



UFOP-SCHRIFTEN | RAPSÖL & ERNÄHRUNG

ABSCHLUSSBERICHT

Rapsöl in der Therapie von Typ 2 Diabetes mellitus im Mausmodell:
Modulator der Endotoxinämie und Darmpermeabilität

Autoren

Prof. Dr. Ina Bergheim et al.

Universität Jena; Universität Wien

Rapsöl in der Therapie von Typ 2 Diabetes mellitus im Mausmodell: Modulator der Endotoxinämie und Darmpermeabilität

Abschlussbericht

Prof. Dr. Ina Bergheim^{1,2}

Weitere an der Bearbeitung des Projekts beteiligte Personen und Co-Autoren:

Janina Anna Engstler^{1,2}, Finn Jung^{1,2}, Dragana Rajcic², Cheng Jun Jin¹, Annette Brandt^{1,2}, Anja Baumann², Anika Nier^{1,2}, Victor Sanchez², Cathrin Sellmