellen (Linden et al., 1992). Die HE-Färbung ist einfach durchzuführen und unanfällig für Fehler. So stellen kleine Schwankungen in den Färbezeiten oder in den Konzentrationen der Färbemittel kein zusätzliches Problem dar. Da bei dieser histologischen Methode keine „Draufsicht“ realisierbar ist, konnte nicht festgestellt werden, ob schmälere Villi weiter auseinander stehen als breitere.

Das mikroskopische Bild wird direkt an einen Computer weitergegeben und mittels bildverarbeitender Software ausgewertet. Der Vorteil der Onlineverarbeitung der Bilder, ist die große Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Schnelligkeit. Zu dem kann man die Bilder mit den gemessenen Strecken abspeichern und so einfach nachkontrollieren. Die histomorphometrische Vermessung mittels HE-Färbung ist eine kostengünstige Methode, den Zustand der Darmabschnitte einzuschätzen.



### 7.1.3 Hochdurchsatz PCR

In dieser Arbeit erfolgte die Genexpressionsanalyse mit zwei verschiedenen PCR Systemen. Bei der Zellkultur wurde ein two-step RT-PCR System verwendet, in dem RT und PCR getrennte Arbeitsschritte sind. Bei dem Fütterungsversuch wurde eine one-step RT-PCR verwendet; hier ist die RT der PCR direkt vorgeschaltet und beides wird in einem gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt.

Für diesen Versuch wurden die Primer für die Histon-mRNA designed und etabliert. Beim LightCycler System muss von Hand pipettiert werden, was Pipettierfehler zur Folge hat. Bei einer two-step PCR sind mehrere Pipettiervorgänge notwendig, dadurch können sich Fehlerquellen summieren. Es war nicht möglich, alle Zellkulturproben einer Vergleichsgruppe in einem Durchgang zu messen, da das LightCycler System nur 32 Kapillaren besitzt. Unterschiede entstanden so durch unterschiedliche Umwelt- und Reaktionsbedingungen. Der LightCycler zeichnet sich durch seine Schnelligkeit und durch das sehr gute optische System samt Glaskapillaren aus und liefert erstklassige real-time RT-PCR Ergebnisse. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nach der RT mit der relativ zur RNA stabileren cDNA weitergearbeitet werden kann.

Der ep realplex Cycler (Eppendorf, Hamburg) mit 96-well-Format befand sich gerade in der beta-Testphase. An unserem Institut konnten wir einen von sechs Prototypen testen und gründlich prüfen. Daher war es nötig, verschiedenste Reaktionsabläufe zu testen. Durch die Verwendung des Pipettierroboters epMotion (Eppendorf) wurden Pipettierfehler vermieden und Ungenauigkeiten eingegrenzt. Es dauerte relativ lange, den kompletten Ansatz zu etablieren und zu pipettieren, da der Pipettierroboter aus Kostengründen den MasterMix mit Einkanalpipette verteilte. Das Arbeiten mit der weniger stabilen RNA ist aufwendiger als mit cDNA. So müssen verschiedene Aliquote eingefroren und die Proben ständig gekühlt werden. Ein 15 µl Ansatz in den Platten reichte für die Analyse aus. Durch die geringe Füllhöhe der Platten entsteht ein höherer Verdunstungsraum, welcher Erwärmung und Abkühlung beeinflusst. Die Fehler zeigen sich in einem akzeptablen Bereich und die Wiederholbarkeit ist gut.

Bei allen untersuchten Transkripten unterschieden sich alle Zeiten und Temperaturen in beiden Systemen geringfügig. Im ep realplex Cycler waren längere Aufheiz- und Abkühlungszeiten nötig. Die verschiedenen Schmelztemperaturen der Produkte verschoben sich im ep realplex Cycler geringfügig nach vorne (Tab. 9).

	two-step		one-step	
RT	65°C	5min	50°C	10min
	37°C	60min	95°C	5min
	99°C	1min		
Denaturierung	95°C	1min		
45 Zyklen	95°C	15sek	95°C	15sek
	60°C	10sek	60°C	20sek
	72°C	20sek	72°C	30sek
Schmelzkurve		12min		20min
Kühlen	4°C	1min	4°C	1min

**Tab. 9: Protokoll der one-step und two-step-PCR**

Bei der two-step PCR wurden die Proben nach der RT bei –20°C eingefroren und vor der PCR ein Denaturierungsschritt eingefügt.

Nachdem bei den zwei Ansätzen mit verschiedenen Spezies gearbeitet wurde, mussten teilweise neue Primer-Paare für die PCR entworfen und entwickelt werden. Einige Primer arbeiteten mit den verschiedenen Reagenzien unterschiedlich bzw. funktionierten gar nicht. Die nochmalige Optimierung aller Primer und der jeweiligen Temperaturen für das ep realplex Cyclyer Systems erfolgte in der Testphase.

## 7.2. Physiologische Diskussion

### 7.2.1 Zellkultur

Leukozyten spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem. Deshalb bot sich die primäre bovine Zellkultur als ideales Model für den Vorversuch an. Die immun-modulatorischen Effekte von EGCG und Catechin wurden in verschiedenen Konzentrationen und in verschiedenen Kombinationen mit einem Stimulus (ConA-Behandlung) getestet (Sehm et al., 2005).

Vor allem Flavanole zeigen in Zellkultur- und *in vivo* Experimenten immun-modulatorische Effekte (Ahmad et al., 2000). Ebenso wurden anti-proliferative Eigenschaften von polyphenolreichen Apfelextrakten in Zellkultur gezeigt (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003). Dabei verhalten sich primäre Zellkulturen und etablierte Zelllinien oft gegensätzlich und man kommt zu unterschiedlichen physiologischen Schlussfolgerungen (Chen et al., 1998; Middleton et al., 2000; Kuo, 2002). Die Flavonoide EGCG und Catechin hatten verschiedene stimulierende Wirkungen auf bovine WBZ. In unseren Studien bewirkten höhere EGCG- und Catechin-Konzentrationen eine Verringerung der gesamten RNA Expression, wobei EGCG den größeren Effekt zeigte.

Die Behandlung mit Catechin beeinflusste die cFos Expression kaum, eine EGCG Behandlung in hohen Dosen reduzierte sie. Wurden die Zellen ConA ausgesetzt, induzierte das die cFos Expression, was einer generellen Stimulation der mRNA Expression entspricht. Die Stimulation mit ConA hob die Reduktion der cFos mRNA Expression durch die EGCG Behandlung wieder auf. Ein Versuch mit einer humanen Hautzellkultur zeigte eine reduzierende Wirkung von EGCG auf cFos (Chen et al., 1999). Bei hohen EGCG Konzentrationen korrelierten diese Ergebnisse mit der Gesamt RNA-Menge, dem geringeren Zell-Turn-Over und den anti-karzinogenen Effekten.

Die TNF $\alpha$  Expression zeigte ein Flavanoid spezifisches Expressionsmuster. Die Expression von TNF $\alpha$  wurde durch hohe Catechin (10-100  $\mu$ M) und physiologische EGCG Konzentrationen (bis zu 0,1  $\mu$ M) stimuliert. Beide Effekte waren von den verschiedenen ConA Stimulationen überlagert, die ebenfalls die pro-inflammatorische TNF $\alpha$  Expression steigern konnte (Gantner et al., 1995; Zhao et al., 2004). In der Literatur werden die Effekte von EGCG auf die TNF $\alpha$  mRNA Expression kontrovers wiedergegeben (Sakagami et al., 1995; Fujiki et al., 2000; Suganuma et al., 2000; Crouvezier et al., 2001). Es werden sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte

beobachtet. In Zelllinien wurde eine Inhibierung der TNF $\alpha$  mRNA Expression mit EGCG oder Catechin mehrfach berichtet (Suganuma et al., 2000; Fujiki et al., 1999; Choi und Hwang, 2003).

Bei dem zweiten Versuchsansatz wurde festgestellt, dass EGCG und Catechin meist die beobachteten mRNA Expressionen abregulierte. Wenn Catechin aber gleichzeitig oder erst nach der ConA Stimulation gegeben wurde, zeigte es entweder gar keinen Effekt oder einen erhöhenden.

In der primären WBZ Kultur wurde das Expressionslevel von IL-1 $\beta$  und IL-6 kaum beeinflusst. Eine Catechin Behandlung vor der ConA Stimulation reduzierte die IL-1 $\beta$  Expression stark, gleichzeitig wurde die IL-6 Expression verringert. Erfolgte die ConA Behandlung vor der Flavanoidegabe, verringerte sich die IL-6 Expression mit EGCG und erhöhte sich mit anschließender Catechingabe. Die Effekte von Flavonoiden auf Zelllinien und primäre Zellen sind unterschiedlich (Ahmad et al., 2000). In Studien mit humanen Leukozyten reduzierten Flavanoide die Produktion von IL-1 $\beta$  (Crouvezier et al., 2001). Beide pro-inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  reagierten ähnlich in diesen Untersuchungen (Ahmad et al., 2000; Crouvezier et al., 2001).

Histon wurde in früheren Studien mit Flavanoide-Behandlung kaum beachtet. In unseren Zellkulturversuchen konnten die Flavonoide die Histon Expression nur wenig beeinflussen. Es ist noch nicht belegt, ob EGCG einen Einfluss auf die Histon H3 Genexpressionsaktivität hat, da EGCG *in vitro* an das Histonprotein, ein Histonsulfat, binden kann (Polster et al., 2003).

Zusammenfassend kann man im Zellkulturversuch bei beiden Flavonoiden hauptsächlich positive Effekte sowohl auf die immunrelevanten Zytokine als auch auf die Expression der Transkriptionsfaktoren feststellen. Höhere Flavanoidegaben zeigten ausgeprägtere Einflüsse als geringere, wobei EGCG die mRNA Genexpression mehr veränderte als Catechin (Sehm et al., 2005).

### 7.2.2 Fütterungsversuch

Die verschiedenen Effekte der Flavanoide *in vitro* (Calixto et al., 2003 und 2004) stehen in Verbindung mit den Erkenntnissen, dass der Verzehr von polyphenolreichen Nahrungsmitteln die Aktivität von Blutplättchen verringert, den Cholesterinstoffwechsel positiv beeinflusst und vor verschiedenen Krebsarten schützen kann (Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Eberhardt et al., 2000). Tiermodelle zeigten, dass Polyphenole das Risiko einer Krebsentstehung des Mund- und Rachenraumes, des Magens, des

Intestinaltraktes, der Leber, der Lunge und der Haut verringern können (Lambert and Yang, 2003). Nicht nur in Zellkultur, sondern auch unter physiologischen Bedingungen haben Polyphenole antioxidative Eigenschaften (Mazza et al., 2002). Äpfel (Wolfe et al., 2003; Eberhardt et al., 2000), vor allem die Apfelschale und Beiprodukte der Weinproduktion (Shrikhande, 2000, Carbonneau et al., 1997), sind sehr polyphenolreich.

In einem Teilversuch wurden Inhalte von Magen und Colon sowie Darm-, Nieren- und Lebergewebe auf mögliche vorhandene Polyphenole getestet. In einer anderen Studie wurden bereits Quercetin und Isorhamnetin in Leber und Nieren von Ferkeln nach einer angereicherten Fütterung nachgewiesen (de Boer et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Polyphenole tatsächlich aufgenommen wurden.

Der Darm dient nicht nur zur Aufnahme der Nahrungsbestandteile, hier befindet sich auch das größte Immunsystem (Roitt et al., 1995). Es wird geschätzt, dass der Magen-Darm-Trakt 5% des Gesamtkörpergewichts ausmacht. In ihm finden bis zu 30% des gesamten Sauerstoffverbrauches und des Protein Turn Overs statt (Gaskins, 2001). Ungefähr  $10^{14}$  Bakterien leben im Darm, das sind zehnmal mehr Zellen, als der gesamte tierische Organismus besitzt (Berg, 1996). Viele Reize beeinflussen diese Bakteriengemeinschaft – z. B. Nahrungsbestandteile, neue evtl. schädliche Keime, sowie Nahrungsumstellungen.

Das Absetzen der jungen Ferkel und der damit verbundene Wechsel von flüssiger auf feste Nahrung ist ein plötzlicher Einschnitt in das Leben der Jungtiere, der weitere Veränderungen bedingt. Das Ferkel wird von seiner Mutter getrennt, meistens wird es in eine neue Umgebung gebracht und wird neuen Buchtgenossen und deren potentiell aggressivem Verhalten ausgesetzt. Verschiedenste physiologische, umwelt- und ernährungsbedingte Faktoren stellen die Ursachen für das Stressverhalten der Ferkel nach dem Absetzen dar (Otten, 2002; Funderburke und Seerley, 1990). In den verschiedenen Untersuchungen konnten im Fütterungsversuch die zum Teil starken Veränderungen beobachtet werden.

In der Natur gewöhnen sich Ferkel über Wochen das Saugen ab und nehmen immer mehr feste Nahrung zu sich. Dieses langsame Umstellen ist in den Selektionsdruck mit eingebunden, das mukosale Darmimmunsystem entwickelt und gewöhnt sich allmählich an die verschiedenen Umweltreize. In der modernen Schweinehaltung ist eine langsame Umstellung meist nicht vorgesehen.

Das Absetzen der Ferkel, unabhängig von ihrem Alter (Wiese et al., 2003), wird im allgemeinen von diversen Veränderungen der intestinalen Morphologie begleitet, so werden die Villushöhen reduziert, die Krypten tiefer, die Absorptionsfähigkeit und die Bürstensaumenzymaktivität herabgesetzt (Hampson 1986a und 1986b, Kelly et al., 1991a und 1991b; Miller et al., 1984). Intestinale Entzündungen, die mit dem Absetzen einhergehen, wurden für viele Spezies beschrieben (McCracken et al., 1999). Zwei Haupthypothesen für die morphologischen Veränderungen des Darmes werden in diesem Zusammenhang genannt. Die erste sagt aus, dass eine Immunantwort auf die Futterantigene zu einer lokalen Entzündung und damit zu verringerten Zottenlängen führt (Bailey et al., 1993; Li et al., 1991; Miller et al., 1984 und 1994). Die zweite Hypothese geht davon aus, dass das Fehlen der luminalen Stimulation durch die verringerte Futteraufnahme in den ersten Tagen nach dem Absetzen verantwortlich ist für die Änderungen in der intestinalen Morphologie (Cera et al., 1988; Kelly et al., 1991a; McCracken et al., 1995; Pluske et al., 1996).

In den durchgeführten histologischen Untersuchungen konnte für die Kontrollfuttergruppe eine Abnahme der Villuslängen nach dem Absetzen gezeigt werden, wie für Jejunum (Klein, 2001; Hedemann et al., 2003, Kelly et al., 1991a; Vente-Spreeuwenberg et al., 2003) und Ileum (Kelly et al., 1991a, van Beers-Schreurs et al., 1998) in der Literatur beschrieben. Die Zottenlänge ist abhängig von der Nahrung und dem Alter der Tiere (Görke, 2000). Das Vorhandensein pathogener Keime bewirkt eine Zottenverkürzung, wohingegen eine nicht-pathogene Flora das Längenwachstum der Darmzotten stimuliert (Görke, 2000).

Nach einer Woche nehmen die Längen wieder zu (Klein, 2001; Tang et al., 1999). Wie in früheren Versuchen beschrieben (Görke, 2000, Mekbungwan and Yamauchi, 2004), waren die Villillängen im Jejunum länger als im Ileum. Diese beschriebenen Veränderungen wurden durch die beiden Tresterfütterungen abgeschwächt, das Wachstum war im Ileum und im Colon über den ganzen Versuchszeitraum verstärkt.

Es wird angenommen, dass die Länge der Villi mit der gesamten Oberfläche des Darmes korreliert, die wiederum mit dem Absorptionsvermögen der verfügbaren Nährstoffe in Verbindung gebracht wird (Caspary, 1992, Görke, 2000). Längere Villi und höhere Mitoseraten im Darm weisen darauf hin, dass die Villi aktiviert sind (Langhout et al., 1999; Yasar and Forbes, 1999). In unserem Versuch wurden keine signifikanten Unterschiede der täglichen Zunahmen zwischen den verschiedenen Fütterungen gefunden, in der Literatur werden jedoch längere Villi mit größeren täglichen Zunahmen

in Verbindung gebracht (Zijlstra et al., 1996), kürzere mit verringerten täglichen Zunahmen (Zijlstra et al., 1997). Das Ileum weist generell eine größere Längenzunahme der Villi als das Jejunum auf. Im Ileum wird eine größere Proliferationsrate als im Jejunum angenommen (Wiese et al., 2003).

Die größeren Villilängen und die erhöhte Mitoserate im Intestinaltrakt wurden in anderen Studien als morphologische Indikatoren für eine Aktivierung der Villi gesehen (Langhout et al., 1999; Yasar and Forbes, 1999).

Die Zellgrößen der Darmepithelzellen veränderten sich über den Versuchszeitraum nicht. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der Zellen bei längeren Villi gestiegen ist. Die Annahme, dass das Längenwachstum der Villi von einer Zellvermehrung herrührt und nicht von einer Zellvergrößerung, deckt sich mit anderen Beobachtungen (Lauronen et al., 1998, Mei und Xu, 2005).

Die Peyerschen Platten (PP) wurden in der Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum signifikant größer (21%), in den Behandlungsgruppen fanden keine Veränderungen statt. Das ist ein Hinweis darauf, dass in der Kontrollgruppe die PP aktiviert waren. Flavonoide sind dafür bekannt, einen blockierenden Effekt auf Lymphzellwachstum, T-Zellen und Natural Killer Zellen zu haben (Lampe, 1999; Watzl und Rechkemmer, 2001).

Im Colon lagen bei beiden polyphenolreichen Fütterungen größere Kryptentiefe und Flächen vor. In einem anderen Versuch konnten nur bei Tieren mit einer Infektion Veränderungen im mittleren Colon festgestellt werden (Petkevicius et al., 2003). Im Colon von Ratten mit Polyphenolen und Tanninen aus Wein wurde keine erhöhte Apoptoserate, jedoch ein Rückgang der Kryptenzellzahl festgestellt (Caderni et al., 1999).

In den verschiedenen Darmabschnitten wurden vergleichende Expressionsstudien an Markergenen des Immunsystems, der Apoptose und des Zellzyklus durchgeführt. Der Gastrointestinaltrakt und mehrere Organe der Ferkel wurden in einer one-step RT-PCR auf verschiedene anti-inflammatorische, IL-10, pro-inflammatorische, TNF $\alpha$  und NF $\kappa$ B, Apoptose- und Zellzyklusmarker, Caspase 3 und Cyclin D1 untersucht.

Verschiedene Zytokine, wie TGF $\beta$ , IL-1 $\alpha$  und IL-6 werden in dem intestinalen Epithel exprimiert und spielen eine Rolle bei der Einwanderung der Immunzellen in die Mukosa und bei dem Epithelzellwachstum (Stadnyk, 1994). Andere Zytokine, wie IL-8, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  mRNA werden ebenfalls von normalen Epithelzellen exprimiert und sind als Antwort auf eine mikrobielle Infektion signifikant erhöht (Jung et al., 1995; Pie et al.,

2004). Nach einer bakteriellen oder viralen Infektion bei Schweinen findet eine lokale Expression von IL-1 $\alpha$ , IL-6 und TNF $\alpha$  statt (Murtaugh et al., 1996; Fossum, 1998).

Im Gastrointestinaltrakt wurden in dieser Studie nur im Colon der Kontroll- und Apfeltrestertiere steigende TNF $\alpha$  mRNA Expressionsdaten gefunden. Der Entzündungsprozess ist selbstlimitierend, da auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine direkt die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und IL-13, folgt (Philpott und Ferguson, 2004). In dieser Untersuchung zeichneten sich in den beiden Trestergruppen verschiedene Verläufe von IL-10 im Gastrointestinaltrakt ab. Im Magen und im Ileum verstärkte sich die Expression, im Jejunum und Colon schwächte sie ab.

In den meisten getesteten Geweben und Organen reagierten die TNF $\alpha$  und NF $\kappa$ B Expressionen vergleichbar. TNF $\alpha$  ist ein wichtiges Zytokin, das von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und anderen Zelltypen als Antwort auf einen Infekt, eine Verletzung oder andere Umwelteinflüsse gebildet wird (Baud und Karin, 2001). Werden Zellen TNF $\alpha$  ausgesetzt, kann das zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade und Apoptose führen (Chang und Yang, 2000). TNF $\alpha$  löst die Aktivierung von zwei wichtigen Transkriptionsfaktoren, AP-1 und NF $\kappa$ B, aus (Barnes und Karin, 1997; Shaulin und Karin, 2001).

Als zentrale Antwort auf eine Entzündung wird der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert, der wiederum ein Hauptregulator von vielen pro-inflammatorischen Zytokinen ist (Baldwin, 1996; Ghosh und Karin, 2002). Durch die Aktivierung von NF $\kappa$ B wird im Weiteren die gesamte Zellproliferation gefördert (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999) und die Zellen werden vor Apoptose geschützt (Beg und Baltimore, 1996; Van Antwerp et al., 1996). Die Expression von NF $\kappa$ B und Caspase 3 verlief in diesem Versuch nicht einheitlich korreliert. Während des Beginns einer Entzündung wird NF $\kappa$ B mit pro-inflammatorischen Genen in Verbindung gebracht, bei einer abklingenden Entzündung mit der Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen und der Induktion von Apoptose (Lawrence et al., 2002).

Caspase 3 spielt eine zentrale Rolle in der Regelung der Apoptose. Die Inhibierung von Caspase 3 verringert den Zelltod durch Apoptose (Heczko et al., 2001). In Ileum und Colon zeigte sich ein Anstieg der Caspase 3 mRNA Expression, im Jejunum gab es dagegen einen signifikanten Abfall.

Generelle Wachstumsfaktoren wie z. B. IGF-1 induzieren die Produktion von Cyclin D1 (Albanese et al., 1999). Cyclin D1 steht im physiologischen Zusammenhang mit über 30 Transkriptionsfaktoren und Mitregulatoren (Wang et al., 2004; Zhang et al., 1999;



Horstmann et al., 2000; Inoue and Sherr, 1998). Die Cyclin D1 mRNA Expression fiel sowohl in der Apfeltrestergruppe als auch in der Weintrestergruppe im Dünndarm ab. Gleichzeitig stieg der Caspase 3 Level im Colon. Cyclin D1 fiel in der Kontroll- und in der Apfeltrestergruppe. Die Effekte waren in der Rotweingruppe am stärksten, in der Kontrollgruppe am schwächsten. Bei Ratten mit induzierten Tumoren konnte eine Fütterung mit Rotweinextraktion zu einer Reduktion der Tumore führen, die Apoptoserate war bei diesen Tieren in den Tumoren erhöht (Caderni et al., 2000). Die Tresterfütterungen stimulierten die Cyclin D1 mRNA Expression in der Leber. Es ist bekannt, dass Apfel- und Traubenextrakte eine stärkere Aktivierung der Caspase 3, der Caspase 7 und eine Teilung der poly-(ADP-ribose) Polymerase in Jurkat T-Zellen hervorrufen (Chen et al., 2004). In den histomorphologischen Untersuchungen wurde eine Zunahme der Villillänge im Jejunum beobachtet. Ein Zusammenhang mit der geringeren Caspase 3 Expression wird vermutet.

Die mRNA Expressionen der getesteten Transkripte stiegen in den beiden polyphenolreichen Fütterungen mehrheitlich an. Auch in der Zellkultur zeigte sich in physiologischen Konzentrationen von EGCG eine Stimulierung der Gesamt-RNA-Menge. In Jejunum und Ileum war der Zell-Turn over herabgesetzt. Die beiden Tresterfütterungen zeigten positive Effekte auf die Darmgesundheit. So wurde nach dem Absetzen keine Abnahme der Villi in Jejunum und Ileum beobachtet, die PP zeigten geringere Flächenzunahmen und die Anzahl der *Laktobazillen* im Coloninhalt nahm zu.

## 8. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Nach dem Verbot von Antibiotika als Leistungsförderer für Tiere in der EU (Verordnung EG Nr. 183/2003 Artikel 11 Absatz 2), wird nach potenten und umweltfreundlichen Alternativen, die das Immunsystem stabilisieren, ohne gesundheitliche Risiken für Mensch und Tier zu beinhalten, gesucht. In der Ferkelfütterung drängen viele alternative Futtermittelzusätze auf den Markt. Von Substanzen, die als Pro-, Prä- und Synbiotika wirken sollen, bis hin zu Kräutermischungen und seltenen Erden sind verschiedenste Futtermittelzusätze und Additive im Handel erhältlich.

Durch die Fütterung kann die Kompetenz des Immunsystems stark beeinflusst werden und somit auch die Pathogenese von Erkrankungen teils erheblich moduliert werden. Bis heute wurde hauptsächlich der Einfluss der essentiellen Nährstoffe untersucht, die Wirkungen der sekundären Pflanzenstoffe auf das Immunsystem und die Ernährungsphysiologie stehen noch im Hintergrund. Physiologische Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellproliferation und programmierter Zelltod (Apoptose) und deren Beeinflussbarkeit durch natürlich vorkommende Wirkstoffe erlangen in der Humanernährung im Zusammenhang mit Tumorentwicklung und Darmerkrankungen zunehmendes Interesse. Vor dem Hintergrund des heutigen Verbots antibiotischer Futterzusatzstoffe mit leistungsfördernder und darmstabilisierender Wirkung in der Tierernährung sind diese Vorgänge von größter Bedeutung (Witte, 1999).

Über die immun-stimulierenden und immun-modulatorischen Wirkmechanismen *in vivo* von sekundären Pflanzenstoffen liegen bisher wenige wissenschaftliche Kenntnisse vor. Reststoffe aus der Lebensmittelproduktion, wie Trester, werden noch wenig beachtet, obwohl man sie kostengünstig in der Tierfütterung einsetzen könnte. Im Mittelpunkt der Diskussion steht die antioxidative Wirkung und die vermittelte Immunmodulation. Hinweise für eine Beeinflussung des Immunsystems durch sekundäre Pflanzenstoffe gibt es für Carotinoide, Flavonoide, Saponine und Sulfide. Des Weiteren ist bekannt, dass Flavonoide die Aktivität von Immunzellen sowie von wichtigen Schlüsselenzymen beeinflussen und einzelne Schritte in der Signaltransduktion hemmen können.

In dieser Arbeit wurden Futtermittelzusätze getestet, die sich positiv auf die Gesundheit auswirken sollen. Ein besonderer Aspekt war die Verwendung natürlicher Reststoffe aus der Getränkeherstellung. Dadurch bekommt dieser Fütterungsansatz einen ökologischen Aspekt. Sowohl die Darmflora als auch die Darmzotten wurden von beiden Tresterfütterungen positiv beeinflusst. Die Rotweintresterfütterung reduzierte zusätzlich die Thrombozytenzahl.

Um die Leistungsfähigkeit der beiden hier getesteten polyphenolreichen Zusatzstoffe abschließend bewerten zu können, sind weitere Feldversuche mit Immunstimuli notwendig. Bei der praktischen Umsetzung könnten Obst- und Weinbauern für den neuen Absatzmarkt ihrer Restprodukte sensibilisiert werden. Getrockneter Apfeltrester wird – auch für andere Spezies bereits als Futtermittel vertrieben. Weintrester wird bis jetzt kaum über den Handel als Futtermittel für Schweine vermarktet.

Da die Erhaltung der Tiergesundheit immer mehr in den Blickpunkt der Öffentlichkeit rückt, beschäftigen sich weitere Arbeiten mit der aktuellen Problematik der antibiotikafreien Aufzucht von gesunden Jungtieren (Kroismayr et al., 2005; Fleige et al., 2005).

## 9. LITERATUR

Ahmad N, Gupta S, Mukhktar H, 2000: Green tea polyphenol epigallocatechin-3gallate differentially modulates nuclear factor kappa B in cancer cells versus normal cells. Arch Bioch And Biophysics 376, 338-346.

Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantaggiati M, Somasundaram K, Thimmapay B, Pestell RG, 1999: Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. J Biol Chem 274, 34186-95.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, 1993: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci 90, 7915-22.

Anderson DB, McCracken VJ, Aminov RI, Simpson JM, Mackie RI, Verstegen MWA, Gaskins HR, 1999: Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. Nutr Abstr Rev, Series B 70, 101-108.

Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM, 1996: Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. Science 274, 787-9.

Bach Knudsen KE, 2001: Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animals diets. Proc Nutr Soc 60, 291-299.

Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA, 1994: Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. J Clin Pathol 47, 113-6.

Baldwin AS Jr, 1996: The NF-kappa B and I kappa B protein new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 14, 649-83.

Baud V, Karin M, 2001: Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol 11, 372-7.

Van Beers-Schreurs HMG, Nabuurs MJA, Vellenga L, Kalsbeck van der Valk HJ, Wensing T, Breukink HJ, 1998: Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J Nutr* 128, 947-53.

Beg AA, Baltimore D, 1996: An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-4.

Berg RD, 1996: The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4, 430-5.

Bezkorovainy A, 2001: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J Clin Nutr* 73, 399-405.

Bodine PV, Komm BS, 2002: Tissue culture models for studies of hormone and vitamin action in bone cells. *Vitam Horm* 64, 101-51.

de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC, 2005: Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr* 135, 1718-25.

Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke, A, 1998: Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z Ernährungswiss* 37,147-163.

Bollmann S, 2002: Untersuchungen zur Wirkung nichtantibiotischer Futterzusätze auf die Darmflora sowie den Verlauf einer experimentellen Escheria coli- bzw Salmonella Derby-Infektion bei Schweinen, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Borska S, Gebarowska E, Wysocka T, Drag-Zalesinska M, Zabel M, 2003: Induction of apoptosis by EGCG in selected tumour cell lines in vitro. *Folia Histochem Cytobiol* 41, 229-32.

Boyer J, Liu RH, 2004: Apple phytochemicals and their health benefits. *J Nutr.* 12, 3-5.

Van Briel C, 2002: Veränderung der Anzahl und Verteilung von Plasmazellen und Lymphozytenpopulationen in der Darmschleimhaut des Schweines nach Applikation von Probiotika, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Caderni G, De Filippo C, Luceri C, Salvadori M, Giannini A, Biggeri A, Remy S, Cheynier V, Dolara P, 2000: Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* 21, 1965-9.

Caderni G, Remy S, Cheynier V, Morozzi G, Dolara P, 1999: Effect of complex polyphenols on colon carcinogenesis. *Eur J Nutr* 38, 126-32.

Calixto JB, Campos MM, Otuki M, Santos AR, 2004: Anti-inflammatory compounds of plant origin Part II modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70, 93-103.

Calixto JB, Otuki MF, Santos AR, 2003: Anti-inflammatory compounds of plant origin Part I Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Med* 69, 973-83.

Carbonaro M, Grant G, 2005: Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Ann Nutr Metab* 49, 178-82.

Carbonaro M, Grant G, Pusztai A, 2001: Evaluation of polyphenol bioavailability in rat small intestine. *Eur J Nutr* 40, 84-90.

Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michael F, Fouret G, Dedieu F, Descomps B, 1997: Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur J Clin Nutr* 51, 982-690.

Caspary WF, 1992: Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr* 55, 299-308.

Cera KR, Mahan DC, Cross RF, Reinhart GA, Whitmoyer RE, 1988: Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J Anim Sci* 66, 574-84.

Chang HY, Yang X, 2000: Proteases for cell suicide functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-46.

Chen MS, Chen D, Dou QP, 2004: Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In Vivo* 18, 73-80.

Chen W, Dong Z, Valcic S, Timmermann B, Bowden G, 1999: Inhibition of ultraviolet B-induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (-)-epigallocatechin gallate in human keratinocyte cell line. *Mol Carcinog* 24, 79-84.

Chen Z, Schell J, Ho C, Chen K, 1998: Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer Lett* 129, 173-179.

Choi EM, Hwang JK, 2003: Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. *Biol Pharm Bull* 26, 523-6.

Crouvezier S, Powell B, Keir D, Yapoob P, 2001: The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine* 280-286.

Dong Z, 2000: Effects of food factors on signal transduction pathways. *Biofactors* 12, 17-28.

Duchmann R, Hoffmann J, Marth T, Schneider T, Stallmach A, Zeitz M, 1999: Mukosales Immunsystem im Darm – Immunologische Grundlagen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie, *Magazin Forschung* 1, 47-64.

Eberhardt M, Lee C, Liu RH, 2000: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903-904.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata A, 1998: Caspase-activated Dnases that degrade DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Escarpa A, Gonzalez M, 1998: High-performance liquid chromatography with diode array detection for the performance of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *J Chromat A* 823, 331-337.

FAOSTAT-FAO Statistical Database, <http://faostat.fao.org/>

Feucht W, Treutter D, 1989: Phenolische Naturstoffe, Obst- und Gartenbauverlag, München.

Fleige S, Preißinger W, Meyer HHD, Pfaffl MW, 2005: Einfluss einer synbiotischen Fütterung mit Lactulose und *Enterococcus faecium* auf die Darmgesundheit bei Milchkälbern – In: Abstractband der „Milchkonferenz 2005“, 29.-30.09.2005, Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft, Kiel, 47-48.

Fossum C, 1998: Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domest Anim Endocrinol* 15, 439-44.

Francois AC, 1962: Mode of action of antibiotics on growth. *World Rev Nutr Diet* 3, 21.

Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka E, Suga K, Imai K, Nakachi K, Kimura S, 1999: Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 220, 225-8.

Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka E, Suga K, Imai K, Nakachi K, 2000: A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor-alpha, and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea- a review. *Cancer Detect Prev* 24, 91-99.



Funderburke DW, Seerley RW, 1990: The effects of postweaning stressors on pig weight change, blood, liver and digestive tract characteristics. *J Anim Sci* 68, 155-162.

Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G, 1995: Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 21, 190-8.

Gaskins HR, 2001: Intestinal bacteria and their influence on swine growth. In: *Swine Nutrition* Lewis AJ, Southern LL, CRC Press, New York, 585-606.

Ghosh S, Karin M, 2002: Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109, 81-96  
Review.

Görke B, 2000: Untersuchung der Schleimhautmorphologie im Dün- und Dickdarm nach oraler Applikation von *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var *toyoi* beim Schwein, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr, 1999: NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19, 5785-99.

Gutzwiller A, Stoll P, 2005: Apfeltrester im Schweinefutter reduziert die durch das Mykotoxin Deoxynivalenol verursachte Wachstumsreduktion, Beiträge zur 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau-Ende der Nische, Kassel, 1.-4.3.2005.

Hampson DJ, 1986a: Attempts to modify changes in the piglet small intestine after weaning. *Res Vet Sci* 40, 313-7.

Hampson DJ, 1986b: Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res Vet Sci* 40, 32-40.

Heczko U, Carthy CM, O'Brien BA, Finlay BB, 2001: Decreased apoptosis in the ileum and ileal Peyer's patches: a feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Infect Immun* 69, 4580-9.

Hedemann MS, Højsgaard S, Jensen BB, 2003: Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J Anim Physiol A Anim Nutr* 87, 32-41.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M, 1999: NF-kappaB function in growth control regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol* 19, 2690-8.

Hoffmann-Moujahid A, 2002: Immunreaktionen in der Darmwand und Darmlymphe nach Gabe bakterieller Antigene in das Darmlumen, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Hollman PC, van Trijp JM, Buysman MN, van der Gaag MS, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB, 1997: Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418, 152-6.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB, 1995: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62, 1276-82.

Horstmann S, Ferrari S, Klempnauer KH, 2000: Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene* 19, 298-306.

Hug H, 2000: Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biologie in unserer Zeit* 30, 128–135.

Inoue K, Sherr CJ, 1998: Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 18, 1590-600.

Janeway C, Travers P, Immunologie, 1997, Spektrum Verlag, Heidelberg.

Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF, 1995: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95, 55-65.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO, 2002, Histologie, Springer Verlag, Berlin.

Kelly D, Smyth JA, McCracken KJ, 1991a: Digestive development of the early-weaned pig 1 Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Br J Nutr* 65, 169-80.

Kelly D, Smyth JA, McCracken KJ, 1991b: Digestive development of the early-weaned pig. 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *Br J Nutr* 65, 181-8.

Klein C, 2001: PTHr und Milch stimulieren einen VitD - unabhängigen aktiven Calciumtransport im Darm von Saugferkeln, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Kolb GMH, 1991: Vergleichende Histologie, Cytologie und Mikroanatomie der Tiere, Springer Verlag, Berlin.

Kroismayr A, Sehm J, Mayer HHD, Schreiner M, Foißy H, Wetscherek W, Windisch W, 2005: Effect of essential oils or Avilamycin on microbial, histological and molecular-biological parameters of gut health in weaned piglets, 4. BOKU Symposium Tierernährung, 27. Oktober 2005 Wien.

Krüger M, 2005: Beeinflussung der Magen-Darm-Flora von Schweinen und deren immunologischen Folgen. *Nutztierpraxis Aktuell* 48-53.

Kuo S, 2002: Flavonoids and gene expression in mammalian cells. *Adv Exp Med Biol* 505, 191-200.

Lambert JD, Yang CS, 2003: Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res* 523-524, 201-208.

Lampe JW, 1999: Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr* 70, 475-490.

Langhout DJ, Schutte JB, Van Leevwen F, Wiebenga J, Tamminga S, 1999: Effect of dietary high and low methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestine wall of broiler chicks. *Brit Poult Sci* 40, 340-347.

Lauronen J, Pakarinen MP, Kuusanmaki P, Savilahti E, Vento P, Paavonen T, Halttunen J, 1998: Intestinal adaptation after massive proximal small-bowel resection in the pig. *Scand J Gastroenterol* 33, 152-8.

Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA, 2002: Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2, 787-95.

Li DF, Nelssen JL, Reddy PG, Blecha F, Klemm R, Goodband RD, 1991: Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J Anim Sci* 69, 4062-9.

Liebich, 1999: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer Verlag, Stuttgart.

Lin JK, Liang YC, Lin-Shiau SY, 1999: Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade. *Biochem Pharmacol* 58, 911-5.

Linden MD, Torres FX, Kubus J, Zarbo RJ, 1992: Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 97, 4-13.

Lindl T, Bauer J, 1994: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählter Methoden und Anwendungen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* 25, 402-408.

Löffler G, Petrides PE, 2003: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag, Berlin.

Löffler K, 1994: *Anatomie der Haustiere*, Ulmer Verlag, Stuttgart.

Lui X, Zou H, Slaughter C, Wang X, 1997: DFF, a heterodimeric protein that functions downstreams of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.

Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ, 2002: Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem* 50, 7731-7.

Mazza G, 1995: Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35, 341-71.

McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuckermann FA, Gaskins HR, 1999: Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr* 129, 613-9.

McCracken BA, Gaskins HR, Ruwe-Kaiser PJ, Klasing KC, Jewell DE, 1995: Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. *J Nutr* 125, 2838-45.

Mei J, Xu R, 2005: Transient changes of transforming growth factor- $\beta$  expression in the small intestine of pig in association with weaning. *Br J Nutr* 93, 37-45.

Mekbungwan A, Yamauchi K, 2004: growth performance and histological intestinal alterations in piglets fed dietary raw and heated pigeon pea meal. *Histol Histopathol* 19, 381-389.

Middleton Jr E, Kandaswami Ch, Theoharis C, 2000: The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 52, 673-751.

Miller BG, Whittemore C, Stokes CR, Telemo E, 1994: The effect of delayed weaning on the development of oral tolerance to soya-bean protein in pigs. *Br J Nutr* 71, 615-25.

Miller BG, Newby TJ, Stokes CR, Hampson DJ, Brown PJ, Bourne FJ, 1984: The importance of dietary antigen in the cause of postweaning diarrhea in pigs. *Am J Vet Res* 45, 1730-3.

Mowat AM, 2003: Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-41.

Murakami Y, Sekiya T, 1998: Accumulation of genetic alterations and their significance in each primary human cancer and cell line. *Mutat Res* 400, 421-37.

Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW, Lin G, 1996: Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 54, 45-55.

Ness AR, Powles JW, 1997: Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review. *Int J Epidemiol* 26, 1-13.

Otten W, 2002, Die Trennung von der Mutter kann Ferkel krank machen. Informationsdienst Wissenschaft online.

Peterek S, 2004: Phenolische Inhaltsstoffe der Birne und ihre Bedeutung in der Resistenz gegen den Feuerbrand. Dissertation, Technische Universität München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Fachgebiet für Obstbau.

Petkevicius S, Bach Knudsen KE, Murrell K, 2003: Effects of *Oesophagostomum dentatum* and dietary carbohydrates on morphology of the large intestine of pigs. *Vet Parasitol* 116, 125-38.

Philpott M, Ferguson LR, 2004: Immunonutrition and cancer. *Mutant Res* 551, 29-42.

Pie S, Lalles JP, Blazy F, Laffitte J, Sebe B, Oswald IP, 2004: Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134, 641-647.

Pluske JR, Thompson MJ, Atwood CS, Bird PH, Williams IH, Hartmann PE, 1996: Maintenance of villus height and crypt depth, and enhancement of disaccharide digestion and monosaccharide absorption, in piglets fed on cows' whole milk after weaning. *Br J Nutr* 76, 409-22.

Polster J, Dithmar H, Feucht W, 2003: Are histones the targets for flava-3-ols (catechins) in nuclei? *Biol Chem* 384, 997-1006.

Prgomet C, Sarikaya H, Bruckmaier RM, Pfaffl MW, 2005: Short-term effects on pro-inflammatory cytokine, lactoferrin and CD14 mRNA expression levels in bovine immunoseparated milk and blood cells treated by LPS. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 317-24.

Recht J, 2005, Einfluss Seltener Erden in Verbindung mit phytoenen Zusatzstoffen auf Leistungsparameter beim Ferkel. Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Roitt IM, Brostoff J, Male DK, 1995: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Romeis B, 1989: Mikroskopische Technik, Leibniz Verlag, München.

Ruemmele FM, Seidman EG, Lentze MJ, 2002: Regulation of intestinal epithelial cell apoptosis and the pathogenesis of inflammatory bowel disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34, 254-60.

Sakagami H, Takeda M, Sugaya K, Omata T, Takahashi H, Yamamura M, Hara Y, Shimamura T, 1995: Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Anticancer Res* 15, 971-4.

Sanchez-Rabaneda F, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Viladomat F, Bastida J, Codina C, 2004: Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18, 553-63.

Scalbert A, Williamson G, 2000: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073-2085.

Schmittgen TD, 2001: Real time quantitative PCR. *methods* 25, 383-385.

Sehm J, Polster J, Pfaffl MW, 2005: Effects of varied EGCG and (+)-Catechin concentrations on pro-inflammatory cytokines mRNA expression in ConA stimulated primary white blood cell cultures. *J Agric Food Chem* 53, 6907-6911.

Sehm J, Lindermayer H, Dummer C, Pfaffl MW: The influence of polyphenol rich apple pomace or red wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* in press.

Sehm J, Lindermayer H, Meyer HHD, Pfaffl MW: The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs. *Anim Sci.* Accepted.

Sehm J, Treutter D, Lindermayer H, Pfaffl MW: The influence of normal, apple pomace added and red wine pomace added diet on blood parameters and faces in piglets. *Anim Feed Sci Technol.* in Vorbereitung.

Shaulian E, Karin M, 2001: AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 20, 2390-400.

Shrikhande AJ, 2000: Wine by-products with health benefits. *Food Re Int* 33, 469-474.



Sigma Stat, User's Manual, Jandel Scientific Software, USA, 1995, Version 5.0.

Da Silva Porto P, Laranjinha J, de Freitas V, 2003: Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: structure/activity relationships. *Biochem Pharmacol* 66, 947-954.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM, 1997: Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11, 287-313.

Spencer JP, 2003: Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J Nutr* 133, 3255-3261.

Stadnyk AW, 1994: Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 8, 1041-7.

Santos-Buelga C, Scalbert A, 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agr* 80, 1094-1117.

Steinmetz KA, Potter JD, 1996: Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc* 96, 1027-39.

Stoll, *Der Apfel*, 1997, Verlag Negiri, Zürich.

Suganuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, Fujiki H, 2000: Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF-alpha expression. *Biofactors* 13, 67-72.

Tang M, Laarveld B, Van Kessel AG, Hamilton D, Estrada A, Patience JF, 1999: Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *J Anim Sci* 77, 3191-200.

Treutter D, 1989: chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J Chromatogr* 467, 185-193.

Vente-Spreuwerberg MAM, Verdonk JMAJ, Verstegen MWA, Beynen AC, 2003: Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Br J Nutr* 90, 907-13.

Visek WJ, 1978: The mode of growth promotion by antibiotics. *J Anim Sci* 46, 1447-1469.

Wang C, Li Z, Fu M, Bouras T, Pestell RG, 2004: Signal transduction mediated by cyclin D1 from mitogens to cell proliferation: a molecular target with therapeutic potential. *Cancer Treat Res* 119, 217-3.

Watzl B, Leitzmann C, „Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln“, Hippokrates Verlag, 1999.

Watzl B, Rechkemmer G, 2001: Flavonoide, *Ernährungs-Umschau* 48, 498-502.

Weinstatistik, 1999; [www.deutscheweine.de](http://www.deutscheweine.de).

Wiese F, Simon O, Weyrauch KD, 2003: Morphology of the small intestine of weaned piglets and a novel method for morphometric evaluation. *Anat Histol Embryol* 32, 102-9.

Willett WC, 2002: Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science* 296, 695-8.

Witte W, 1999: Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl A, 1-9.

Wolfe K, Wu X, Liu R H, 2003: Antioxidant activity of fresh peels. *J Agric Food Chem* 51, 253-256.

Woods RK, Walters EH, Raven JM, Wolfe R, Ireland PD, Thien FC, Abramson MJ, 2003: Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. *Am J Clin Nutr* 78, 414-21.

Yang CS, Maliakal P, Meng X, 2002: Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 25-45.

Yasar S, Forbes JM, 1999: Performance and gastro-intestinal response of broiler chicks fed on cereal grain-based foods soaked in water. *Bri Poult Sci* 40, 65-67.

Zijstra RT, Whang KY, Easter RA, Odle J, 1996: Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. *J Anim Sci* 74, 2948-2959.

Zijlstra RT, Donovan SM, Odle J, Gelberg HB, Petschow BW, Gaskins HR, 1997: Protein-energy malnutrition delays small intestinal recovery in neonatal pigs infected with rotavirus. *J Nutr* 127, 118-127.

Zhang JM, Wie Q, Zhao X, Paterson BM, 1999: Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *The EMBO journal* 18, 926-33.

Zhao Y, Liu J, Wang J, Wang L, Yin H, Tan R, Xu Q, 2004: Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF-alpha production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J Pharm Pharmacol* 56, 775-82.

Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR, 2001: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92, 57-70.

**ANHANG****Lebenslauf**

Julia Maria Sehm, geb. Herzig

Geburtsdatum 14. Juli 1978  
 Geburtsort Freising  
 Familienstand verheiratet  
 Kind Johanna 11. Juni 2005

**Ausbildung:**

08/1985 – 08/1987 Grundschule Sankt Georg in Freising  
 08/1987 – 08/1989 Grundschule Sankt Korbinian in Freising  
 08/1989 – 08/1998 Josef-Hofmiller-Gymnasium in Freising  
 Abschluss mit dem Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife  
 11/1998 – 10/2002 Studium der Agrarwissenschaften an der TUM  
 Abschluss: Diplomagraringenieurin Univ/  
 Seit 11/2002 Doktorand, Physiologie, TUM-Weihenstephan

**Praktikum:**

06/1998 - 10/1998 Ringenberg, Feldhof, Obstbaubetrieb  
 03/1999 - 04/1999 Versuchsstation Thalhausen TUM, Schwerpunkt  
 Schweinehaltung

**bisherige Arbeitstellen (ausschließlich Praktikumsstellen):**

03/2000 – 05/2000 wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Tierzucht  
 03/2001 – 10/2003 wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Physiologie  
 07/2003 – 06/2005 Forschung im Rahmen des Projektes „Stimulation der körpereigenen Immunabwehr: Effekte von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf das Immunsystem“ (Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494) als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Physiologie

## **Betreute Arbeiten**

### **Großpraktika:**

Katrin Beerbaum: Auswirkungen von Catechin und EGCG auf die Genexpression

Christian Biegel: Etablierung und Validierung einer Hochdurchsatz qRT-PCR:  
Quantitative Bestimmung pro-inflammatorischer Genexpression in Ferkelgeweben

Marco Nörenberg: Auswirkungen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf die Morphologie des Schweinedarmes

### **Seminararbeit:**

Claudia Dummer: „Auswirkungen der oralen Applikation von Apfel- und Rotweintrester auf die Morphologie des Schweinedarmes“

Vortrag: Endokrinologisch-molekularbiologisches Kolloquium, Montag, den 12.07.2004

### **Bachelor Arbeit**

Katharina Werkstetter: „Entwicklung und Optimierung einer Caspase-3 immunhistologischen Färbung in Ileum und Colon zur Messung der Apoptoserate“

Vortrag: Endokrinologisch-molekularbiologisches Kolloquium, Montag, den 12.07.2004

## Publikationen

### Originalarbeiten

Sehm J, Polster J, Pfaffl MW, 2005: Effects of varied EGCG and (+)-Catechin concentrations on pro-inflammatory cytokines mRNA expression in ConA stimulated primary white blood cell cultures. *J Agric Food Chem* 53, 6907-6911.

Sehm J, Lindermayer H, Dummer C, Pfaffl MW: The influence of polyphenol rich apple pomace or red wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* in press.

Sehm J, Lindermayer H, Meyer HHD, Pfaffl MW: The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs. *Anim Sci.* Accepted.

Sehm J, Treutter D, Lindermayer H, Pfaffl MW: The influence of normal, apple pomace added and red wine pomace added diet on blood parameters and faces in piglets. *Anim Feed Sci Technol.* in Vorbereitung.

Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW: Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* in press.

Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M, Plitzner C, Windisch W: Influence of essential oils or Avilamycin on gut morphology and blood parameters of weaned piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* in Vorbereitung.

Kroismayr A, Sehm J, Pfaffl M, Windisch W: m-RNA expression of inflammatory and apoptotic genes in weaned piglets fed with essential oils or Avilamycin. *J Anim Physiol Anim Nutr.* in Vorbereitung.

**Abstracts und Poster**

Herzig J, Polster J, Pfaffl M.W: Immune stimulation of primary white blood cells cultured with two types of Catechins at different time points. – In: Abstractband der “1<sup>st</sup> International Conference on Polyphenols and Health”, Vichy, France, 18-21.11.2003, Abstr. No. P164.

Herzig J, Dummer C, Pfaffl MW: "An apple a day keeps the doctor away!" Influence of different flavanol rich feeding regimens on the villi and crypt morphology in jejunum, ileum, and colon of young piglets. – In: Abstractband der “XXII International Conference on Polyphenols”, University of Helsinki, Finland, 25.-28.08.2004, 11-12, Abstr. No. P375.

Herzig J, Pfaffl MW: Effects of immune stimulation on expression of pro-inflammatory factors in primary white blood cells cultured with various concentrations of EGCG or (+)-catechin. – In: Abstractband der XXII International Conference on Polyphenols, University of Helsinki, Finland 25.-28.08.2004, 469-470.

Kroismayr A, Sehm J, Mayer H, Schreiner M, Foissy H, Wetscherek W, Windisch W: Effect of essential oils or Avilamycin on microbial, histological and molecular-biological parameters of gut health in weaned piglets. In: Abteilung Tierische Lebensmittel, Tierernährung und Ernährungsphysiologie, BOKU Wien: 4. Boku-Symposium Tierernährung, 27.10.2005, Universität für Bodenkultur Wien.

Kroismayr A, Sehm J, Pletzner C, Windisch, W: Effect of an essential oil blend (oregano, anis, citrus peels) or Avilamycin on growth performance, microbiological and histological parameter, and mRNA expression of inflammatory and apoptotic genes in the gut of weaned piglets. In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology: Gesellschaft für Ernährungsphysiologie, 21.-23.03.2006, Göttingen.

## **Angehängte Publikationen**

Sehm J, Polster J, Pfaffl MW, 2005: Effects of varied EGCG and (+)-Catechin concentrations on pro-inflammatory cytokines mRNA expression in ConA stimulated primary white blood cell cultures. *J Agric Food Chem* 53, 6907-6911.

Sehm J, Lindermayer H, Dummer C, Pfaffl MW: The influence of polyphenol rich apple pomace or red wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr.* in press.

Sehm J, Lindermayer H, Meyer HHD, Pfaffl MW: The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs. *Anim Sci.* Accepted.

Sehm J, Treutter D, Lindermayer H, Pfaffl MW: The influence of normal, apple pomace added and red wine pomace added diet on blood parameters and faces in piglets. *Anim Feed Sci Technol.* in Vorbereitung.



## Effects of Varied EGCG and (+)-Catechin Concentrations on Proinflammatory Cytokines mRNA Expression in ConA-Stimulated Primary White Blood Cell Cultures

JULIA SEHM,<sup>†</sup> JÜRGEN POLSTER,<sup>§</sup> AND MICHAEL W. PFAFFL<sup>\*,†</sup>

Lehrstuhl für Physiologie–Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL), and Department für Biowissenschaftliche Grundlagen, Fachgebiet Physikalische Chemie (Lehrstuhl für Biologische Chemie), Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW), Technische Universität München (TUM), D-85350 Freising, Germany

EGCG [(–)-epigallocatechin gallate] and (+)-catechin hydrate are flavanoids, which are known as anticancer and healthy drugs. To test the immune modulatory effects of EGCG and catechin, various concentrations were tested on primary white blood cells (WBC) in cell cultures stimulated with the T-cell mitogen concanavalin A (ConA). WBC from dairy cows ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were cultivated using RPMI medium with FCS and gentamycin. First, WBC were stimulated with ConA, and 6 h later the flavanoid treatment was started. Cultivated WBC were treated with various physiological flavanol concentrations (0–100  $\mu$ M) in cross-combination with various ConA concentrations (0–1  $\mu$ g/mL). After 24 h, cells were harvested, cell viability was verified, and total RNA was isolated. Relative mRNA expression levels of proinflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, and transcription factor cFos and of nucleosome component histon H3 were quantified with real-time qRT-PCR. High EGCG and catechin concentrations had inhibitory effects on total RNA expression. Low EGCG concentration can induce total RNA expression in WBC. EGCG reduced cFos mRNA expression, which can be abolished by high ConA concentrations in a reverse dose-dependent manner. TNF $\alpha$  showed a flavanoid-specific expression pattern. EGCG acts in blood physiological concentrations (micromolar range), and catechin acts in higher gut-relevant concentrations (millimolar range) and has the potential to influence the proinflammatory TNF $\alpha$  expression. Higher flavanoid concentration had more pronounced effects than lower, whereas EGCG showed a more potent suppression of gene expression than catechin (toward TNF $\alpha$ ). EGCG and catechin had no significant effects in primary WBC on the expression pattern of the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL6 and on the expression of the housekeeping genes GAPDH and histon H3. It is presumed that both flavanoids have the potential to regulate total RNA expression and gene-specific expression in WBC.

**KEYWORDS:** Catechin; EGCG; real-time RT-PCR; proinflammatory cytokines; ConA; GAPDH; TNF $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; IL-6; cFos; histon H3

## INTRODUCTION

Over the past decades, there has been an increasing awareness of the potential health benefits of phytochemicals in foods and beverages, particularly in tea. After water, tea is the world's most consumed beverage, existing in three major forms (green, black, and oolong tea) with different chemical compositions. Green tea is widely consumed and contains polyphenolic compounds, which account for up to 30–42% of the dry weight of leaves (1, 2). Also, food onions and apples contain large amounts of flavonoids (3). A subclass of flavonoids are the

flavanoids. Typical representatives are catechin, epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG), and epigallocatechin-3 gallate (EGCG). The physiological concentration of flavanoids in plasma is found to be up to 1  $\mu$ M (1, 4); in the gut it is much higher ( $\sim$ 3 mM; 5).

Green tea components have shown remarkable anti-inflammatory and cancer chemopreventive effects in many animal tumor bioassays, cell culture systems, and epidemiological studies. Animal models observed that green tea has preventive activity against cancer of the oral cavity, esophagus, stomach, intestine, colon, liver, lung, prostate, skin, and others (1). Many of these biological effects of green tea are mediated by EGCG, the major flavanol present therein. Further flavonoids exhibit antimicrobial, antioxidative, antithrombosis, immune-modulated, anti-inflammatory, blood pressure dropping, and blood-glucose-

\* Author to whom correspondence should be addressed (telephone +49-8161-713511; fax +49-8161-714204; e-mail michael.pfafl@wzw.tum.de).

<sup>†</sup> Lehrstuhl für Physiologie–Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL).

<sup>§</sup> Department für Biowissenschaftliche Grundlagen, Fachgebiet Physikalische Chemie (Lehrstuhl für Biologische Chemie).

level dropping effects (6). However, the EGCG treatment effects are complex in different tissues, for example, in cancer cells as compared to healthy primary cells (7). In several cancer cell lines cancer apoptosis is increased, whereas in healthy alive cells it is not (7). The fundamental mechanism of differential response to EGCG is not yet known in detail. Up to now, mainly studies in cell lines, carcinoma cell lines, or immortalized cell lines are shown in the literature, having all cancer or artificial attributes.

In this study primary white blood cells (WBC) cultured with various EGCG or catechin concentrations were used, taking physiological treatment concentrations into account. Primary leukocytes demonstrate an appropriate model to study the effects of flavanoids on the regulation of inflammatory cytokines in the immune system.

## MATERIALS AND METHODS

**White Blood Cell Isolation and Culture.** Blood was taken from the jugular vein of a healthy dairy cow. Coagulation was prevented by the addition of 0.5 mL of EDTA per 25 mL of total blood. For WBC separation 25 mL of sampled blood was mixed with 25 mL of lysis buffer (0.83 g of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3.7 mg of Na-EDTA, and 1 g of KCl in 100 mL, pH 7.4) and centrifuged for 10 min at 2000 rpm. The cell pellet was resuspended in 25 mL of lysis buffer and centrifuged; this was repeated three times. After centrifugation, remaining WBC were suspended in RPMI medium (Sigma, Steinheim, Germany) with 10% FCS (Gibco, Carlsbad, CA) and 0.1% gentamycin (Selectavet, Weyam-Holzolling, Germany). A viability test with trypan blue was made before cultivation. The cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/mL in 12-well plates in 3 mL of medium per well. The cells were maintained at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  in a humid environment for 2 days.

**Treatment.** Two days after seeding in 12-well plates, WBC were first stimulated with different concentrations of ConA (0, 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of medium). After a further 6 h, the WBC were treated with (–)–EGCG (95% purified and extracted from green tea; Sigma-Aldrich) or catechin (Sigma-Aldrich). The six different concentrations of EGCG or (+)–catechin were 0 (control), 0.1, 1, 10, 30, and 100  $\mu\text{M}$  in the medium. Each flavanol concentration was tested with each ConA in five repeats, in total, 240 cell culture wells. After 24 h of ConA treatment, the cells were harvested and total RNA was isolated.

**RNA Isolation and cDNA Synthesis.** Total RNA of leukocytes was isolated using TriFast (Roche Diagnostics, Basle, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. To quantify the extracted RNA concentration, the optical density was determined in triplicates at three different dilutions of the final total RNA preparations at 260 nm. RNA integrity was verified by the optical density  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  absorption ratio  $> 1.70$ . Additionally, the RNA quantity and quality were checked in the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Synthesis of cDNA was performed with reverse transcriptase (MMLV H minus RT, Promega, Madison, WI) and random hexamer primers (MBI Fermentas, St Leon-Rot, Germany) according to the manufacturer's instructions with 1000 ng of total RNA in 40  $\mu\text{L}$  of RT reaction buffer.

**Relative Quantification by Real-Time PCR.** Relative quantification of cDNA (respectively, mRNA) was carried out with the LightCycler (Roche Diagnostics). Reverse transcribed 25 ng of cDNA in a 1  $\mu\text{L}$  volume was used as PCR template. Further reaction components for the qPCR reactions were 1.2  $\mu\text{L}$  of  $\text{MgCl}_2$  (4 mM), 0.2  $\mu\text{L}$  of forward or reverse primer (0.4  $\mu\text{M}$ ; Table 1) synthesized by MWG (Ebersberg, Germany), 1.0  $\mu\text{L}$  of LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), and water up to a final volume of 10  $\mu\text{L}$ . Before amplification, an initial denaturation step (10 min at 95 °C) was performed to ensure complete denaturation of the cDNA. Quantitative PCR was performed with 40 cycles and a product-specific annealing temperature, as shown in Table 1. The crossing points (CP) were acquired with the "second derivative maximum" method (LightCycler Software, Roche Diagnostics). Amplification PCR products underwent a melting curve analysis after the last cycle to specify the integrity of amplification, and finally a cooling step was performed. A relative

**Table 1.** Annealing Temperature of the Used Forward and Reverse Primers

factor	annealing temp (°C)	primer
GAPDH	60	forward: GTC TTC ACT ACC ATG GAG AAG G reverse: TCA TGG ATG ACC TTG GCC AG
cFos	59	forward: ACT CCA GGC GGA GAC AGA reverse: GGT GAA GGC CTC CTC AGA
TNF $\alpha$	62	forward: TAA CAA GCC GGT AGC CCA CG reverse: GCA AGG GCT CTT GAT GGC AGA
IL1 $\beta$	60	forward: TTC TCT CCA GCC AAC CTT CAT T reverse: ATC TGC AGC TGG ATG TTT CCA T
IL6	60	forward: ATG AAT CCC GCT TCA CAA GCG C reverse: CCG AAT AGC TCT CAG GCT GAA CTG
histon H3	60	forward: ACT GGC TAC AAA AGC CGC TC reverse: ACT TGC CTC CTG CAA AGC AC

quantification was performed, using GAPDH as a housekeeping gene and the following target genes (Table 1). The CP of target gene expression were standardized by the CP derived from GAPDH mRNA expression, according to the  $\Delta\Delta\text{CP}$  method (8, 9), described in the following equation:

$$\Delta\text{CP}_{(\text{GAPDH}-\text{target gene})} = \text{CP}_{(\text{GAPDH})} - \text{CP}_{(\text{target gene})}$$

Each  $\Delta\text{CP}$  data point was standardized within one target gene by the aid of the mean expression CP of the control group ( $\text{CP}_{(\text{control})} =$  nontreated with ConA and nontreated with catechin or EGCG):

$$\Delta\Delta\text{CP} = \text{CP}_{(\text{control})} - \Delta\text{CP}_{(\text{GAPDH}-\text{target gene})}$$

Positive  $\Delta\Delta\text{CP}$  values represent an up-regulation and negative  $\Delta\Delta\text{CP}$  values a down-regulation of the described mRNA gene expression, compared to the control group.

**Statistical Evaluations.** Statistical analysis was made with Sigma Stat 2.03 (10). Means were compared with two-way ANOVA (polyphenol concentration and ConA concentrations). Values of  $p < 0.05$  were considered to be significant. The significance of EGCG or catechin treatment groups was compared to the untreated control within the corresponding ConA treatment group.

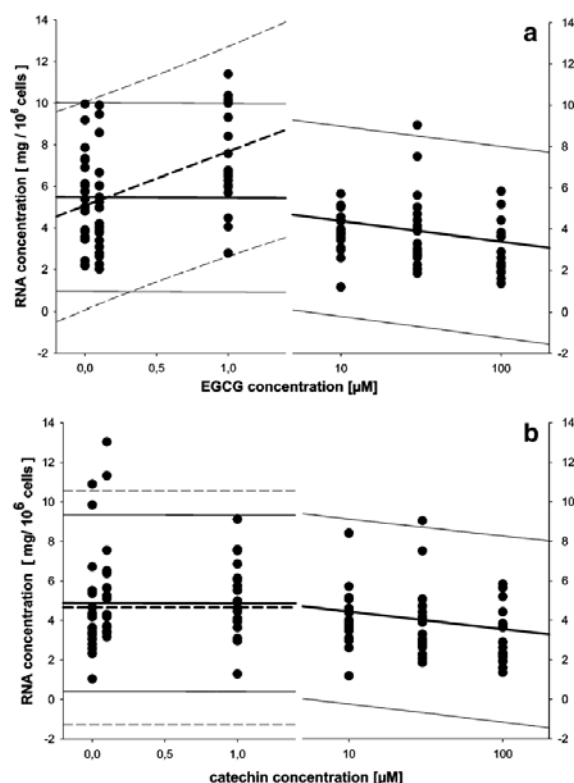
## RESULTS

The viability of the freshly isolated and the 24 h cultured WBC, determined by trypan blue staining, ranged between 88 and 96% ( $n = 240$ ), and the variation was constant over all treatment groups. Extracted total RNA concentrations were not influenced by ConA treatment [in the presence of catechin ( $p = 0.069$ ) or EGCG ( $p = 0.246$ )]. The two polyphenol treatments with EGCG and catechin decreased the total RNA concentrations in the WBC per well, regardless of various ConA stimulations as shown in regression analysis. However, the two polyphenol treatments, EGCG ( $p < 0.001$ ) and catechin ( $p < 0.005$ ), decreased the RNA concentrations in the WBC regardless of the various ConA stimulations (Figure 1). The slope of linear regression showed a higher and more significant decrease of extracted total RNA with EGCG-treated WBC than with catechin-treated WBC (in Figure 1, x-axis is shown in log-scale):

$$\text{total RNA concn}_{[\text{EGCG treatment}]} = 5.48 - 0.029 \times x \mu\text{M EGCG [mg of RNA}/10^6 \text{ cells]} (p < 0.001)$$

$$\text{total RNA concn}_{[\text{catechin treatment}]} = 4.88 - 0.013 \times x \mu\text{M catechin [mg of RNA}/10^6 \text{ cells]} (p < 0.005)$$

However, analyzing only the flavanol concentrations up to 1  $\mu\text{M}$  (dotted regression lines in Figure 1), for catechin the

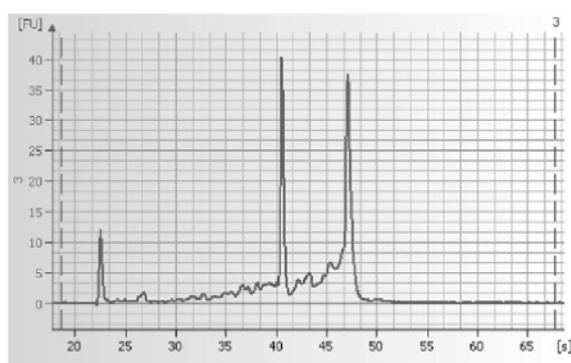


**Figure 1.** Total RNA concentration in  $\text{mg}/10^6$  WBC stimulated with ConA and with six different EGCG (a) or catechin (b) concentrations (each group  $n = 20$ , presented in log-scale). Linear regression with 95% prediction interval is shown. The linear regression analysis of all six investigated flavanoid concentrations (solid regression lines) indicates a reduction of the total RNA content both for EGCG ( $p < 0.001$ ) and catechin ( $p < 0.005$ ). The linear regression analysis of the three low flavanoid concentrations (dotted regression lines) remained unchanged for catechin, but for EGCG an increase in total RNA concentrations could be shown ( $p < 0.01$ ).

decreasing trend remained unchanged, but for EGCG a new significant trend could be seen. For low EGCG concentrations an induction of total RNA gene expression was observed ( $p < 0.01$ ).

Furthermore, the RNA quality was verified by a capillary electrophoresis with the Bioanalyzer 2100 on a microchip lab-on-chip system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The RNA integrity number (RIN) recently developed by Müller et al. (11) and determined by the Bioanalyzer software (Agilent Technologies) showed average RINs between 7.5 and 9.0 (RIN range between 1 and 10; RIN 1 for degraded RNA, RIN 10 for a perfect and intact total RNA). An electropherogram is shown in **Figure 2** with a characteristic total RNA profile, isolated from WBC, representing an internal reference peak (22 s), a small 5S RNA peak (27 s), a dominant 18S RNA peak (41 s), and a dominant 28S RNA peak (47 s). Thus, the extracted and analyzed total RNA from WBC was fully intact and of high quality.

All tested genes were abundant and showed single peaks in melting curve analysis (LightCycler software) and a single band in high-resolution 4% agarose gel electrophoresis (gels not shown). The housekeeping gene GAPDH mRNA expression remained constant during the entire study and was not affected by either the ConA ( $p = 0.130$ ) or the flavanoid treatments ( $p = 0.280$ ).



**Figure 2.** Electropherogram of total RNA (typical for these probes) ( $178 \text{ ng}/\mu\text{L}$  total RNA; RIN = 7.9; ratio 28 s/18 s = 1.4). The characteristic total RNA profile represents an internal reference peak (22 s), a small 5S RNA peak (27 s), a dominant 18S RNA peak (41 s), and a dominant 28S RNA peak (43 s). ([FU] = fluorescence unit, s = seconds, 3 stands for the third probe on the chip.)

The expression pattern of cFos mRNA was similar in all treatment groups (**Figure 3**). However, high EGCG concentrations caused a down-regulation of cFos mRNA expression ( $p < 0.001$ ), which was more pronounced in low ConA concentrations than in high ones. High ConA concentrations up to  $1 \mu\text{g}$  of ConA/mL of medium diminished dose-dependently the cFos down-regulation of EGCG. Thus, ConA treatment leads to a dose-dependent gene expression. EGCG treatment showed high-reduced cFos mRNA expression in the ranges of 30 and  $100 \mu\text{M}$ . The catechin treatment caused a slight down-regulation of cFos mRNA expression ( $p < 0.05$ ).

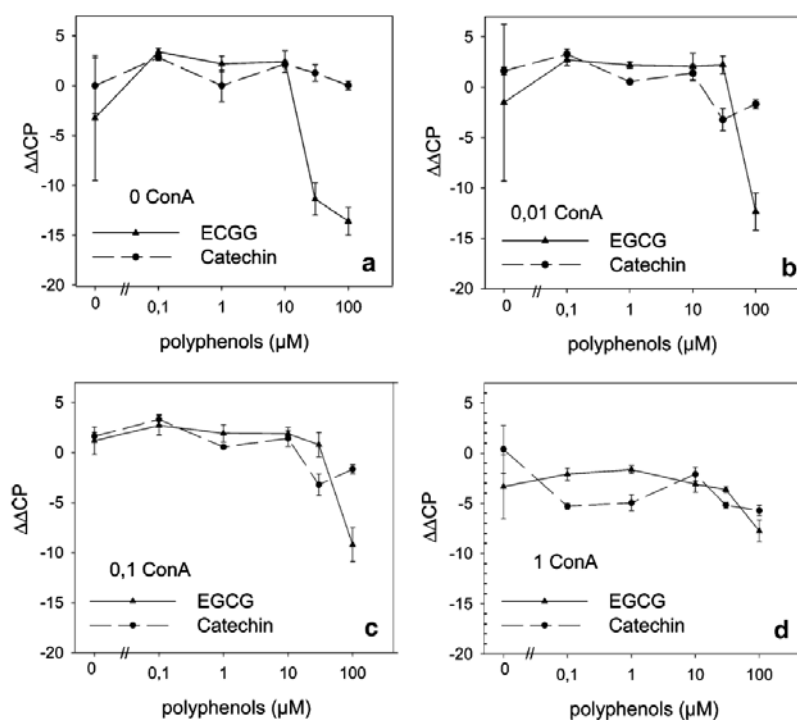
TNF $\alpha$  showed a flavanoid-specific expression pattern (**Table 2**). Catechin showed an up-regulated effect on the TNF $\alpha$  mRNA expression ( $p < 0.05$ ), especially in low ConA treatment groups. EGCG enhanced TNF $\alpha$  expression only in the blood physiological concentrations up to  $1 \mu\text{M}$ ; beyond, it depended on the ConA stimulation. The effect was more pronounced in groups with lower ConA stimuli. The high ConA concentrations overlay the effects derived from EGCG or catechin.

The IL6 and IL1 $\beta$  expressions level were not influenced by the flavanoid treatments (data not shown). The expression profiles remained unchanged. ConA had here only minor effects on the induction or repression of the gene expression in investigated primary bovine WBC culture.

The histon H3 mRNA level was very stably expressed and independent of flavanoid or ConA treatment (data not shown). In this study the mRNA level of histon H3 and that of GAPDH were the most stably expressed genes and are obviously appropriate candidates for housekeeping genes.

## DISCUSSION

Flavanoids in tea are known as anticancer, immune modulatory, and anti-inflammatory drugs (6). The ingredients of red wine (the "French paradox") and of green tea moved more and more into the focus of research. Leukocytes play a central role in the immune system; therefore, the used primary WBC culture is an appropriate model to study the effects on the immune system and the regulation of mRNA expression of proinflammatory cytokines. Here, the immune modulatory effects of EGCG and catechin were tested in various physiological (in plasma, up to  $1 \mu\text{M}$ ; 1, 4) and higher concentrations. To mimic an immune stimulus, WBC cultures were stimulated with the superantigen and T-cell antigen ConA. In earlier studies



**Figure 3.** Effects of EGCG and catechin stimulation on cFos mRNA expression. WBC were preincubated for 6 h with 0 (a), 0.01 (b), 0.1 (c), or 1 (d)  $\mu\text{g}$  of ConA/mL of medium and then treated with 0.1, 1, 10, 30, and 100  $\mu\text{M}$  EGCG or catechin. The mRNA expression was quantified with RT-PCR and standardized with the housekeeping GAPDH and with the mean of the group without ConA and without catechin ( $n = 6$ ; mean  $\pm$  sem). The x-axes are log-scaled.

**Table 2.** Effects of EGCG and Catechin Stimulation on TNF $\alpha$  mRNA Expression, Shown in  $\Delta\Delta\text{CP}$  Values<sup>a</sup>

$\Delta\Delta\text{CP}$ ( $\mu\text{M}$ )	0 $\mu\text{g/mL}$ ConA		0.01 $\mu\text{g/mL}$ ConA		0.1 $\mu\text{g/mL}$ ConA		1 $\mu\text{g/mL}$ ConA	
	catechin	EGCG	catechin	EGCG	catechin	EGCG	catechin	EGCG
0	0.00 $\pm$ 0.44	1.42 $\pm$ 1.82	0.91 $\pm$ 0.85	1.77 $\pm$ 1.77	0.76 $\pm$ 1.14	1.89 $\pm$ 0.80	2.00 $\pm$ 1.37	2.60 $\pm$ 1.45
0.1	0.46 $\pm$ 0.34	3.56 $\pm$ 0.31**	0.99 $\pm$ 0.54	3.69 $\pm$ 0.68**	1.22 $\pm$ 0.57	3.06 $\pm$ 0.39**	2.16 $\pm$ 0.36	1.09 $\pm$ 0.30*
1	2.76 $\pm$ 1.56***	-0.17 $\pm$ 0.36*	1.65 $\pm$ 0.52	0.37 $\pm$ 0.71	2.14 $\pm$ 1.33	-0.38 $\pm$ 0.72***	2.23 $\pm$ 0.41	1.88 $\pm$ 0.37
10	2.24 $\pm$ 0.34**	2.11 $\pm$ 0.53	1.64 $\pm$ 0.85	2.21 $\pm$ 1.02	3.33 $\pm$ 0.39***	1.85 $\pm$ 0.44	2.52 $\pm$ 0.17	2.33 $\pm$ 0.60
30	2.48 $\pm$ 1.06***	1.04 $\pm$ 0.42	2.73 $\pm$ 0.34**	3.41 $\pm$ 0.68*	2.21 $\pm$ 1.06	3.30 $\pm$ 0.89	2.32 $\pm$ 0.56	3.08 $\pm$ 0.62
100	3.27 $\pm$ 0.54***	1.08 $\pm$ 0.38	4.03 $\pm$ 0.57***	0.55 $\pm$ 0.30	2.03 $\pm$ 0.55	1.66 $\pm$ 0.63	3.18 $\pm$ 0.59	3.89 $\pm$ 0.46

<sup>a</sup> Positive values indicate an up-regulation and negative values a down-regulation. WBC were preincubated for 6 h with 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{g}$  of ConA/mL of medium and then treated with 0.1, 1, 10, 30, and 100  $\mu\text{M}$  EGCG or catechin ( $n = 5 \pm$  SEM). An asterisk indicates significance between polyphenols treatment and control (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

catechins showed stimulatory effects in cell culture and in vivo experiments (7). One general question is whether catechins induce or inhibit gene expression and, therefore, prevent or inhibit cells in their proliferation rate and growth. EGCG and a few flavanoids have been shown to inhibit the growth and induce cell cycle arrest and apoptosis in different cancer cell lines (12).

Flavanoids such as EGCG and catechin extracted from green tea stimulated WBC cultures from cattle in different ways. Higher applied EGCG and catechin concentrations decreased the total RNA expression level with high significance. The inhibitory effect is more pronounced with EGCG than with catechin (Figure 1, solid regression lines). Low EGCG concentrations ( $< 1 \mu\text{M}$ ) as found in the blood had a stimulatory effect on RNA expression, whereas catechins did not influence the total RNA expression levels (dotted regression line). Therefore, it is a matter of EGCG concentration how the total gene expression is regulated. These findings are a hint that high flavanoid concentrations, as occurring in gut epithelial cells (millimolar range) and in immediate neighbor cells may have

inhibitory effects on the total RNA synthesis rate and consequently on epithelial cell turnover. That can be an explanation that catechins have the described negative effects on cell growth via decreased cell proliferation.

Furthermore, the cFos expression levels were down-regulated at high EGCG treatment concentrations, whereas a catechin treatment hardly affected the cell culture gene expression. Additionally, ConA exposure induced the cFos mRNA expression in a dose-dependent manner. cFos is an early response gene and a potent transcription factor and is responsible for the induction of many inflammatory genes. The ConA treatment can abolish the reduced cFos expression through EGCG. In a recent study using a human keratinocyte cell line, EGCG reduced the cFos mRNA transcription as well (13). At high EGCG concentrations, these results correlate with the decreased total RNA cell expression, the lower cell turnover, and the anticancer effects.

TNF $\alpha$  showed a flavanoid-specific expression pattern. Expression was induced by high catechin concentrations from 10

to 100  $\mu$ M. EGCG enhances the TNF $\alpha$  expression in blood physiological ranges in the lower range (up to 0.1  $\mu$ M). Both effects were overlaid by the varied ConA concentrations, which could enhance the proinflammatory TNF $\alpha$  expression (14, 15). High flavanoid concentrations in the upper micromolar range may be found in the gut content, and therefore they might act in the gastrointestinal tract on cells exposed to it. In the literature, the effects of EGCG on TNF $\alpha$  mRNA expression are controversially discussed (16–19). TNF $\alpha$  enhances the phagocytosis and the cytotoxicity of monocytes and macrophages. In a previous study by Crouvezier and co-workers (19) primary human leukocytes were treated with ECG, EGC, and EGCG, resulting in no significant effects on TNF $\alpha$  expression, whereas stable cell lines showed inhibition of TNF $\alpha$  expression with EGCG or catechin treatment (18, 20, 21).

In primary WBC cultures EGCG and catechin had no significant effects on the expression pattern of the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL6. Ahmad et al. (7) describe different effects of flavanoids on IL1 $\beta$  gene expression on stable cell lines and primary cell cultures. In further studies ECG, EGC, and EGCG decreased the production of IL1 $\beta$  in human leukocytes (19). Both proinflammatory genes IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  reacted similarly in the studies (7, 19).

Histon genes were hardly investigated in flavanoid studies. In this study, we found unchanged and very stable histon H3 mRNA expression levels. It is still open whether EGCG might have an influence on histon H3 gene activity because EGCG binds in vitro to histon proteins, that is histon sulfate (22).

In conclusion, high EGCG and catechin concentrations had inhibitory effects on total RNA expression. Low EGCG concentrations can induce cellular total RNA content and, therefore, gene expression in general. EGCG reduced cFos mRNA expression, which can be abolished by high ConA concentrations in a reverse dose-dependent manner. TNF $\alpha$  showed a flavanoid-specific expression pattern. EGCG leads to a stimulation in blood physiological concentrations, and both flavanoids lead to an inhibition in higher gut-relevant concentrations and have the potential to influence the proinflammatory TNF $\alpha$  expression in WBC cultures. Higher flavanoid concentrations had more pronounced effects than lower, whereas EGCG showed at higher concentrations a more potent suppression of gene expression than catechin. EGCG and catechin had no significant effects in primary WBC on the expression pattern of the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL6 and on the expression of the housekeeping genes GAPDH and histon H3. We presume that both flavanoids have the potential to regulate total RNA expression and gene-specific expression in WBC. That might be an explanation for why catechins have the described negative effects on cell growth via decreased cell proliferation.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Prof. Dr. W. Feucht (Department für Pflanzenwissenschaften, WZW der TU München) for helpful discussions. This study was supported by the Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494.

#### LITERATURE CITED

- (1) Lambert, J.; Yang, Ch. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3262–3267.
- (2) Lambert, J.; Yang, Ch. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols review. *Mutat. Res.* **2003**, *523–524*, 201–208.
- (3) Sampson, L.; Rimm, E.; Hollmann, P. C.; de Vries, J. H.; Katan, M. B. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J. Am. Diet. Assoc.* **2002**, 14114–1420.
- (4) Kuo, S. Flavonoids and gene expression in mammalian cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2002**, 191–200.
- (5) Watzl, B.; Bub, A. Fruit and vegetable concentrate or vitamin supplement? *J. Nutr.* **2003**, *133* (11), 3725.
- (6) Leitzmann, C. Nutrition ecology: the contribution of vegetarian diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 657S–659S.
- (7) Ahmad, N.; Gupta, S.; Mukhktar, H. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate differentially modulates nuclear factor  $\kappa$ B in cancer cells versus normal cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 338–346.
- (8) Schmittgen, T. D. Real time quantitative PCR. *Methods* **2001**, 383–385.
- (9) Livak, K. J.; Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods* **2001**, 402–408.
- (10) *Sigma Stat. User's Manual*, version 5.0; Jandel Scientific Software: San Rafael, CA, 1995.
- (11) Müller, O.; Lightfoot, S.; Schroeder, A. *RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control*; Chip Application Note; Agilent Technologies: Palo Alto, CA, 2004.
- (12) Yang, C. S.; Maliakal, P.; Meng, X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, 25–45.
- (13) Chen, W.; Dong, Z.; Valcic, S.; Timmermann, B.; Bowden, G. Inhibition of ultraviolet B-induced c-fos gene expression and p38 mitogen-activated protein kinase activation by (–)-epigallocatechin gallate in human keratinocyte cell line. *Mol. Carcinog.* **1999**, 79–84.
- (14) Gantner, F.; Leist, M.; Lohse, A. W.; Germann, P. G.; Tiegs, G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* **1995**, *21* (1), 190–198.
- (15) Zhao, Y.; Liu, J.; Wang, J.; Wang, L.; Yin, H.; Tan, R.; Xu, Q. Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF- $\alpha$  production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56* (6), 775–782.
- (16) Sakagami, H.; Takeda, M.; Sugaya, K.; Omata, T.; Takahashi, H.; Yamamura, M.; Hara, Y.; Shimamura, T. Stimulation by epigallocatechin gallate of interleukin-1 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Anticancer Res.* **1995**, *15* (3), 971–974.
- (17) Fujiki, H.; Suganuma, M.; Okabe, S.; Sueoka, E.; Suga, K.; Imai, K.; Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- $\alpha$ , and cancer preventive agents (–)-epigallocatechin gallate and green tea—a review. *Cancer Detect. Prev.* **2000**, 91–99.
- (18) Suganuma, M.; Sueoka, E.; Sueoka, N.; Okabe, S.; Fujiki, H. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF- $\alpha$  expression. *Biofactors* **2000**, 67–72.
- (19) Crouvezier, S.; Powell, B.; Keir, D.; Yapoo, P. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine* **2001**, 280–286.
- (20) Fujiki, H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1999**, 589–597.
- (21) Choi, E.; Hwang, J. Effects of (+)-catechin on the function of osteoblastic cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, 523–526.
- (22) Polster, J.; Dithmar, H.; Feucht, W. Are histones the targets for flavan-3-ols (catechins) in nuclei? *Biol. Chem.* **2003**, 997–1006.

Received for review February 10, 2005. Revised manuscript received June 22, 2005. Accepted June 28, 2005. This study was supported by the Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494.

JF0503107

**Manuskript :**

**The influence of apple pomace or red-wine pomace rich diet on the gut morphology in weaning piglets.**

**J. Sehm<sup>1</sup>, H. Lindermayer<sup>2</sup>, C. Dummer<sup>1</sup> and M. W. Pfaffl<sup>1\*</sup>**

1 Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, D-85354 Freising, Germany.

2 Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), D-85586 Poing-Grub, Germany.

*\*Author for correspondence:*

Michael W. Pfaffl  
Lehrstuhl für Physiologie  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
Weihenstephaner Berg 3  
D-85354 Freising-Weihenstephan

Tel.: +49-8161-71 3511  
Fax: +49-8161-71 4204  
e-mail: [Michael.Pfaffl@wzw.tum.de](mailto:Michael.Pfaffl@wzw.tum.de)

**Key words:**

Apple pomace, red-wine pomace, piglets, intestinal morphology

---

**Abstract**

Most of the piglets' loss happens around weaning. Antibiotic additives in the diet help to decrease these losses. Beginning in 2006 antibiotics will be forbidden by the EU as prophylactic tool in animal diets, and it will be helpful to include other diet additives that have beneficial effects. Alternative food ingredients are discussed, e.g. probiotics, prebiotics and synbiotics, as well as secondary plant compounds, like polyphenols. In this study the effect of three different diets - normal piglets starter without additives, with apple pomace or with red-wine pomace - on the intestinal morphology was investigated from three days prior to weaning to four weeks post weaning. Villus height, crypt depth and breadth of villi and crypts were determined in the jejunum, ileum and colon in 78 piglets. Additionally the area of the peyer's patches in the ileum was measured.

In jejunum and ileum the villus length in the control group decreased after weaning but increased over the entire feeding experiment. In the two pomace groups no decrease was measured after weaning. In jejunum an increase in villi breadth occurred, 73% in the control group and approximately 10% in both treatment groups. A 35% increase was found in the ileum in all groups. Peyer's patches area increased about 20% in the control group, whereas in other groups no significant differences were found. Thus apple and red-wine pomace are shown to have inhibitory effects on the jejunum villi growth, and stimulating effects on villi length and crypt depths in colon. Apple and red-wine pomace can also reduce the GALT activation via the peyer's patches in the ileum. In conclusion, flavanoids rich feeding regimen showed positive effects on villi morphology and may be an alternative to improve pig health after the ban on antibiotics.

**Introduction**

Pigs today grow much faster than ever before, not only because the feed formulation keeps up with genetic improvement, but also through improved management practices (Bezkorovainy, 2001). In addition sub-therapeutical levels of antibiotics have been used as growth promoters. However, the use of antibiotics as feed additives is risky due to provocation of antibiotic resistance in pathogens (Bach Knudsen, 2001). The long-term use of anti-microbial growth promoters may select for resistant bacteria strains, and resistance may then be transferred to other bacteria (Aarestrup, 1999). In 2006, EU laws against prophylactic use of antibiotics in animal feed will come into effect (BMVEL, 2005). It will be useful to find other feed alternatives, which stabilize the gut environment and enhance piglet health. Many studies assume that diets change the intestinal morphology and therefore affect piglets' health (Hedemann et al., 2002; Boudry et al., 2004; Kotunia et al. 2004). However today alternative feed ingredients are discussed to support gut health, e.g. probiotics, prebiotics and synbiotics, as well as secondary plant components (Bach Knudsen, 2001, Scalbert and Williamson, 2000).

Apples and red-wine have high amounts of polyphenols and are well known as healthy drugs which can modulate gut activity (Böhm et al., 1998). The average of the total polyphenol content is 0.3 g/kg apple fresh weight (0.05 – 1.1 g/kg) (Stoll, 1997) and about 2 g/l red-wine (Scalbert and Williamson, 2000). The pomace of apples and grapes have also high concentrations of these polyphenols. The main components of polyphenols in these by-products are flavan-3-ol and proanthocyanidine (González-Paramás et al., 2004, Schieber et al., 2001).

During piglet weaning the feed changes suddenly from sow milk to pelleted dry feed. After weaning piglets often get diarrhoea (van Beers-Schreurs, 1998), resulting in less daily weight gain, higher individual support, and higher costs. “*An apple a day keeps the doctor away*” – this old saying was tested in our study, using 3.5% freeze dried apple or red-wine pomace in piglets feed. The morphology of three different segments of the intestinal tract (ileum, jejunum and colon) were investigated histologically.

Material and methods

### Experiment and sampling

In this study 78 cross breed piglets [Pietráin x (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)] were fed with three different feed compositions. The animals were housed at the experimental station Osterseeon (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft). 30 animals were fed with a control standard weaning diet (CD) (50% wheat, 23% barley, 22% soy, 1% soy oil, 4% vitamins and minerals), 24 each got additionally apple pomace (AP) or red-wine pomace (RWP), each 3.5% dry mass in total (table 1). Energy, protein, fat and starch were balanced in all three diets. The first six control pigs were slaughtered one week before weaning (day 24), then every week 6 CD pigs, 6 AP and 6 RWP feed piglets were slaughtered (figure 1). At weaning, piglets were grouped with identical age ( $31 \pm 1.8$  days), the same weight ( $7.5 \pm 1.1$  kg) and half male, half female in every group. Piglets were weighed one week before weaning (day 24), at weaning (day 31) and at live day 36, day 43 and day 50.

Pigs were killed after 26 day under treatment, by electric gripper and exsanguinated. A horizontal incision along the midline was made to open the abdominal cavity, and all the internal organs were excised. The empty bodyweight was measured. Tissue samples of 0.5 cm length were taken of the central part of the following gut compartments: jejunum, ileum, and colon. Immediately after collection, the tissue-samples were washed three times in 0.9% NaCl solution and fixed 48 h in 3.7% formalin solution. After fixation the specimen were dehydrated and embedded in paraffin using an automated embedding system (Sakura VIP 5, Digitana, Schweiz), at the LUA (Landesuntersuchungsamt, Oberschleißheim, Germany). Sections from each sample cut at 8µm thickness and stained with haematoxylin and eosin (HE) according to Mayer (Luna, 1968).

### Histomorphometry

Digital microphotographs were obtained and evaluated with a graphic program (AxioVision 3.1, Göttingen, Germany). The morphology in the intestine was measured with a Zeiss-Microscope (Axioskop 2 plus with 10x/0.30 Plan-Neofluar objective, Göttingen, Germany). Only for the measurement of the lymph follicle a Zeiss-Microscope (Stemi 2000 C, Göttingen, Germany) was used with the 2.5x objective.

The measurements of villus height and crypt depths were done on three well-orientated crypt-villus preparations for each slide. In total there were 234 (78 piglets, triplicates measurement) measurements per category (length or width) within a tissue section (jejunum, ileum, colon). The length of the villi was measured from the top of the villi to the Lamina muscularis mucosae, as shown in figure 2. The width was defined as the distance from one crypts-villi-junction to the next. Out of



these two lengths the virtual area was calculated (length x width). There are no villi in the colon, so the length was measured only from the crypts.

Peyer's patches area in the ileum were imaged and measured in triplicates (n = 234) by using digital camera and axiovision software (Carl Zeiss Axio Cam MR, axiovision software, 3.0.6 SP3). The outline of the peyer's patches was performed by hand.

To measure the cell size of epithelial cells, ten intestinal epithelial cells were counted along the villi and dimension measured.

#### Statistic

Group differences were compared with two way ANOVA (diets and age). Additional linear regression was made from every measurement category and feeding group. The linear regression was made using Sigma Stat (Version 3.0, Chicago, USA). P values less than 0.05 were considered significant.

### Results

All animals stayed healthy and no animal losses were registered during in the feeding experiment. Some of the piglets excreted pasty faeces, but none of the pigs got ill and was treated for any disease. Energy and feed intake and average daily gain did not differ between dietary treatments. Daily feed intake was 130 g/d in the first, 310 g/d in the second and 550 g/d in the third week after weaning. In the first treatment week before weaning, we had weight losses of 152 g/day, and afterwards weight increase of 239 g/day, 299 g/day and 262 g/day in the different treatment weeks. The different feedings had no significant effect on daily gain. At the different slaughter dates the piglets weighed  $8.6 \pm 0.7$  kg (day 24),  $7.5 \pm 1.1$  kg (day 31),  $8.7 \pm 1.0$  kg (day 36),  $10.8 \pm 1.4$  kg (day 43) and  $13.15 \pm 1.6$  kg (day 50). The weight increased significantly with age ( $p < 0.001$ ), however, the three feeding treatments showed no differences (figure 3). So the empty body weight was not affected by the different diets.

#### Histomorphometry in jejunum

In the jejunum villi-length and villi-diameter increased with age of the piglets. Over the four weeks the villi-length from the control and the apple pomace group increased 21 % respectively 20 %, the villi-length of the red-wine pomace only about 3.6 %. The villi breadth of the control group trend to increased about 38 %, whereas the other two groups showed only an increase of 10 %. In table 2 relative growth of length, breath and area are shown during the 26 treatment days, compared to the start at day 0. The trend of villi growth, shown as villi area (length x breath) over the 26 days feeding period was significantly increased in the control ( $p < 0.001$ ) and the apple pomace group ( $p < 0.01$ ). The villi area as such of the control group was significantly smaller than the apple pomace group ( $p = 0.025$ ) and the red-wine pomace ( $p = 0.017$ ) group.

#### Histomorphometry in ileum

The ileum villi-length started with 0.412 mm and increased in the control group about 20% over the experimental period, in the other two groups about 30%. Also in ileum only the length of the villi in the

control group decreased from the first to the second slaughtering. At the second (CD vs. AP  $p = 0.050$ ; CP vs. RWP  $p = 0.012$ ) and the fifth (CD vs. AP  $p = 0.008$ ; CP vs. RWP  $p = 0.003$ ) slaughtering the villi-length of the CD group was significantly smaller than in the treated groups.

The width of the villi increased about 40% in the CD and the RWP group and about 30% in the AP group (table 3). There were no significant differences between the feeding regimens over the entire feeding experiment in length or width of the villi.

### **Peyer's patches**

**The measured area of the Peyer's patches located in the central piglet ileum, showed a highly significant increase only in control group ( $p = 0.007$ ). Apple pomace and red-wine pomace group had no significant increase during the experiment (table 4).**

### **Histomorphometry in colon**

The crypt-depths increased during the experiment, and the three treatments showed similar trends. The control group and the red-wine pomace group showed an increase around 39-45% and the apple pomace group about 53%. The breadths showed a small decrease in the control and wine pomace group, whereas in the apple pomace group an increase was measured. The crypt area resulted in highly significant increases ( $p < 0.001$ ) for apple and red-wine feeding groups.

### **Epithelial cells**

In a sub-project the size of the epithelial cells was measured in jejunum of 6 piglets, to test if the villi or the cells itself are growing under the influence of flavanols. In each count ten epithelial cells at the outer line of villi were counted and the length of the cell row was measured. Cells sizes stayed constant under all three feeding regimes and over 26 days (table 6).

### **Discussion**

Weaning is a sudden physiological event that influences intestinal structure and gut function in the growing piglet. Our model combined different stressful events: weaning, psychological stress with the separation from the mother and mixing with non-littermates, and nutritional stress. The weaning of piglets, independent of their age, has generally an enormous effect on morphology of the villi in the small intestine (Wiese et al., 2003). The different diets were found not to influence body growth performance and daily gain of the piglets in the end. As shown in the literature, villi-length decreased to a minimum around three days after weaning (Kelly et al., 1991; van Beers-Schreurs et al., 1998; Klein, 2001; Hedemann et al., 2003; Vente-Spreeuwenberg et al., 2003). Afterwards the villi-length increases again very rapidly (Tang et al., 1999). During the applied experiment the villi morphology changed significantly in the jejunum and colon. The pomace diet seemed to decrease the rapid changes in gut morphology after weaning, by increasing the growth in the ileum and colon over the whole testing period. In the jejunum a villi-length decrease of 15% and in the ileum of 10% could be shown. Boudry et al. (2004) found a decrease of 40% in the jejunum and no changes in the distal ileum. The villi-length were longer in the jejunum than in the ileum, comparable to earlier feeding experiments (Görke, 2000, Mekbungwan and Yamauchi, 2004). The ileum showed a greater increase

of the villi size compared to the jejunum, but the pomace diets did not result in significant differences. Wiese et al. (2003) determined a higher proliferation rate of the epithelial cells in the ileum than in the jejunum.

The intestine is the most important site of nutrient absorption, and its efficiency is correlated to the surface area. It has been suggested that long villi result in an increased surface area capable of greater absorption of available nutrients (Caspary, 1992, Görke, 2000). Therefore long-villi were observed in the pigs showing an increased body weight gain (Zijlstra et al., 1996), whereas short-villi were reported during malnutrition (Zijlstra et al., 1997). In further studies greater villus-height and numerous mitosis in the intestine were morphologic indicators that the function of the intestinal villi was activated (Langhout et al., 1999; Yasar and Forbes, 1999). As shown herein, the constant epithelial cell breadth of 10 measured cells indicates that epithelial cells sizes stay constant in jejunum and the villi itself is growing.

In the ileum no effect on the gut morphology were shown, but there seems to be a significant influence on the GALT (gut-associated lymphoid tissue). The ileum incorporating peyer's patches were 21% enlarged in the control group over the 26 days treatment period ( $p < 0.007$ ). This indicates peyer's patches or GALT activation in the flavanoids lacking feeding regimen and suggest an immune-preventive effect of flavanols in the ileum immune system. As shown earlier, flavonoids have blocking effects on lymphoid growth, T-cells and natural killer cells (Lampe, 1999).

The assumption that increased crypt-depth is an indication of increased cell production in the crypts is widely accepted (Lauronen et al., 1998, Mei and Xu, 2005). In the colon, both flavanol-feeding regimens can enhance the villi and crypt growth, measured by area ( $p < 0.001$ ). Petkevicius et al. (2003) find no changes in the middle colon with two different diets, but did with infected piglets.

## Conclusion

Different polyphenol rich pomaces have diverse effects in the gastrointestinal tract. Apple and red-wine pomace have inhibitory effects on the jejunum villi growth, whereas they have stimulating effect on crypt size in piglet colon. Apple and red-wine pomace can reduce the GALT activation via the peyer's patches in the ileum. In conclusion, the flavanoids rich feeding regimen showed positive effects on villi morphology and may a good alternative to improve pig health after the ban on antibiotics.

## Acknowledgements

**This study was supported by the Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494. Special thanks to the Landesuntersuchungsamt (LUA) in Oberschleißheim for their excellent paraffin embedding.**

## References:

Aarestrup, F. M., 1999: Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12(4), 279-85.

- Bach Knudsen, K. E., 2001: Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animals diets. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 291-299.
- Van Beers-Schreurs, H. M. G., Nabuurs, M. J. A., Vellenga, L., Kalsbeck- van der Valk, H. J., Wensing, T., Breukink, H.J., 1998: Weaning and the weanling diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood, *J. Nutr.* 128, 947-53.
- Bezkorovainy, A., 2001: Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2 Suppl), 399S-405S.
- BMVEL, 2003: Bericht über die Tagung des Rates für Landwirtschaft und Fischerei am 20. Februar 2003 in Brüssel.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A., 1998: Flavonole, Flavone and Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss.* 37, 147-163.
- Boudry, G., Péron, V., Huërou-Luron, I. L., Lallès, J. P., Séve, B., 2004: Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory and barrier properties of piglet intestine, *J. Nutr.* 134, 2256-2262.
- Caspary, W. F., 1992: Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 55(1 Suppl), 299S-308S.
- Görke, B., 2000: Untersuchungen der Schleimhautmorphologie im Dün- und Dickdarm nach oraler Applikation von *saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *Toyoi* beim Schwein, Dissertation Hannover.
- Gonzalez-Paramas, A. M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. C., 2004: Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food. Chem.* 52(2), 234-8.
- Hedemann, M. S., Hojsgaard, S., Jensen, B. B., 2003: Journal of animal nutrition, small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* 87, 32-41.
- Kelly, D., Smyth, J. A.; MCCracken, K. J., 1991: Digestive development of the early-weaned pig. 2. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *Br. J. Nutr.* 65, 181-188.
- Klein, C., 2001: PTHR und Milch stimulieren einen Vitamin D unabhängigen aktiven Calciumtransport im Darm von Saugferkeln, Dissertation Hannover.
- Kotunia, A., Wolinski, J., Laubitz, D., Jurkowska, M., Romé, V., Guilloteau, P., Zabeliski, R., 2004: Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *J. Physiol. Phar.* 55, Suppl 2, 59-68.
- Lampe, J. W., 1999: Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 70(3 Suppl), 475S-490S.
- Langhout, D. J., Schutte, J. B., Van Leevwen, P., Wiebenga, J., Tamminga, S., 1999: Effect of dietary high and low methylated citrus pectin on the activity of the ileal microflora and morphology of the small intestine wall of broiler chicks. *Brit. Poult. Sci.*, 40, 340-347.

- Lauronen, J., Pakarinen, M.P., Kuusanmaki, P., Savilahti, E., Vento, P., Paavonen, T., Halttunen, J., 1998: Intestinal adaptation after massive proximal small-bowel resection in the pig. *Scand. J. Gastroenterol.* 33(2), 152-8.
- Luna, L. G., 1968: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3d ed. McGraw-Hill, New York. 258 p.
- Mekbungwan, A., Yamauchi, K.: 2004: growth performance and histological intestinal alterations in piglets fed dietary raw and heated pigeon pea meal. *Histol. Histopathol.* 19, 381-389.
- Mei, J., Xu, R., 2005: Transient changes of transforming growth factor- $\beta$  expression in the small intestine of pig in association with weaning. *Br. J. Nutr.* 93, 37-45.
- Petkevicius, S., Bach Knudsen, K. E., Murrell, K. D., 2003: Effects of *Oesophagostomum dentatum* and dietary carbohydrates on morphology of the large intestine of pigs. *Vet. Parasitol.* 116(2), 125-38.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073-2085.
- Schieber, A., Keller, P., Carle, R., 2001: Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 910(2), 265-73.
- Sigma Stat, User's Manual, Jandel Scientific Software, US, 1995, Version 5.0.
- Stoll, Der Apfel, 1997, Verlag Negiri, Zürich.
- Spreeuwenberg, M. A. M., Verdonk, J. M. A. J., Gaskins, H. R., Verstegen, M. W. A., 2001: Nutrient metabolism, small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J. Nutr.*, 131(5), 1520-7.
- Tang, M., Laarveld, B., Van Kessel, A. G., Hamilton, D. L., Estrada, A., Patience, J. F., 1999: Effect of segregated early weaning on postweaning small intestinal development in pigs. *J. Anim. Sci.* 77(12), 3191-200.
- Vente-Spreeuwenberg, M. A. M., Vedonk, J. M. A. J., Verstegen, M. W. A., Beyen, A. C., 2003: Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Br. J. Nutr.* 90, 907-913.
- Wiese, F., Simon, O., Weyrauch, K. D., 2003: Morphology of the small intestine of weaned piglets and a novel method for morphometric evaluation. *Anatomie. Histol. Embryol.* 32, 102-109.
- Yasar, S., Forbes, J. M., 1999: Performance and gastro-intestinal response of broiler chicks fed on cereal grain-based foods soaked in water. *Bri. Poult. Sci.* 40, 65-67.
- Zijstra, R.T., Whang, K.Y., Easter, R.A., Odle, J., 1996: Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. *J. Anim. Sci.* 74, 2948-2959.
- Zijlstra, R. T., Donovan, S. M., Odle, J., Gelberg, H. B., Petschow, B. W., Gaskins, H. R., 1997: Protein-energy malnutrition delays small intestinal recovery in neonatal pigs infected with rotavirus. *J. Nutr.* 127, 118-127.

**Table 1:** Dry mass, protein, fat, fibre, Nfe (N-free extract), ME (metabolisable energy) of the fed diets in g per kg dry mass.

	Dry mass	Protein	Fat	Fibber	NfE	ME
<b>feed</b>	[ g ]	[ g ]	[ g ]	[ g ]	[ g ]	MJ
control diet (CD)	878.0	188.8	25.2	38.3	564.6	12.93
apple-pomace diet (AP)	880.0	182.7	25.2	42.6	571.6	12.95
red- wine pomace diet (RWP)	880.0	188.8	30.5	45.2	556.8	12.95

**Table 2:** Linear regression of growth of the different measurement category (length, breadth, area) and in days (x) in mm (length and breadth) or mm<sup>2</sup> (area) in jejunum. The percentage value shows the relative growth during the 26 days of treatment, compared to the starting day 0. Significant growth over 26 days is indicated by p-value.

Jejunum (Je)	CD	AP	RWP
length (L) [mm]	L(Je, CD) = 0.5108+0.004x 21.0%	L(Je, AP) = 0.5324+0.0038x 20.0%	L(JE, RWP) = 0.551+0.0007x 3.6%
breadth (B) [mm]	B(Je, CD) = 0.0965+0.0013x 37.7%	B(Je, AP) = 0.1064+0.0004x 10.5%	B (Je, RWP) = 0.1062+0.0004x 10.5%
area (A) [mm <sup>2</sup> ]	A(Je, CD) = 0.0473+0.0012x <b>71.0% (p &lt; 0.001)</b>	A(Je, AP) = 0.0536+0.0007x <b>36.6% (p &lt; 0.01)</b>	A(Je, RWP) = 0.0567+0.0004x 19.7%

**Table 3:** Linear regression of growth of the different measurement category (length, breadth, area) and in days (x) in mm (length and breadth) or mm<sup>2</sup> (area) in ileum. The percentage value shows the relative growth during the 26 days of treatment, compared to the starting day 0. Significant growth over 26 days is indicated by p-value.

Ileum (il)	CD	AP	RWP
length (L) [mm]	$L(\text{il}, \text{CD}) = 0.4133 + 0.0031x$ 21%	$L(\text{il}, \text{AP}) = 0.4069 + 0.0042x$ 29%	$L(\text{il}, \text{RPW}) = 0.4167 + 0.0043x$ 29%
breadth (B) [mm]	$B(\text{il}, \text{CD}) = 0.0997 + 0.0014x$ 39%	$B(\text{il}, \text{AP}) = 0.0993 + 0.0011x$ 31%	$B(\text{il}, \text{RWP}) = 0.0964 + 0.0014x$ 41%
area (A) [mm <sup>2</sup> ]	$A(\text{il}, \text{CD}) = 0.0418 + 0.0009x$ 60%	$A(\text{il}, \text{AP}) = 0.0390 + 0.0011x$ 79%	$A(\text{il}, \text{RWP}) = 0.0413 + 0.0010x$ 68%

**Table 4:** Size of peyer's patches area and linear regression of growth in mm<sup>2</sup>. The percentage value shows the relative growth during 26 days of treatment, compared to the starting day 0. Significant growth over 26 days is indicated by p-value.

peyer's patch (PP)	CD	AP	RWP
PP area (A) [mm <sup>2</sup> ]	$A(\text{PP}, \text{CD}) = 0.2042 + 0.0015x$ <b>21% (p = 0.007)</b>	$A(\text{PP}, \text{AP}) = 0.2030 - 0.0001x$ 0.1%	$A(\text{PP}, \text{RWP}) = 0.2227 + 0.0003x$ 3.8%

**Table 5:** Linear regression of growth of the different measurement category (depth, breadth, area) and in days (x) in mm (length and breadth) or mm<sup>2</sup> (area) in colon. The percentage value shows the relative growth during the 26 days of treatment, compared to the starting day 0. Significant growth over 26 days is indicated by p-value.

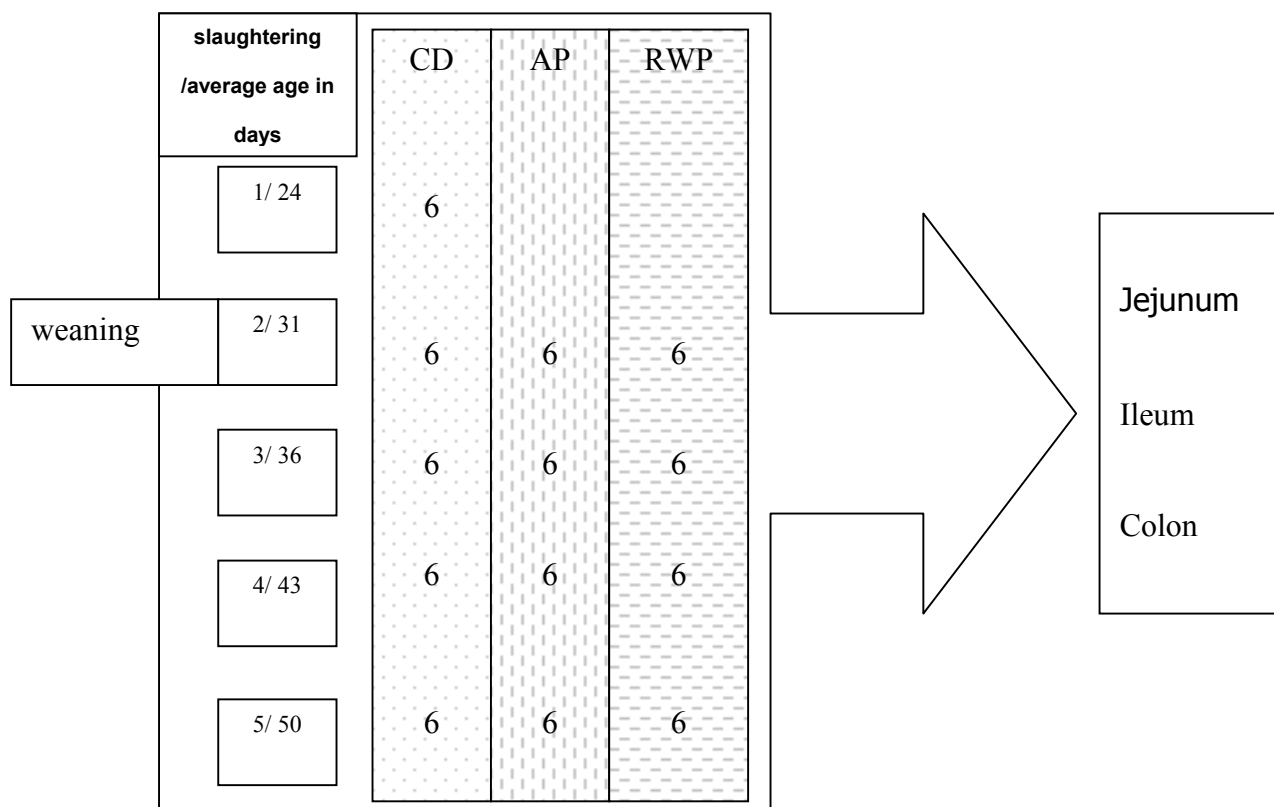
Colon (Co)	CD	AP	RWP
depth (D) [mm]	D(Co,CD) = 0.3134+0.0044x 39%	D(Co,AP) = 0.2985+0.0057x 53%	D(Co,RWP) = 0.3016+0.0049x 45%
breadth (B) [mm]	B(Co,CD) = 0.0457-0.0001x -6%	B(Co,AP) = 0.0371+0.0003x 23%	B(Co,RWP) = 0.0417+0.00005x -0.03%
area (A) [mm <sup>2</sup> ]	A(Co,CD) = 0.0151+0.0001x 19%	A(Co,AP) = 0.0109+0.0004x <b>103% (p &lt; 0.001)</b>	A(Co,RWP) = 0.0126+0.0002x <b>44% (p &lt; 0.001)</b>

**Table 6:** Cell size in µm of ten jejunum cells at outer villi border (mean ± sem; n=6), measured at two time points.

day	CD		AP		RWP	
	mean [µm]	SEM [µm]	mean [µm]	SEM [µm]	mean [µm]	SEM [µm]
24	45.39	8.35	50.78	4.45	45.39	8.35
50	45.78	4.51	49.80	5.52	48.63	7.17



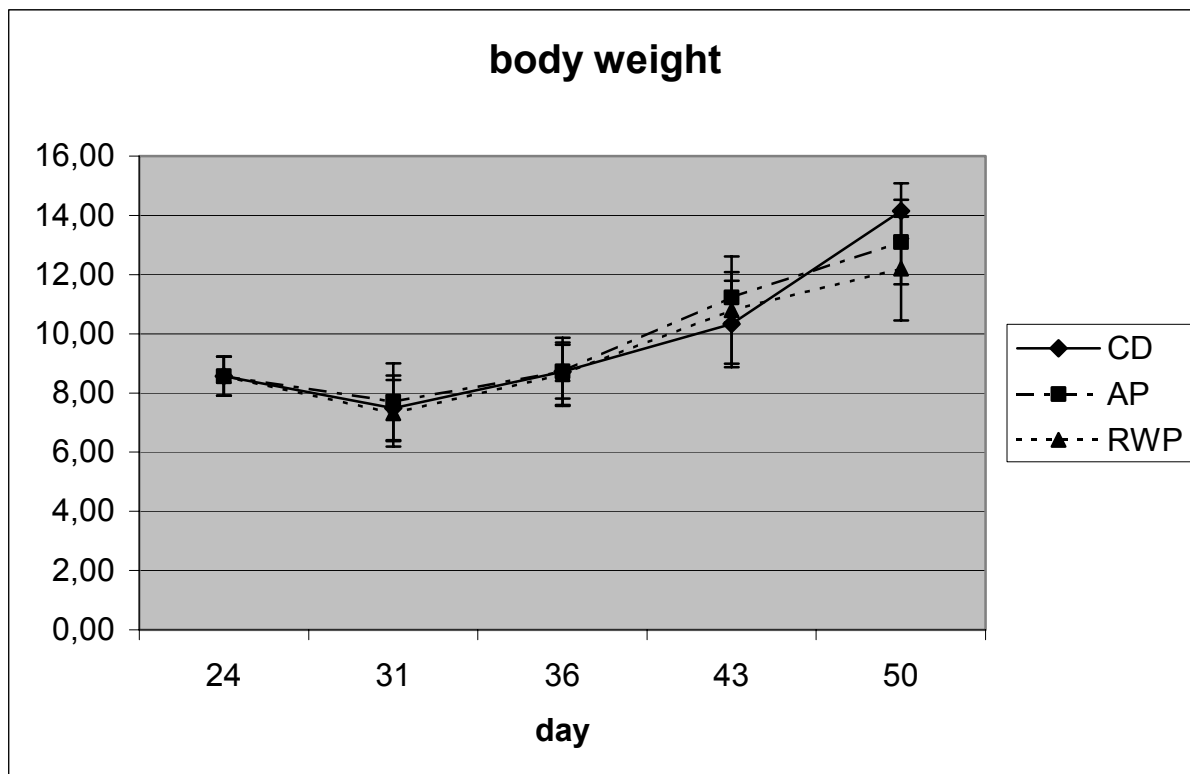
**Figure 1:** Sampling scheme: Tissue sampling was done every week, so youngest piglets were around three weeks, the oldest seven weeks old. From each feeding group (CD = control diet, AP = apple pomace diet, RWP = red-wine pomace diet) six piglets were killed at each time point. From every piglet specimen tissue samples of jejunum, ileum and colon were taken.



**Figure 2:** Villi length measurement in the Jejunum and Ileum (a typical slight from the jejunum in a control pig).



**Figure 3:** Body weight of the piglets at different age. Every point stands for n = 6 piglets with SEM. The three piglets groups were fed with control diet (CD), apple pomace diets (AP) and red-wine pomace diet (RWP).



## Manuskript:

### **The influence of apple- and red-wine pomace rich diet on mRNA expression of inflammatory and apoptotic markers in different piglet organs.**

**J. Sehm<sup>1</sup>, H. Lindermayer<sup>2</sup>, H. H. D. Meyer<sup>1</sup> and M. W. Pfaffl<sup>1\*</sup>**

1 Lehrstuhl für Physiologie, Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW), Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Technische Universität München (TUM), D-85354 Freising, Germany

2 Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), D-85586 Poing-Grub, Germany

\*Author for correspondence:

Michael W. Pfaffl  
Lehrstuhl für Physiologie  
Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL)  
Technical University of Munich (TUM)  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW)  
Weihenstephaner Berg 3  
D-85354 Freising-Weihenstephan

Tel.: +49-8161-71 3511  
Fax: +49-8161-71 4204  
E-mail: [Michael.Pfaffl@wzw.tum.de](mailto:Michael.Pfaffl@wzw.tum.de)

**Key words:**

***Apple pomace, red-wine pomace, piglets, mRNA, qRT-PCR, inflammatory marker-genes, apoptotic marker-genes***

## Abstract

Flavan-3-ols are a class of flavonoids that are widely distributed in fruits and beverages including red wine and apples. Consumption of food containing flavonoids has been shown to exhibit anti-microbial, anti-oxidative, anti-inflammatory, and immune-modulating effects. To test the nutritional effects of flavanols on gene-expression of inflammatory and apoptotic marker genes, piglets were fed with two flavanoids rich feeding regimens: enriched with apple pomace (APD) or red-wine pomace (RWPD), which were compared with a low flavanoid standard diet (SD). The influence on mRNA expression levels was investigated in different immunological active tissues and in the gastro-intestinal tract (GIT). The investigation took place from one week prior weaning to 19 days post weaning in 78 piglets. The expression of the marker genes was determined by one-step qRT-PCR:  $TNF\alpha$ ,  $NF\kappa B$  as pro-inflammatory, IL-10, as anti-inflammatory, Caspase 3 as apoptosis, Cyclin D1 as cell cycle marker and of nucleosome component Histone H3 as reference gene.

The feeding regimens result in different regulation of mRNA gene expression in the all investigated organs. We discovered significant differences between the applied diets, and significant changes during feeding time course. Both pomace treatments caused a significant up-regulation of all investigated genes in liver. The effect of mesenteric lymph node and spleen was not prominent. In GIT the treatment groups showed an inhibitory effect on gene expression mainly in stomach and jejunum ( $NF\kappa B$ , Cyclin D1 and Caspase 3). In Colon the trend of Caspase 3 was positive with the greatest change in the RWPD group.

In jejunum and stomach the cell cycle turn over was decreased, whereas in liver the cell turn over was highly increased. The influence on inflammatory marker is mainly relevant in stomach. We presume that both flavanoid rich feedings have the potential to modulate the mRNA expressions of proliferation and apoptotic marker genes in the tissues.

## Introduction

Flavan-3-ols are a class of flavonoids that are widely distributed in fruits and beverages including green tea, red wine, chocolate and apples (Guyot et al., 2003; Hammerstone et al., 1999, Damianaki et al., 2000, Waterhouse et al., 1996). Although their intake levels are not precisely known, they are likely the most abundant flavonoids in the human diet with estimates of consumption ranging from 0.1-0.5 g/d (Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Scalbert and Williamson, 2000). In addition to widely reported in vitro biological activities of flavan-3-ols (Waterhouse et al., 1996), consumption of purified monomers and food containing predominantly flavan-3-ols has been shown to reduce platelet activity, fatty streak development and certain types of cancers (Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Eberhardt et al., 2000). Animal models observed that polyphenols have preventive activity against cancer of the oral cavity, esophagus, stomach, intestine, colon, liver, lung, prostate, and skin (Lambert and Yang, 2003). Further flavonoids exhibit anti-microbial, anti-oxidative, anti-thromboses, immune-modulated, anti-inflammatory, and showed blood pressure and blood-glucose reducing effects (Leitzmann, 2003). In western countries apples were one of the main sources of dietary flavanoids that showed the strongest associations with decreased human mortality (Boyer and Liu, 2004). The particular mechanisms of action are impossible to establish without a complete understanding of their uptake as well as their metabolism and distribution among tissues and cells (Boyer and Liu, 2004). The average

of the total polyphenol content in apple is 0.3 g per kg fresh weight (0.05 – 1.1 g/kg) (Stoll, 1997) and about 2 mg/litre red wine (Scalbert and Williamson, 2000). The pomace of apples and grapes also has a high concentration of these polyphenols, whereas the main components are flavan-3-ole and proanthocyanidine (Stoll, 1997, Shrikhande, 2000).

Since 1946, sub-therapeutical levels of antibiotics have been used as growth promoters in pig meat production. Since then antibiotic additives became an important factor in pig production. However, the use of antibiotics as feed additives is risky due the development of antibiotic resistance in pathogens (Aarestrup, 1999, Bach Knudsen, 2001). Since beginning 2006 the antibiotics in animal feed is official forbidden by the EU (BMVEL, 2005). Many studies assume, that antibiotics and special diets change the intestinal morphology and therefore affect health (Hedemann et al., 2002; Boudry et al., 2004; Kotunia et al. 2004). In the recent literature alternative feed ingredients are discussed, e.g. probiotics, prebiotics and synbiotics, as well as secondary plant components (Bach Knudsen, 2001; Scalbert and Williamson, 2000).

In this approach two different flavanol rich feeding regimens were applied in 78 young growing piglets (freeze dried apple and red-wine pomace). The goal of this study was to show the influence of the different flavanol rich diets on mRNA expression of pro- and anti-inflammatory, apoptotic and proliferation markers in different organs and the GIT.

## Material and methods

### Animals

In this study 78 cross breed piglets [Pietráin x (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)] were fed with three different feed compositions. The animals were housed at the experimental station Osterseeon (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft). 30 animals were fed with a control standard weaning diet (SD) (50% wheat, 23% barley, 22% soy, 1% soy oil, 4% vitamins and minerals), 24 each got additionally 3.5% dry mass apple pomace (APD) or red-wine pomace (RWPD). Energy, protein, fat and starch were balanced in all three diets (table 1). Live weight of piglets was monitored one week before weaning (live day 24, treatment day 0), at weaning (live day 31) and at day 36, day 43 and day 50 (treatment day 26). The first six control pigs were slaughtered one week before weaning. At weaning, piglets were grouped with identical age ( $31 \pm 1.8$  days), weight ( $7.5 \pm 1.1$  kg) and half male, half female in every group. At weaning and every following week 6 SD pigs, 6 APD and 6 RWPD feed piglets were slaughtered (figure 1).

Piglets were killed by electric gripper and exsanguinated. A horizontal incision along the midline was made to open the abdominal cavity, and all the organs were excised. Empty bodyweight, kidneys, spleen and liver weights were measured at sampling. Tissue sample from mesenterial lymph nodes, spleen, liver, kidney, muscle (longissimus dorsi), stomach, jejunum, ileum and colon were dissected, cut into small pieces (about 0.5 cm<sup>3</sup>), aliquoted and immediately frozen in liquid nitrogen. Tissues were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until total RNA extraction.

### mRNA extraction

Total RNA of the different tissues was isolated using TriFast (Peqlap, Erlangen, Germany) according to the manufactures instructions. To quantify the extracted RNA concentration, the optical density was determined in triplicates at three different dilutions of the final total RNA preparations at 260 nm. RNA integrity was verified by optical density OD 260nm/OD 280nm absorption ratio >1.90.

#### *Real-time one-step qRT-PCR*

Relative-quantification of mRNA concentration was carried out using a one-step quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in the ep realplex Cyclyer (Eppendorf, Hamburg, Germany). To minimize pipetting errors an eight-channel pipetting robot epMotion 5075 (Eppendorf) was used. 25 ng mRNA in 1 µl volume was inserted as RT-PCR template. Further the master-mix components for the qPCR reactions [0.3 µl iScript (Bio-Rad, Munich, Germany), 0.225 µL (20 pmol) of forward and reverse primer (table 2) synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany), 7.5 µl 2x SYBR Green (Bio-Rad) and up to 14 µl water] was assembled by the robot. One-step qRT-PCR was performed with 40 cycles and product-specific annealing temperature, according to the manufactures cycle settings (Bio-Rad). The crossing points (CP) were acquired with the CT-method present in the Eppendorf analysis software. Amplification PCR products underwent a melting curve analysis after the last cycle to specify the integrity of amplification. Finally a cooling step was performed. A relative-quantification was applied, using Histon H3 as reference gene and a panel of physiological marker genes shown in table 2. Single target genes mRNA expression were normalized by the constant reference gene expression (herein Histon H3 mRNA exopression), comparable to the  $\Delta\Delta\text{CP}$  method (Schmittgen, 2001, Livak and Schmittgen, 2001) (equation 1 and 2).

#### Equation 1:

$$\Delta\text{CP (Histon - marker gene) day 0/7/12/19 or 26} = \text{CP (Histon)} - \text{CP (marker gene)}$$

In a second step, each  $\Delta\text{CP}$  value at the defined time point at day 7, 12, 19 or 26 was compared with the mean expression CP of the control group at the first slaughter date (treatment day 0), according to the following equation 2:

#### Equation 2:

$$\Delta\Delta\text{CP} = \text{CP (Histon - marker gene) day 0} - \Delta\text{CP (Histon - marker gene) day 7/12/19 or 26}$$

Positive  $\Delta\Delta\text{CP}$  values represent an up-regulation and negative  $\Delta\Delta\text{CP}$  values represent a down-regulation of the described mRNA gene expression, compared to the control group at day zero.

#### Statistical Evaluations

Means of reference gene Histon H3 were compared with two way ANOVA (time point and diet). Additional linear regression was made from every tissue, target gene and feeding group, to test the trend of treatment over 26 feeding days. The linear regression was made using Sigma Stat (Version 3.0, Chicago, USA). P values less than 0.05 were considered significant ( $p < 0.05$ ).

## Results

### *Daily gain and organ weights*

All animals remained healthy during the feeding experiment and no animal losses were registered. Some of the piglets excreted pasty faeces, but none of the pigs got ill and was treated for any disease. Energy and feed intake and average daily gain did not differ between dietary treatments. Over all feeding groups the daily feed intake was 130 g/d in the first, 310 g/d in the second and 550 g/d in the third week after weaning. The different feeding regimens had no significant effect on daily weight gain. In the first treatment week before weaning, we had weight losses of 152 g/day (n = 18), and afterwards weight increase of 239 g/day (n = 18), 299 g/day (n = 18), and 262 g/day (n = 18), in the single treatment weeks. At the five different slaughter dates the piglets weighed  $8.6 \pm 0.7$  kg,  $7.5 \pm 1.1$  kg,  $8.7 \pm 1.0$  kg,  $10.8 \pm 1.4$  kg and  $13.15 \pm 1.6$  kg. Live weight increased significantly with age ( $p < 0.001$ ), however, the three feeding groups showed no differences in live weight and daily gain. Therefore the empty body weight at slaughtering was not affected by the applied diets.

Relative weights of spleen, kidney and liver, compared with total weight at slaughtering, are shown in table 3. Relative spleen and two-kidney weights showed no significant differences between the different feeding groups, whereas the absolute weight increased numerically during the observation time. During the study the absolute liver weight increased significantly ( $p < 0.001$ ). At the end of the study relative liver weight was significantly ( $p = 0.003$ ) higher in the RWPD-group.

### *mRNA expression and total RNA*

Extracted total RNA contents showed no significant variations in RNA integrity and quantity between analysed feeding groups. All tested genes were abundant in all tissues, showed single peaks in melting curve analysis (ep realplex software, Eppendorf) and a single band in high-resolution 4% agarose gel electrophoresis (gels not shown). The reference gene Histon H3 mRNA expression remained constant during the entire study and was affected neither by the treatment time nor by the applied diet. Five different marker genes were determinate in quantitative one-step RT-PCR:

- pro-inflammatory and apoptosis inducing marker:  $\text{TNF}\alpha$
- transcription factor:  $\text{NF}\kappa\text{B}$
- anti-inflammatory marker: IL10
- apoptotic marker: Caspase 3
- proliferation and cell cycle markers: Cyclin D1

Only significant gene expression results of the analysed marker genes in the GIT are summarized in table 4. In stomach the mRNA expression of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  decreased highly significant over time in the treatment groups (APD and RWPD;  $p < 0.001$ ). A slight decrease of  $\text{NF}\kappa\text{B}$  expression in jejunum was measured in the SD group, in colon the APD group showed a slight increase. The trend of  $\text{TNF}\alpha$  expression was negative in stomach (APD;  $p < 0.05$ ), jejunum (SD;  $p < 0.01$ ) and ileum (RWPD;  $p < 0.01$ ), and positive in colon (SD;  $p < 0.001$ , APD;  $p < 0.01$ ). The GIT of the RWPD group showed diverse trends in the IL10 mRNA expression. There was an increase in jejunum ( $p < 0.01$ ) and colon ( $p < 0.001$ ) and a decrease in ileum ( $p < 0.001$ ). The mRNA expression of Cyclin D1 showed a lot of expression changes. In stomach (APD and RWPD;  $p < 0.001$ ) and jejunum (APD  $p < 0.01$ , RWPD  $p < 0.05$ ) CyclinD1 expression decreased significantly, whereas ileum showed an increase in RWPD group. The trend of



Cyclin D1 expression in colon showed a decrease in SD group ( $p < 0.01$ ) and APD group ( $p < 0.05$ ). In contrast Caspase 3 expression in colon increased, and decreased in jejunum. The trends in the treatment groups were greater than in control group. The RWPD group showed a positive trend in the jejunum, too.

Gene expression results in immunological tissues, as well as in piglets organs are summarized in table 5. There were no significant changes in the mRNA expression of mesenterial lymph nodes, kidneys and spleen, except for IL-10 and Caspase 3 expression. Spleen (SD  $p < 0.05$ ) and kidneys (SD  $p < 0.01$ , APD  $p < 0.01$ ) showed an increase of IL-10 expression, spleen (APD  $p < 0.05$ ) and kidney (SD  $p < 0.05$ ) an increase of Caspase 3 expression over the experimental period.

The expression of NF $\kappa$ B (APD;  $p < 0.001$ , RWPD;  $p < 0.01$ ), TNF $\alpha$  (APD;  $p < 0.01$ ), IL10 (APD;  $p < 0.05$ , RWPD;  $p < 0.05$ ), IGF1 (APD;  $p < 0.001$ , RWPD  $p < 0.05$ ), CyclinD1 (APD;  $p < 0.001$ , RWPD;  $p < 0.001$ ) and Caspase3 (APD;  $p < 0.001$ , RWPD;  $p < 0.001$ ) changed significantly in the liver. All genes showed an up-regulation in the APD and RWPD group over the 26 days.

The trend of NF $\kappa$ B expression showed an increase in muscle ( $p < 0.01$ ) in the RWPD group. The mRNA expression of TNF $\alpha$  increased in muscle ( $p < 0.05$ ). IL10 expression was up-regulated in the SD group ( $p < 0.001$ ). The muscle showed a slight increase in the SD group ( $p < 0.05$ ) and a decrease in the RWP group ( $p < 0.05$ ).

## Discussion

Herein a number of GIT tissues and organs in weaned piglets were tested, to determine whether there was an effect on the relative mRNA expression level of different anti- and pro-inflammatory marker genes, as well as apoptosis and proliferation marker genes.

Several cytokines such as TGF  $\beta$ , IL1 $\alpha$  and IL6 are constitutively expressed by the intestinal epithelium and may play a role in the basal influx of the immune cells into the mucosa, in epithelial cell growth and in homeostasis (Stadnyk, 1994). Other cytokines such as IL8, IL1 $\beta$  and TNF  $\alpha$  are also expressed by normal epithelial cells and markedly up-regulated in response to microbial infection (Jung et al., 1995; Pie et al., 2004). Local expression of IL1, IL6 and TNF $\alpha$  mRNA has been largely documented after bacterial or viral infection in pigs (Murtaugh et al., 1996; Fossum 1998). In our study TNF $\alpha$  was generally reduced in GIT, except in colon. The process of inflammation is self-limiting because the production of pro-inflammatory cytokines is followed almost immediately by production of anti-inflammatory cytokines like IL10 and IL13 (Philpott and Ferguson, 2004). Herein both pomace groups showed a divergent reaction in the IL10 mRNA expression in GIT, increasing in stomach and ileum, and decreasing in jejunum and colon.

TNF $\alpha$  and NF $\kappa$ B mRNA expressions react in comparable pattern in most of the observed tissues and organs. TNF $\alpha$  is a potent cytokine produced by many cell types, including macrophages, monocytes, lymphocyte, keratinocytes and fibroblasts, in response to inflammation, infection, injury and other environmental challenges (Baud and Karin, 2001). Exposure of cells to TNF $\alpha$  can result in activation of a caspase cascade leading to apoptosis (Chang and Yang, 2000). TNF $\alpha$  causes activation of two major transcription factors, AP-1 and NF $\kappa$ B, that in turn induce genes involved in chronic and acute inflammatory responses (Barnes and Karin, 1997; Shaulian and Karin, 2001).

Central to the inflammatory response is activation of the transcription factor NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B is the key transcriptional regulator of many pro-inflammatory cytokines (Baldwin, 1996; Ghosh and Karin, 2002). However, NF $\kappa$ B activation also promotes cellular proliferation (Guttridge et al., 1999; Hinz et al., 1999) and protects against apoptosis (Beg and Baltimore, 1996; Van Antwerp et al., 1996). In our piglet study no consistent correlation of NF $\kappa$ B and Caspase 3 could be found. The NF $\kappa$ B pathway has been rather implicated in the resolution of inflammation. It has been shown that NF $\kappa$ B activation in leukocytes recruited during the onset of inflammation is associated with pro-inflammatory gene expression, whereas such activation during resolution of inflammation is associated with the expression of anti-inflammatory genes and the induction of apoptosis (Lawrence et al., 2002).

Caspase 3 plays a key role in the regulation of apoptosis. Inhibition of Caspase 3 prevents cell death by apoptosis (Heczko et al., 2001). Caspase 3 mRNA expression showed an increase in ileum and colon, in jejunum a decrease over experimental period, whereas in jejunum I was significantly decreased. High and low-molecular weight DNA fragmentation is caused by action of Caspase 3 (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998).

The abundance of Cyclin D1 is induced by growth factors, including IGF-1 (Albanese et al., 1999). Cyclin D1 forms physical associations with more than 30 transcription factors or transcriptional co-regulators (Wang et al., 2004; Zhang et al., 1999; Horstmann et al., 2000; Inoue and Sherr, 1998). The regulation of cell cycle is controlled in part by a family of protein kinase complexes, and each complex is composed minimally of a catalytic subunit, and its essential activating partner, the cyclin (Collins, 1997; Sherr and Roberts, 1999; Jacks and Weinberg, 1996; Macleod et al., 1995; Sherr, 1994). These complexes are activated at specific intervals during the cell cycle but can also be induced and regulated (Collins, 1997; Sherr and Roberts, 1995; Macleod et al., 1995). The pomace feeding reduce the Cyclin D1 as a marker of proliferation in the GIT. Apples (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003), especially apple peels, and wine by-products (Carbonneau et al., 1997; Shrikhande, 2000) have been found to have a potent antioxidant activity and can greatly inhibit the growth of liver cancer and colon cancer cells. Therefore apples have been shown to have anti-proliferative activity in several studies in cell culture (Eberhardt et al., 2000; Wolfe et al., 2003). In our study the tested Cyclin D1 mRNA expressions showed an up-regulation in liver in the pomace groups. It was reported that the extracts of apple and grape are more potent than onion, tomato and celery in inducing activation of caspase-3/-7 and cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase in intact Jurkat T cells (Chen et al., 2004). In previous investigation, the villi length in jejunum were measured in length, and showed an increase over three weeks after weaning (data not published). We can confirm the villi growth by less expression of the apoptotic marker Caspase 3.

Green tea polyphenols, including EGCG inhibit endotoxin-mediated TNF $\alpha$  production (Fujiki et al., 2001) and blocked the NF $\kappa$ B activation (Yang et al., 2001). Other cell experiment demonstrated that the four apple extracts inhibit TNF-alpha production of LPS-stimulated macrophages at certain concentrations (Adaim et al., 2005). In cell culture silymarin, genistein, and EGCG inhibit Cyclin D1 (Agarwal, 2000).

In the liver generally the mRNA expression of the tested genes increased in the two polyphenol rich feeding regimes. Both pomace treatments have a common effect on mRNA expression. This is in

accordance with prior cell studies, where physiological polyphenol concentration stimulates total mRNA expression (Sehm et al., 2005).

### Conclusion

We presume that both flavanoid rich feedings have the potential to modulate the mRNA expressions of proliferation and apoptotic markers in various tissues. In jejunum and stomach the cell cycle turn over was decreased, whereas in liver the cell turn over was highly increased. The influence on inflammatory marker is mainly relevant in stomach.

### Acknowledgements

This study was supported by the Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494. We thank Prof. Dr. J. Polster (Department für Biowissenschaftliche Grundlagen, Lehrstuhl für Biologische Chemie, Fachgebiet Physikalische Chemie, WZW der TU München) and Prof. Dr. W. Feucht (Department für Pflanzenwissenschaften, WZW der TU München) for helpful discussions.

### Literature

- Aarestrup, F.M.** 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* **12**(4): 279-85.
- Adaim, A., Zhang, J., Lauren, D.R., Stanley, R., and Skinner, M.A.** 2005. Polyphenols and health using cell-based assays to aid in the development of new functional foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. **14**:106.
- Agarwal, R.** 2000. Cell signaling and regulators of cell cycle as molecular targets for prostate cancer prevention by dietary agents. *Biochemical Pharmacology* **60**:1051-1059 Review.
- Albanese, C., D'Amico, M., Reutens A.T., Fu M., Watanabe, G., Lee, R.J., Kitsis, R.N., Henglein, B., Avantaggiati, M., Somasundaram, K., Thimmapaya, B., and Pestell, R.G.** 1999. Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **274**:34186-95.
- Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R., and Verma, I.M.** 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**:787-9.
- Bach Knudsen, K.E.** 2001. Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animals diets. *Proceedings of the Nutrition Society* **60**:291-299.
- Baldwin, A.S. Jr.** 1996. The NF-kappa B and I kappa B protein new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* **14**, 649-83.
- Barnes, P.J. and Karin, M.** 1997. Nuclear factor-kappa B: a pivotal transcription factoring chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* **336**: 1066-1071.
- Baud, V., and Karin, M.** 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* **11**:372-7.
- Beg, A.A., and Baltimore, D.** 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* **274**:782-4.
- BMVEL.** 2005. Verordnung (EG) Nr. 183/2003 Artikel 11 Absatz 2

- Boudry G., Peron V., Le Huerou-Luron I., Lalles J.P. and Seve B.** 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of nutrition*. **9**:2256-62.
- Boyer, J., and Liu, R.H.** 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Journal of Nutrition* **12**:3-5.
- Carbonneau, M.A., Leger, C.L., Monnier, L., Bonnet, C., Michael, F., Fouret, G., Dedieu, F., and Descomps, B.** 1997. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu(2+)-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *European journal of clinical nutrition*. **51**:982-690.
- Chang, H.Y., and Yang, X.** 2000. Proteases for cell suicide functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64**:821-46Review.
- Chen, M.S., Chen, D., and Dou, Q.P.** 2004. Inhibition of proteasome activity by various fruits and vegetables is associated with cancer cell death. *In Vivo*. **18**: 73-80.
- Collins, K., Jacks, T., and Pavletich, N.P.** 1997. The cell cycle and cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**:2776-8.
- Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Kampa, M., Notas, G., Hatzoglou, A., Panagiotou, S., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P.-M., and Castanas, E.** 2000. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **78** :429-441.
- Eberhardt, M, Lee, C., and Liu, R.H.** 2000. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*. **405**: 903-904
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A, and Nagata, S.** 1998. A Caspase-activated DNAs that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. **391**:43-50.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Fujimoto, N., Goto, Y., Matsuyama, S., Imai, K., and Nakachi, K.** 2001. Cancer prevention with green tea and monitoring by a new biomarker, hnRNP B1. *Mutation research*. **480**:299-304Review.
- Fossum, C.** 1998. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. **15**:439-44.
- Ghosh, S., and Karin, M.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109**:81-96Review.
- Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., and Baldwin, A.S. Jr.** 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology*. **19**(8):5785-99.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., and Drilleau, J.F.** 2003. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of agricultural and food chemistry*. **51**.6240-7.
- Hammerstone, J., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Rucker, R., and Schmitz, H.H.** 1999. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography mass spectrometry *Journal of agricultural and food chemistry*. **47**:490-496.
- Hedemann M.S., Kristiansen E., Brunsgaard G.** 2002. Morphology of the large intestine of the pig: haustra versus taenia. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* **184**:401-3

- Heczko, U., Carthy, C.M., O'Brien, B.A., and Finlay, B.B.** 2001: Decreased apoptosis in the ileum and ileal Peyer's patches feature after infection with rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Infection and immunity* **69**:4580-9.
- Hinz, M., Krappmann, D., Eichten, A., Heder, A., Scheidereit, C., and Strauss, M.** 1999. NF-kappaB function in growth control/regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and cellular biology* **19**:2690-8.
- Horstmann, S., Ferrari, S., and Klempnauer, K.H.** 2000. Regulation of B-Myb activity by cyclin D1. *Oncogene* **19**:298-306.
- Inoue, K., and Sherr, C.J.** 1998. Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Molecular and cellular biology* **18**:1590-600.
- Jacks, T., and Weinberg, R.A.** 1996. Cell-cycle control and its watchman. *Nature* **381**:643-4.
- Jung, H.C., Eckmann, L., Yang, S.K., Panja, A., Fierer, J., Morzycka-Wroblewska, E., and Kagnoff, M.F.** 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of clinical investigation* **95**:55-65.
- Kotunia A., Wolinski J., Laubitz D., Jurkowska M., Rome V., Guilloteau P., Zabielski R.** 2004. Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Societ.* **55**:59-68.
- Lambert, J.; and Yang, Ch.** 2003. Mechanisms of Cancer Prevention by Tea Constituents. *Journal Nutrition* **133**:3262-3267.
- Lawrence, T., Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., and Willoughby, D.A.** 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews. Immunology* **2**:787-95Review.
- Leitzmann, C.** 2003. Nutrition ecologythe contribution of vegetarian diets. *The American journal of clinical nutrition* **78**:657-659.
- Liao, S.S., Umekita, Y., Guo, J.T., Kokintis, J.M., and Hiipakka, R.A.** 1995. Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea Epigallocatechin Gallate. *Cancer letters* **96**:239-243.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relativ gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* **25**:402-408.
- Liu, Z.G., Baskaran, R., Lea-Chou, E.T., Wood, L.D., Chen, Y., Karin, M., and Wang, J.Y.** 1996. Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature* **384**:273-6.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X.** 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstreams of Caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis *Cell* **89**: 175-184.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T.** 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes & development* **9**:935-44.
- Murtaugh, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W., and Lin, G.** 1996. Inflammatory cytokines in animal health and disease *Veterinary immunology and immunopathology* **54**:45-55.

- Philpott, M., and Ferguson, L.R.** 2004. Immunonutrition and cancer. *Mutation research* **551**:29-42Review.
- Rein, D., Lotito, S., Holt, R.R., Keen, C.L., Schmitz, H.H., and Fraga, C.G.** 2000. Epicatechin in human plasmin vivo determination and effect of chocolate consumption *The Journal of nutrition* **130**:2109-2114.
- Pie, S., Lalles, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sebe, B., and Oswald, I.P.** 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets, *The Journal of nutrition* **134**:641-647.
- Schmittgen, T.D.** 2001. Real time quantitative PCR. *Methods*. 383-385.
- Sigma Stat**, User's Manual, Jandel Scientific Software, US, 1995, Version 5.0.
- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A.** 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health *Journal of the science of food and agriculture* **80**:1094-1117.
- Shaulian, E., and Karin, M.** 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. **20**:2390-400.
- Scalbert, A. and Williamson, J.R.** 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. **130**:2073-2085.
- Sehm, J., Polster, J., and Pfaffl, M.W.** 2005. Effects of varied EGCG and (+)-catechin concentrations on proinflammatory cytokines mRNA expression in ConA-stimulated primary white blood cell cultures *Journal of agricultural and food chemistry* **53**:6907-11.
- Sherr, C.J.** 1994. G1 phase progression cycling on cue. *Cell* **79**:551-5Review.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development* **9**:1149-63Review.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M.** 1999. CDK inhibitors positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* **13**:1501-12Review.
- Shrikhande, A.J.** 2000. Wine by-products with health benefits, *Food research international* **33**, 469-474.
- Stadnyk, A.W.** 1994. Cytokine production by epithelial cells *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **8**:1041-7.
- Stoll**, Der Apfel, 1997, Verlag Negiri, Zürich
- Yang, F., Oz, H.S., Barve, S., de Villiers, W.J., McClain, C.J., and Varile, G.W.** 2001. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor-kappa B activation by inhibiting I kappa B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Molecular pharmacology* **60**:528-33.
- Wang, C., Li, Z., Fu, M., Bouras, T., and Pestell, R.G.** 2004. Signal transduction mediated by cyclin D1 from mitogens to cell proliferation a molecular target with therapeutic potential. *Cancer treatment and research* **119**:217-37.
- Waterhouse, A.L., Shirley, J.R., and Donovan J.L.** 1996. Antioxidants in chocolate. *Lancet* **348**:834
- Wolfe, K., Wu, X., and Liu, R.H.** 2003. Antioxidant activity of fresh peels *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 253-256.
- Zhang, J.M., Wie, Q., Zhao, X., and Paterson, B.M.** 1999. Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *The EMBO journal*, **18**:926-33.

**Table 1:** Dry mass, protein, fat, fibre, Nfe (N-free extract), ME (metabolise able energy) of the different diets in g per kg dry mass

	<b>Dry mass</b>	<b>Protein</b>	<b>Fat</b>	<b>Fibber</b>	<b>NfE</b>	<b>ME</b>
	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]	[MJ]
<b>standard diet</b>	878.0	188.8	25.2	38.3	564.6	12.93
<b>apple pomace diet</b>	880.0	182.7	25.2	42.6	571.6	12.95
<b>red-wine pomace diet</b>	880.0	188.8	30.5	45.2	556.8	12.95

**Table 2: Sequence of forward and reverse primers for one-step qRT-PCR.**

<b>gene</b>	<b>forward primer</b>	<b>reverse primer</b>
<b>Histon H3</b>	act ggc tac aaa agc cgc tc	act tgc ctc ctg caa agc ac
<b>TNF alpha</b>	ccc cca gaa gga aga gtt tc	ttg gcc cct gaa gag gac
<b>IL 10</b>	act tta agg gtt acc tgg gtt g	gta gac acc cct ctc ttg ga
<b>NFκB</b>	ggg gga gaa ctt tga gcc tc	cca gag acc tca tag ttg tcc
<b>Caspase3</b>	tgt gtg ctt cta agc cat gg	agt tct gtg cct cgg cag
<b>CyclinD1</b>	tcc tgt gct gcg aag tgg a	ggg cca ggt agt tca tgg c



**Table 3:** Relative organ weights of piglets (n=6) in g organ /kg body weight at slaughtering. Asterisk (\*\*) shows significant increase in liver weight ( $p < 0.01$ ).

feeding	day	spleen weight		2-kidneys weight		liver weight	
		[per mille of body weight]		[per mille of body weight]		[per mille of body weight]	
		[g/kg]		[g/kg]		[g/kg]	
		mean	SD	mean	SD	mean	SD
SD	0	2.84	0.34	5.26	0.35	22.21	1.94
SD	7	2.88	0.85	4.95	0.72	19.75	1.25
APD	7	2.61	0.41	5.18	0.43	20.32	2.43
RWPD	7	2.13	0.35	5.50	0.91	21.10	2.40
SD	12	2.37	0.68	5.13	0.88	19.55	1.89
APD	12	2.33	0.58	5.22	1.22	22.08	4.05
RWPD	12	2.24	0.38	4.34	0.74	19.30	1.12
SD	19	2.08	0.30	4.72	0.70	21.07	1.03
APD	19	2.14	0.60	4.35	0.53	20.68	1.49
RWPD	19	1.96	0.27	4.66	0.44	21.93	1.65
SD	26	2.62	0.60	4.77	0.29	21.21	1.43
APD	26	2.93	1.01	5.09	0.28	22.95	1.92
RWPD	26	2.75	0.61	5.18	0.55	25.52 **	3.33

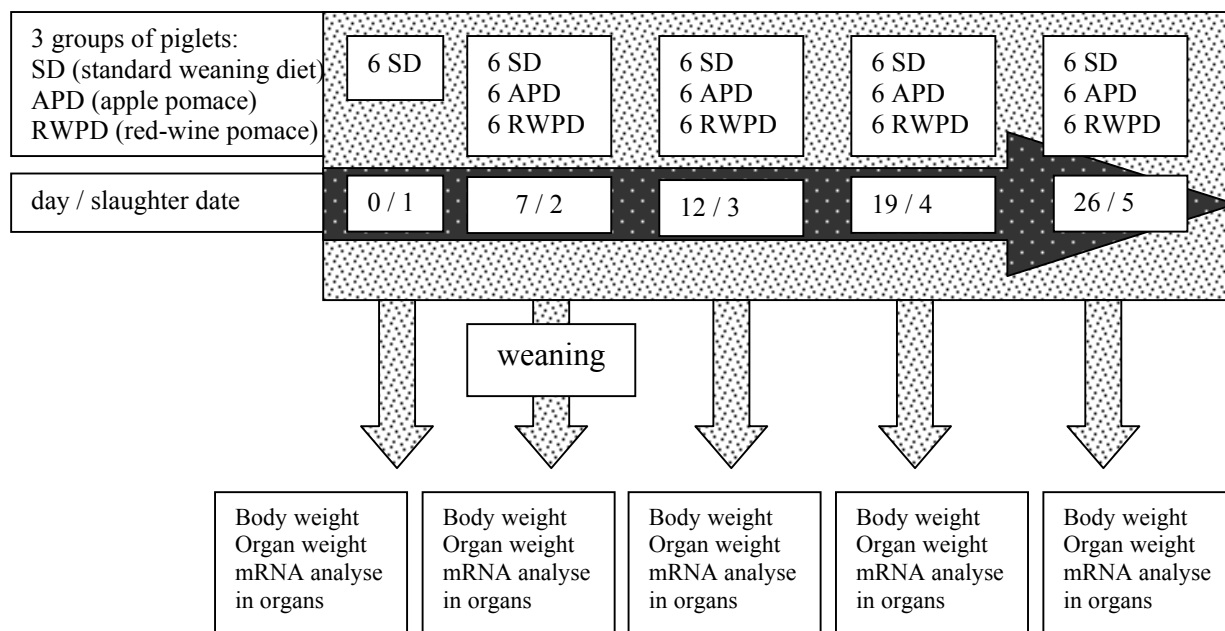
**Table 4:** Trend of mRNA gene regulation over 26 days in the gastro-intestinal tract of piglets. Data are shown as of  $\Delta\Delta\text{CP}$  values from day 0 to 26, positive trend represent an up-regulation, negative trend a down-regulation; p-values: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; and Pearson correlation coefficient.

	tissue	SD			APD			RWPD					
		Trend of regulation	p	Pearson	Trend of regulation	p	Pearson	Trend of regulation	p	Pearson			
<b>NFkB</b>	Stomach	-1.86	*	0.46	-6.53	***	0.63	-7.90	***	0.68			
	Jejunum				+1.61	*	0.44						
	Ileum												
	Colon												
<b>TNFa</b>	Stomach	-2.35	**	0.57	-1.74	*	0.41	-2.63	**	0.52			
	Jejunum												
	Ileum												
	Colon				+0.94	***	0.29				+1.48	**	0.47
<b>IL10</b>	Stomach				-1.44	*	0.39	+3.80	**	0.58			
	Jejunum												
	Ileum												
	Colon										-1.70	*	0.39
<b>IGF 1</b>	Stomach	-1.67	*	0.40				+2.02	*	0.37			
	Jejunum												
	Ileum												
	Colon												
<b>Cyclin D1</b>	Stomach				-3.28	***	0.67	-3.64	***	0.71			
	Jejunum												
	Ileum												
	Colon				-1.25	**	0.50				-3.69	**	0.55
<b>Caspase 3</b>	Stomach	-2.11	**	0.50	-2.86	*	0.43	-3.72	**	0.50			
	Jejunum												
	Ileum												
	Colon										+0.78	*	0.24

**Table 5:** Trend of mRNA gene regulation over 26 days in mesenterial lymph node (mes LN), spleen, liver, kidney and muscle of piglets. Data are shown as of  $\Delta\Delta\text{CP}$  values from day 0 to 26, positive trend represent an up-regulation, negative trend a down-regulation; p-values: \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$ ; and Pearson correlation coefficient.

SD		APD			RWPD				
		Trend of regulation	p	Pearson	Trend of regulation	p	Pearson		
NFkB	mes LN								
	Spleen								
	Liver			+3.98	***	0.71	+3.46	**	0.61
	Kidney								
TNFa	Muscle						-9.10	**	0.50
	mes LN								
	Spleen								
	Liver			+2.13	**	0.49			
IL10	Kidney			+1.87	*	0.44			
	Muscle								
	mes LN	-1.28	*	0.37					
	Spleen			+1.89	**	0.47			
IGF 1	Liver			+6.86	*	0.53	+6.94	*	0.49
	Kidney	+7.90	**	0.58					
	Muscle	+11.91	***	0.65					
	mes LN								
Cyclin D1	Spleen								
	Liver			+3.15	***	0.66	+2.19	*	0.42
	Kidney			-2.81	*	0.41			
	Muscle								
Caspase 3	mes LN								
	Spleen			+1.56	*	0.42			
	Liver			+8.66	***	0.78	+8.89	***	0.83
	Kidney	+1.34	*	0.40					
Muscle		+1.95	*	0.44			-2.73	*	0.41

**Fig. 1** Tissue collection was performed once a week, so youngest piglets were 3.5 weeks old, the oldest 7 weeks old. From each feeding group (SD= standard diet, APD= apple pomace diet, RWPDP= red-wine pomace diet) 6 piglets were killed at one time point.



## Manuskript

### **The influence of normal, apple pomace added and red wine pomace added diet on blood parameters and faces in piglets**

**Julia Sehm<sup>1</sup>, Dieter Treutter<sup>2</sup>, H. Lindermayer<sup>3</sup> and Michael Pfaffl<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Physiologie - Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL); Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW), Technische Universität München (TUM), D-85350 Freising, Germany

<sup>2</sup> Fachgebiet Obstbau - Weihenstephan, Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL); Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW), Technische Universität München (TUM), D-85350 Freising, Germany

<sup>3</sup> Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), D-85586 Poing-Grub, Germany

***\*Author for correspondence:***

Michael W. Pfaffl

Tel: +49-8161-713511

Fax: +49-8161-714204

E-mail: michael.pfaffl@wzw.tum.de

***Key words:***

Apple pomace, red wine pomace, piglets, blood, faces

**Abstract**

Polyphenols have not only anti-cancer effects, but also antimicrobial, anti-oxidative, anti-thrombotic, immune-modulated, anti-inflammatory, blood pressure dropping and blood-glucose-level dropping effects. Epicatechin and catechin are flavan-3-ols, B1, B2 and C1 are proanthocyanidins. These flavanoids are highly concentrated in different fruits and berries as well as in fruit pomace. In the feeding experiment the effect of three different diets- normal piglets starter without additives, with apple pomace respectively red-wine pomace, on blood parameters and bacterial flora in faces was investigated from weaning to three weeks post weaning in 36 piglets. Red wine pomace, gut content and tissues were analyzed with HPLC; we find polyphenols in gastrointestinal tract content and traces in tissues. Only some blood parameters were affected from the different diets. Hemoglobin and Hematocrit was down-regulated in all groups over testing period, the trend was greater in the two pomace groups. In pomace group there were more thrombocytes than in the standard group. The apple pomace fed groups showed a higher number of lactobacilli at the end of the investigation. We suppose that both polyphenol rich feedings have the potential to change positively the intestinal flora and blood parameters. ...

**Introduction**

The monomeric flavan-3-ols epicatechin and catechin and their oligomeric proanthocyanidins B1, B2 and C1 are high concentrated in several fruits and berries. Catechin and epicatechin are main phenolic compounds in grape seed (Palma and Taylor, 1999). These are also the major flavonoids present in grape skins in addition to various anthocyanins (Souquet et al., 2000). Polyphenols are likely to prevent cancer as well as cardiovascular diseases. They increase the plasma antioxidant capacity and are thought to inhibit oxidation of LDLs (Sembries et al., 2004). They reduce the systolic pressure and the level of plasma cholesterol, as shown in animal and

cohort studies. They inhibit platelet aggregation both in-vitro and in animal experiments and may thereby prevent thrombosis (Santos-Buelga and Scalbert, 2000).

Grapes contain a large amount of different phenolic compounds in skins, pulp and seeds, that are only partially extracted during wine making (Revilla and Rayn, 2000). So the pomace of apples and grapes has also a high concentration of these polyphenols (Boyer and Liu., 2004, Schieber et al., 2001). The world's apple production was about 61 million tons in 2004 (FAOSTAT), about 25% of the weight remained in pomace. Eighty-percent of the total polyphenols of apples remain in the pomace. As can be seen from the annual world production of 66 million tons in 2004, grapes are the world's largest fruit crop apart from oranges, with Italy, France, Spain, and the United States being among the most important producers (FAOSTAT). About 80% is used in winemaking (Mazza and Miniati, 1993). Because about 20% of the weight of grapes processed remains in pomace, some 10 million tons of byproducts annually results from wineries (Schieber et al., 2001). There is a great potential of feed additives in agriculture.

The byword "an apple a day keeps the doctor away" is commonly known, why shouldn't use this in agriculture?

EU laws against prophylactic use of antibiotics in animal feed have come into effect since January, 1st 2006 (Regulation 1831/2003/EC). It is generally accepted that all use of antibiotics may potentially result in antibiotic residues in the tissue of treated animals, but in recent years, the greatest concern has been of the use of antibiotics as growth promoters. Long-term use of antibiotics in animal diets may cause of resistant bacteria and strains, which then may be transferred to other bacteria, thus making them resistant (Aarestrup, 1999; Bach Knudsen, 2001). Four mechanisms have been suggested to underlie the effects of antibiotics on animal growth: inhibition of subclinical infections, reduction of growth-depressing microbial metabolites, reduction of microbial use of nutrients, and enhanced uptake of nutrients through a thinner intestinal wall (Francois, 1962; Visek, 1978; Anderson et al., 1999).

In this polyphenol approach two different flavanol rich feeding regimens were applied in 72 young growing piglets (freeze dried apple and red wine pomace). The effects of these diets on fecal flora, blood parameters and mRNA expression in blood cells were determined at four different time points around weaning. Additionally polyphenols were investigated via HPLC in pomace and gut content.

## **Material and methods**

### *Experiment and sampling*

In this study 36 cross breed piglets [Pietráin x (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)] were fed with three different feed compositions. The animals were housed at the experimental station Osterseeon (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Tierernährung und Futterwirtschaft). 12 animals were fed with a control standard weaning diet (SD) (50% wheat, 23% barley, 22% soy, 1% soy oil, 4% vitamins and minerals), 12 each got additionally apple pomace (APD) or red-wine pomace (RWP), each 3.5% dry mass in total (table 1). Energy, protein, fat and starch were balanced in all three diets. At weaning day (live day 31) and 19 days later (live day 50) 6 CD pigs, 6 AP and 6 RWP feed piglets were slaughtered. At weaning, piglets were grouped with identical age ( $31 \pm 1.8$  days), the same weight ( $7.5 \pm 1.1$  kg) and half male, half female in every group. Piglets were weighed at weaning (day 31) and at live day 50.

Pigs were killed by an electric gripper and exsanguinated. Meanwhile, two blood probes (coagulation prevented by addition of EDTA) were taken. A horizontal incision along the midline was made to open the abdominal cavity, and all the internal organs were excised. The gut content probes were taken from the colon. The empty body was weighted.

Samples from stomach intake, colon intake, liver, kidney and Ileum were collected for polyphenols analyses from the last time point from three RWP piglets. Additional, red wine pomace and piglet starter with red wine pomace was analysed. Samples were frozen at  $-20$  until polyphenol extraction.



Polyphenol samples were lyophilized for four days. One gram dry sample was mixed with 10ml 100 % MeOH and crushed with Ultra Turrax (Jahnke and Kunkel, IKA, Labortechnik, Germany). Additionally the piglet starter with red wine pomace was extracted with water and with HCl (pH 2). Then the mixture was treated 30 min in a 4 degrees cold ultrasonic bath and centrifuged 10 minutes at 4 degrees. The upper liquid was dropped into another cup and frozen at -20 until HPLC analyses. The polyphenol were analysed with HPLC in triplets.

#### *HPLC analyses:*

The HPLC equipment used consists of an autosampler (Gilson-Abimed Modell 231), of two pumps (Kontron Modell 422), and a diode array detector (Bio Tek Kontron 540). For post column derivatisation a further analytical HPLC pump (Gynkotek Modell 300 C) and a VIS-detector (640 nm, Kontron Detektor 432) were used. The column (250 x 4 mm I.D.) was prepacked with Shandon Hypersil ODS 3 µm. The solvents were 5% acetic acid (A) and methanol (B). Gradient range: 0-5 min, isocratic, 5% B in A; 5-10min, 5-10% B in A; 10-15min, isocratic, 10% B in A; 15-35 min, 10-15% B in A; 35-55min, isocratic, 15% B in A; 55-70 min, 15-20% B in A; 70-80 min, isocratic, 20% B in A; 80-95 min, 20-25% B in A; 95-125 min, 25-30% B in A; 125-145 min, 30-40% B in A; 145-160 min, 40-50% B in A; 160-175 min, 50-90% B in A, 175-195, isocratic, 90% B in A, 195-210, 90-5% B in A; 210-235 min, isocratic, 5% B in A (Treutter et al., 1994). Phenolic acids and flavonols were detected at 280nm whereas the flavan 3-ols were estimated at 640nm (Treutter, 1989) after post column derivatisation with p-dimethyl-aminocinnamic aldehyde (DMACA). 6-methoxyflavone was used as internal standard for quantitative analyses.

The single compounds were identified by retention times and their UV-absorbance spectra via diode array detection and by comparison with standards. These standards were either commercially available from Roth and Sigma (catechin, epicatechin, chlorogenic acid, phloridzin, rutin) or previously isolated from apple and service tree: procyanidins B1, B2, B5, E-

B5, C1, phloretin derivatives, hydroxycinnamic acids, quercetin glycosides (Mayr et al. 1995, Treutter et al. 1994, Ölschläger et al. 2004).

#### *mRNA extraction*

Blood probes were taken with EDTA (0.2 ml EDTA per 10 ml total blood) for blood cell extraction. For white blood cell separation, 10 ml-sampled blood was mixed with 10 ml lyses puffer (0.83 g NH<sub>4</sub>Cl, 3.7 mg Na-EDTA, 1 g KCl in 100 ml, pH 7.4) and centrifuged for 10 minutes at 220 g. The cell pellet was suspended in 10 ml lyses puffer and centrifuged again. The white blood cell pellet of the 10ml blood was then suspended in 100µl TriFast. Total RNA of these white blood cells was isolated using TriFast (Peqlab, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's instructions. To quantify the extracted RNA concentration, the optical density was determined in triplicates at three different dilutions of the final total RNA preparations at 260 nm. RNA integrity was verified by optical density OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> absorption ratio >1.80.

#### *Real-time one-step qRT-PCR*

Relative-quantification of mRNA concentration was carried out using a one-step quantitative RT-PCR (qRT-PCR) in the ep realplex Cyclyer (Eppendorf, Hamburg, Germany). To minimize pipetting errors an eight-channel pipetting robot epMotion 5075 (Eppendorf) was used. 25 ng mRNA in 1 µl volume was inserted as RT-PCR template. Further the master-mix components for the qPCR reactions [0.3 µl iScript (Bio-Rad, Munich, Germany), 0.225 µL (20 pmol) of forward and reverse primer (table 2) synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany), 7.5 µl 2x SYBR Green (Bio-Rad) and up to 14 µl water] was assembled by the robot. One-step qRT-PCR was performed with 40 cycles and product-specific annealing temperature, according to the manufactures cycle settings (Bio-Rad). The crossing points (CP) were acquired with the CT-method present in the Eppendorf analysis software. Amplification PCR products underwent a melting curve analysis after the last cycle to specify the integrity of amplification. Finally a

cooling step was performed. A relative-quantification was applied, using Histon H3 as reference gene and a panel of physiological marker genes (table 2). Single target genes mRNA expression were normalized by the constant Histon H3 gene expression, according to the  $\Delta\Delta\text{CP}$  method (Schmittgen, 2001, Livak and Schmittgen, 2001), described in the following equation:

$$\Delta\text{CP}_{(\text{Histon} - \text{marker gene})} = \text{CP}_{(\text{Histon})} - \text{CP}_{(\text{marker gene})}$$

In a second step, each  $\Delta\text{CP}$  value within one marker gene was compared with the mean expression CP of the control group at the first slaughter date:

$$\Delta\Delta\text{CP} = \text{CP}_{(\text{control})\text{day 31}} - \Delta\text{CP}_{(\text{Histon} - \text{marker gene})}$$

Positive  $\Delta\Delta\text{CP}$  values represent an up-regulation and negative  $\Delta\Delta\text{CP}$  values represent a down-regulation of the described mRNA gene expression, compared to the control group at day 31.

### *Hemogramm*

The second EDTA-blood sample (0.2 ml EDTA per 10 ml total blood) and one smear was send to a veterinary laboratory (vetmed labor, Ludwigsburg, Germany) and a blood screening was made. Erythrocyte, hematocrit, hemoglobin concentration, thrombocyte and differential white cell count were determined using the CELL-DYN 3700SL System (Abbott Diagnostika GmbH, Wiesbaden, Germany). Differential leukocyte populations were performed on blood smears stained with May Grünwald-Giemsa. HbE was also performed. The percentage of basophilic granulocytes, eosinophilic granulocytes, segmented and nonsegmented neutrophilic granulocytes, lymphocytes and monocytes were determined as well.

### *Bacterial examination of faces*

Additionally, chymus samples were taken from the colon immediately after slaughtering and stored on ice from the 18 piglets from the first and the last slaughtering group. A test for total

anaerobe and aerobic bacteria's was performed at the Tiergesundheitsdienst Bayern e.V.. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *E. coli* and *C. perfringens* were tested, too. One gram chymus was mixed with 9 ml PBS-solution. This mixture was diluted from  $10^1$  to  $10^{10}$ . Out of every dilution 0.1 ml was pipette at an agar. Agar plates with 3 to 300 bacteria were counted and the mean was calculated (Bollmann, 2002).

### *Statistical Evaluations*

Statistics was taken with Sigma Stat 2.03 (SPSS Science, Chicago, USA). Means were compared with two way ANOVA (diet group and different days). P values less than 0.05 were considered significant.

### *Results*

#### *Daily gain and body weight*

All animals remained healthy during the feeding experiment and no animal losses were registered. Some of the piglets excreted pasty faeces, but none of the pigs got ill and was treated for any disease. Energy and feed intake and average daily gain did not differ between dietary treatments. At the different slaughter dates the piglets weighed  $7.5 \pm 1.1$  kg and  $13.15 \pm 1.6$  kg. The three feeding groups showed no differences in live weight and daily gain. Therefore the empty body weight was not affected by the applied diets.

#### *Polyphenol analysis*

Figure 1 shows the results from the polyphenol analyses. Only the five main flavanols are shown, the monomers catechin and epicatechin and the procyanidins B1, B2 and C1. All five compounds were recovered in the stomach and colon content. In the tissues only traces of catechin, B1 and B2 could be detected.

The observed polyphenols are higher concentrated in gut content than in the mixed pomace diet. The extraction with water and with HCl (pH 2), respectively, yielded comparable proportions of the flavonoids, but even lower concentrations.

#### *mRNA expression and total RNA*

Extracted total RNA contents showed no significant variations in RNA integrity and quantity between analysed feeding groups. All tested genes were abundant in all tissues, showed single peaks in melting curve analysis (ep realplex software) and a single band in high-resolution 4% agarose gel electrophoresis (gels not shown). The housekeeping gene Histon H3 mRNA expression remained constant during the entire study and was affected neither by the time (p=0.770) nor by the diet treatments (p=0.615).

Five different marker genes were determinate in one step qRT-qPCR:

- |   |   |               |
|---|---|---------------|
| 1 | pro-inflammatory markers, apoptosis inducing markers: | TNF $\alpha$  |
| 2 | transcription factor:                                 | NF $\kappa$ B |
| 3 | anti-inflammatory marker:                             | IL10          |
| 4 | apoptotic marker:                                     | Caspase 3     |
| 5 | cell cycle markers:                                   | Cyclin D1     |
| 6 | reference gene:                                       | Histon H3     |

Within one time point there were no significant differences between the different diet groups. Between the different time points there were significant differences within the APD (table 3). TNF $\alpha$  (p=0.033), NF $\kappa$ B (p= 0.024) and Caspase 3 (p=0.019) mRNA expression increased significantly during treatment.

#### *Blood parameters*

Results from the investigation of blood parameters are summarized in table 4. The sex of the piglets had no significant influence on the different blood parameters. Only less nonsegmented neutrophilic granulocytes ( $0\pm 0$ ), basophilic ( $0.32\pm 0.78$ ) and eosinophilic granulocytes ( $0.48\pm 1.05$ ) were counted, so no statistic calculation was made with these parameters. The number of Erythrocytes was higher in the SD than in the APD at the end of the observed period ( $p=0,049$ ). The hemoglobin concentration decreased significantly over time in SD ( $p=0,015$ ), APD ( $p<0,001$ ) and RWPD group ( $p=0,005$ ), as well as hematocrit (SD  $p=0,001$ , APD  $p<0,001$ , RWPD  $p<0,001$ ). At the first time point we found more thrombocytes in RWPD than in SD ( $p=0,019$ ), at the second time point more thrombocytes in APD ( $p=0,042$ ) and RWPD ( $p=0,029$ ) than in SD. The number of thrombocytes decreased over time in SD ( $p=0,031$ ) and RWPD ( $p<0,001$ ), in APD it was only a trend.

#### *Bacterial examination of faces*

Table 5 summarized results of the bacterial examination of faces. *Streptococci* / *Enterococci* increased in the SD ( $p=0.002$ ) and in the RWPD ( $p=0.024$ ), whereas the APD ( $p=0.292$ ) showed no significant change. *C. perfringens* were not detectable at the second time point. The number of *lactobacillus* increased in APD ( $p<0,001$ ) and RWPD ( $p=0,033$ ). Within day 50, the numbers of *lactobacillus* in the APD and RWPD were higher ( $p<0.001$ ) than in SD.

#### *Discussion*

Weaning involves multiple changes in the physiology of piglets. In addition to the change from a liquid to solid diet, weaning is a time of stress for the weanling. First, as it is taken from the mother, second, as it is moved to a new building, and third, as it is exposed to numerous piglets other than its siblings and to their potentially aggressive behavior (Funderburke and Seerley, 1990). The adverse stressful effects of weaning may be due to psychological, environmental or nutritional factors (Funderburke and Seerley, 1990), and it is difficult to unravel the contributions

made by these factors. This is the cause of low dairy gain and piglet loss after weaning. To reduce and avoid the negative effects from weaning many feed additives are available. Our model combined different stressful events: weaning, psychological stress with the separation from the mother and mixing with non-littermates, and nutritional stress. In this investigation the effect of two polyphenol rich feedings on piglets' blood parameters and number of bacteria in colon content was tested. Five polyphenolic marker compounds which typically occur in grape pomace were measured in the food, in the gut content and in some tissues. The content of polyphenols in red grape pomace was comparable with published values (Santos-Buelga and Scalbert, 2000). Apple pomace contained about 80% of the polyphenols in apples (Stoll, 1997). Polyphenols that are not absorbed in the stomach or small bowel will be carried to the colon. In addition, polyphenols that are absorbed, metabolized in the liver and excreted in the bile or indirectly from the enterocyte back to the small intestine will also reach the colon but in a different chemical form, such as a glucuronide (Scalbert and Williamson, 2000). From liver the polyphenols can also reach the blood and thus tissues and organs (Scalbert and Williamson, 2000). The colon contains about  $10^{12}$  microorganisms/cm<sup>3</sup> and has enormous catalytic and hydrolytic potential. Deconjugation reactions readily occur. Many bacteria have the potential to metabolize polyphenols. So for example the number of bacteria able to use quercetin-glucoside was estimate to be  $10^7$  to  $10^9$ /g dry mass (Schneider et al, 1999).

The blood parameters were all in a normal range (Velik-Salchner et al., 2006), though the feeding regimes had an influence on the different parameters. Newborn pigs normally experience a decrease in hemoglobin concentration and hematocrit (Gomez et al., 1998). This decrease is attributed to the expansion of blood volume from absorbed colostrums (McCance and Widdowson, 1995), an increase in body size, and an increase in plasma volume (Jain, 1986). The results in this study are comparable. There are few studies to be found regarding the effect of winery and apple juice byproducts on the hematology. Bentivegna et al. (2002) investigated the effects of grape seed extract and grape skin extract in rats and found no clinical relevant changes

in hematology, as we also found hematological values in a normal range. The increase of leukocytes over all feeding groups during the experimental period, was in accordance with some other studies (Vellenga et al., 1986; Thorn).

The number of thrombocyte decreased the most all in the RWPD. Plant flavonoids are found to inhibit platelet adhesion, aggregation, and secretion and protect against cardiovascular diseases (Middleton et al, 2000; Folts, 2002).

The highest local concentration of polyphenols is found in the gut lumen (Santos-Buelga and Scalbert, 2000), so the greatest effects of the polyphenol rich feedings should be found in the gastrointestinal tract. The intestinal flora has been shown to have beneficial effects on the host's health, because the beneficial bacteria inhibit the proliferation of harmful bacteria and stimulate the host's immune system (Mitsuoka, 1992; Bezkorovainy, 2001). *Lactobacilli* and *bacteroidaceae* are composed of a member of the predominant flora of pigs. Results from the bacterial analysis demonstrate that feeding with apple pomace and red wine pomace tended to increase the number of total colonic bacteria with specific alteration observed in the number of *lactobacillus*, *streptococcus* and *enterococcus*. Hara et al. (1995) investigated an increase of the level of *lactobacilli* during tea polyphenol administration. The number of *clostridium perfringens* decreased with the age of the piglets (Hara et al., 1995), as investigated in our study.

Noxious bacteria including clostridia and enterobacteriaceae, may produce certain putrefactive substances (Bone et al., 1976; Vince et al., 1976) such as ammonia, amines, phenols and indole, resulting in suppression of growth. The changes in the composition of intestinal flora including the increase of lactobacilli and decrease of clostridia during APD and RWPD administration may therefore lead to a decrease in fecal putrefactive products.

We suppose that both polyphenol rich feedings have positive effects on the intestinal flora and blood parameters. That might be an explanation as to why the consumption of apple and wine has been shown to reduce colon cancer and cardiovascular diseases for example.



### *Acknowledgements*

This study was supported by the Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten, L/a-7606.2-494.

### *References:*

- Aarestrup, F.M., 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int J Antimicrob Agents*. 12,279-85.
- Anderson, D.B., McCracken, V.J., Aminov, R.I., Simpson, J.M., Mackie, R.I., Verstegen, M.W.A., Gaskins H.R., 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. *Nutr. Abstr. Rev., Series B*. 70,101-108.
- Bach Knudsen, K.E., 2001. Development of antibiotic resistance and options to replace antimicrobials in animals diets. *Proc. Nutr. Soc.* 60,291-299.
- Bentivegna, S.S., Whitney, K.M., 2002. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food Chem. Toxicol.* 40,1731-43.
- Bezkorovainy, A., 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73,399-405.
- Bollmann S., 2002. Untersuchungen zur Wirkung nichtantibiotischer Futterzusätze auf die Darmflora sowie den Verlauf einer experimentellen Escheria coli-bzw. Salmonella Derby-Infektion bei Schweinen. Dissertation., Tierärztliche Hochschule Hannover, in Germany with English abstract
- Bone, E., Tamm, A., Hill, M., 1976. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in causation of large bowel cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 29,1448-1454.
- Boyer, J., Liu, R.H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J.* 12,3:5.
- McCance, R.A., Widdowson, E.M., 1995. The effect of colostrums on the composition and volume of the plasma of newborn piglets, *J. Physiol.* 145,547-550.
- FAOSTAT-FAO Statistical Database, <http://faostat.fao.org/>
- Folts, J.D., 2002. Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 505,95-111.
- Francois, A.C., 1962. Mode of action of antibiotics on growth. *World Rev. Nutr. Diet.* 3, 21.
- Funderburke, D.W., Seerley R.W., 1990. The effects of postweaning stressors on pig weight change, blood, liver and digestive tract characteristics. *J. Anim. Sci.* 68,155-162.
- Gomez, G.G., Phillips, O., Goforth, R.A., 1998. Effect of immunoglobulin source on survival, growth, and hematological and immunological variables in pigs. *J. Anim. Sci.* 76,1-7.
- Hara, H., Orita, N., Hatano, S., Ichikawa, H., Hara, Y., Matsumoto, N., Kimura, Y., Terada, A., Mitsuoka, T., 1995. Effect of tea polyphenols on fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 57,45-9.

- Jain, N.C., 1986. Schlam's Veterinary Hematology (4th Ed.) Lea and Febiger, Philadelphia PA.
- Livak, K.J., Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method., *methods*. 25,402-408.
- Mayr, U.; Treutter, D.; Santos-Buelga, C.; Bauer, H.; Feucht, W. Developmental changes in the phenol concentrations of 'golden delicious' apple fruits and leaves. *Phytochem.* 1995, 38 (5), 1151-1155.
- Mazza, G., Miniati, E., 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. CRC Press Inc., Boca Raton
- Middleton, E. Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52,673-751.
- Mitsuoka, T., 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50,438-446.
- Ölschläger, C.; Milde, J.; Schempp, H.; Treutter, D. Polyphenols and antioxidant capacity of *Sorbus domestica* L. fruits. *J. Appl. Bot.* 2004, 78, 112-116.
- Palma, M., Taylor, L.T., 1999. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *J. Chromatogr. A.* 849,117-24.
- Revilla, E., Ryan, M., 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J. Chromatogr. A.* 881, 461-469.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Food Sci. Agric.* 80,1094-1117.
- Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130,2073-2085.
- Schieber A., Stintzing F.C., Carle R., 2001. By products of plant food processing as a source of functional compounds- recent developments. *Trends Food Sci. Technol.* 12,401-413.
- Schmittgen, T.D., 2001. Real time quantitative PCR, *methods*. 2001,383-385.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M.D., Blaut, M., 1999. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* 171,81-91.
- Sembries, S., Dongowski, G., Mehrlander, K., Will, F., Dietrich, H., 2004. Dietary fiber-rich colloids from apple pomace extraction juices do not affect food intake and blood serum lipid levels, but enhance fecal excretion of steroids in rats. *J. Nutr. Biochem.* 15,296-302.
- Sigma Stat, User's Manual, 1995, Version 5.0, Jandel Scientific Software, Chicago.
- Stoll, K., *Der Apfel*, 1997, Verlag Negiri, Zürich. In Germany.
- Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M., 2000. Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food. Chem.* 48,1076-80.

- Thorn, C.E., 2000. Normal hematology of the pig. In: Feldman BF., Zinkl JG, Jain NC (eds) Schalm's veterinary hematology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, 1089-1095.
- Treutter, D., Santos-Buelga, C., Gutmann, M., Kolodziej, H., 1994. Identification of flavan-3-ols and procyanidins by high-performance liquid chromatography and chemical reaction detection. *J. Chromatogr.* 667, 290-297.
- Vellenga, L., Wensing, T., Breukink, H.J., Hagens, F.H., 1986. Effects of irradiated sow colostrum on some biochemical and haematological measurements in newborn piglets. *Res. Vet. Sci.* 41.316-8.
- Velik-Salchner, C., Schnurer, C., Fries, D., Mussigang, P.R. Moser, P.L., Streif, W., Kolbitsch, C., Lorenz, I.H., 2006. Normal values for thrombelastography (ROTEM(R)) and selected coagulation parameters in porcine blood. *Thromb. Res.* 117,597-602.
- Vince, A., Down, P.F., Murison, J., Twigg, F.J., Wrong, O.M., 1976. Generation of ammonia from non-urea sources in a fecal incubation system. *Clin. Sci. Molec. Med.* 51,313-322.
- Visek, W.J., 1978. The mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.* 46. 1447,1469.

Table 1: Dry mass, protein, fat, fiber, Nfe (N-free extract), ME (metabolisable energy) of the fed diets in g per kg dry matter. The feeding was according to GFE and “Gruber Futterwerttabelle” ([www.lfl.bayern.de/Tierernahrung/schwein](http://www.lfl.bayern.de/Tierernahrung/schwein)).

	Dry matter	Crude Protein	Crude Lipids	Crude Fiber	NfE	ME
<b>feed</b>	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]	MJ
control diet (SD)	878.0	188.8	25.2	38.3	564.6	12.93
apple-pomace diet (APD)	880.0	182.7	25.2	42.6	571.6	12.95
red wine pomace diet (RWPD)	880.0	188.8	30.5	45.2	556.8	12.95

	Ca	P	Na	K	Mg	Cu	Zn	Lys	Met	Cys	Thr	Trp
<b>feed</b>	[g]	[g]	[g]	[g]	[mg]	[mg]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]	[g]
control diet (SD)	8,4	5,1	2,0	7,6	2,5	179,4	182,4	10,5	3,5	4,6	6,9	2,2
apple-pomace diet (APD)	8,5	5,0	2,0	7,4	2,5	157,2	184,8	10,9	3,2	4,3	6,8	2,1
red wine pomace diet (RWPD)	7,4	4,8	1,7	7,9	2,3	134,0	167,4	10,4	3,2	4,1	6,4	2,2

Table 2: Sequence of the used forward and reverse primers for one-step qRT-PCR.

<b>gene</b>	<b>forward primer</b>	<b>reverse primer</b>
Histon H3	act ggc tac aaa agc cgc tc	act tgc ctc ctg caa agc ac
TNF alpha	ccc cca gaa gga aga gtt tc	ttg gcc cct gaa gag gac
IL 10	act tta agg gtt acc tgg gtt g	gta gac acc cct ctc ttg ga
NFκB	ggt gga gaa ctt tga gcc tc	cca gag acc tca tag ttg tcc
Caspase3	tgt gtg ctt cta agc cat gg	agt tct gtg cct cgg cag
CyclinD1	tcc tgt gct gcg aag tgg a	ggt cca ggt agt tca tgg c

Table 3: The media and culture methods for comprehensive investigation of intestinal flora.

<b>Bacteria</b>	<b>Medium</b>	<b>Incubation method</b>
Aerobes	Columbia-Agar with 5% sheep blood	48h, 37°C, aerobe
Anaerobes	Zeißler-Agar	48h, 37°C, anaerobe
E. coli	Gassner-Agar	48h, 37h, aerobe
Streptococci / Enterococci	Edwards-Agar	48h, 37°C, aerobe
Lactobacilli	Method of de Man, Rogosa, Sharpe	48h, 37°C, anaerobe
Clostridium perfringens	Zeißler-Agar	48h, 37°C, anaerobe

Table 4: mRNA expression of blood cells was quantified with qRT-PCR. Data are shown as of  $\Delta\Delta CP$  values from day 31 and 50 (n=6; mean $\pm$ SD). 1 superscript indicates significant differences between treatment days ( $P < 0.05$ ), there were no significant differences between the feeding groups

Factor	Feeding group	blood	
		Day 31	Day 50
IL10	SD	0 $\pm$ 2.65	1.8 $\pm$ 2.28
	APD	0.63 $\pm$ 2.09	3.51 $\pm$ 0.91
	RWPD	1.95 $\pm$ 0.91	1.83 $\pm$ 1.09
TNF a	SD	0 $\pm$ 2.28	1.81 $\pm$ 2.41
	APD	<b>0.07<math>\pm</math>1.92<sup>1</sup></b>	<b>3.42<math>\pm</math>0.68<sup>1</sup></b>
	RWPD	2.13 $\pm$ 1.32	1.78 $\pm$ 1.68
NFkB	SD	0 $\pm$ 2.75	2.02 $\pm$ 2.55
	APD	<b>0.84<math>\pm</math>2.11<sup>1</sup></b>	<b>3.99<math>\pm</math>0.56<sup>1</sup></b>
	RWPD	3.03 $\pm$ 1.53	2.41 $\pm$ 1.13
Caspase 3	SD	0 $\pm$ 2.5	1.86 $\pm$ 2.76
	APD	<b>0.81<math>\pm</math>2.13<sup>1</sup></b>	<b>3.98<math>\pm</math>0.54<sup>1</sup></b>
	RWPD	2.29 $\pm$ 1	2.24 $\pm$ 1.01
Cyclin D1	SD	0 $\pm$ 2.16	2.11 $\pm$ 2.43
	APD	0.75 $\pm$ 2.13	3.82 $\pm$ 0.38
	RWPD	2.74 $\pm$ 1.32	2.3 $\pm$ 1.53

Table 5: Blood parameters (n=6; mean±SD).

<sup>1</sup> superscript indicates significant differences between treatment days (P < 0.05)

<sup>ab</sup> superscript indicates significant differences between feeding groups (P < 0.05)

	feeding group	Day 31	Day 50
Erythrocytes	SD	6.55±0.45	<b>6.58±0.71<sup>a</sup></b>
	APD	6.15±0.24	<b>5.83±0.46<sup>a</sup></b>
	RWPD	6.42±0.5	6.05±0.65
Hemoglobin	SD	<b>12.43±0.9<sup>1</sup></b>	<b>11.3±0.72<sup>1</sup></b>
	APD	<b>12.58±0.45<sup>1</sup></b>	<b>10.87±0.66<sup>1</sup></b>
	RWPD	<b>12.23±0.77<sup>1</sup></b>	<b>10.92±0.94<sup>1</sup></b>
Hematokrit	SD	<b>40.5±2.81<sup>1</sup></b>	<b>36±2.61<sup>1</sup></b>
	APD	<b>40.83±0.41<sup>1</sup></b>	<b>33.5±1.64<sup>1</sup></b>
	RWPD	<b>39.17±1.72<sup>1</sup></b>	<b>33.83±2.93<sup>1</sup></b>
Leukocytes	SD	16.05±3.01	19.92±3.17
	APD	14.35±4.24	17.65±3.12
	RWPD	<b>12.95±2.03<sup>1</sup></b>	<b>17.73±5.19<sup>1</sup></b>
segmented neutrophilic granulocytes	SD	60.17±16.93	59.67±9.44
	APD	65.17±7.57	62.83±17.58
	RWPD	54.67±12.26	60.5±15.29
Lymphocyte	SD	34±20.21	34.33±12.4
	APD	26.33±12.01	31.17±20.92
	RWPD	37±12.9	30.33±17.07
Monocyte	SD	2.5±3.51	3.33±5.05
	APD	7±4.38	3.83±4.75
	RWPD	2±4.43	7±4.65
Thrombocyte	SD	<b>299.1±146.48<sup>1a</sup></b>	<b>159.33±31.59<sup>1ab</sup></b>
	APD	413.33±110.58	<b>316.5±115.27<sup>a</sup></b>
	RWPD	<b>544.83±103.85<sup>1a</sup></b>	<b>300.83±98.68<sup>1b</sup></b>



Table 6: Bacterial figures on day 31 (weaning) and 50 of piglets fed with standard diet (SD), 3.5% apple pomace diet (APD) and 3.5% red wine pomace diet (RWPD). Values are means calculated (n = 6) of bacterial counts per gram of feces.

<sup>1</sup> superscript indicates significant differences between treatment days (P < 0.05)

<sup>ab</sup> superscript indicates significant differences between feeding groups (P < 0.05)

factor	feeding group	Day 31	Day 50
GKZ aerob	SD	3.39E+08 ± 2.48E+08	1.27E+09 ± 8.94E+08
KBE/g	APD	6.22E+08 ± 6.58E+08	1.97E+09 ± 6.88E+08
	RWPD	9.72E+08 ± 9.75E+08	2.49E+09 ± 3.67E+09
Streptokokken/ Enterokokken	SD	5.94E+07 ± 8.21E+07 <sup>1</sup>	9.09E+08 ± 9.18E+08 <sup>1</sup>
KBE/g	APD	5.06E+07 ± 5.11E+07	3.24E+08 ± 3.37E+08
	RWPD	4.07E+07 ± 3.28E+07 <sup>1</sup>	6.48E+08 ± 4.51E+08 <sup>1</sup>
E. coli	SD	1.21E+08 ± 2.69E+08	1.14E+08 ± 2.29E+08
KBE/g	APD	2.14E+08 ± 4.36E+08	9.07E+07 ± 1.67E+08
	RWPD	4.99E+08 ± 7.43E+08	2.21E+07 ± 2.34E+07
GKZ anaerob	SD	1.51E+09 ± 1.96E+09	1.65E+09 ± 1.08E+09
KBE/g	APD	1.29E+09 ± 1.03E+09	2.80E+09 ± 6.69E+08
	RWPD	9.33E+08 ± 1.01E+09	1.45E+09 ± 1.20E+09
Laktobacillus	SD	3.73E+08 ± 2.04E+08	1.58E+09 ± 8.45E+08 <sup>a</sup>
KBE/g	APD	9.63E+08 ± 3.87E+08 <sup>1</sup>	4.77E+09 ± 2.57E+09 <sup>1ab</sup>
	RWPD	6.25E+08 ± 4.80E+08 <sup>1</sup>	4.93E+06 ± 8.92E+06 <sup>1b</sup>
C. perfringens	SD	2.13E+06 ± 2.94E+06	n.d.
KBE/g	APD	2.53E+06 ± 3.36E+06	n.d.
	RWPD	7.40E+06 ± 1.04E+07	n.d.

Fig. 1: Content of the lead substances in red wine pomace, the red wine pomace diet, stomach and colon content and in the tissues of ileum, liver and kidneys in mg/g dry matter. The procyanidins C1, B2 and B1 and the monomer Epicatechin were calculated as Epicatechin, Catechin as Catechin.

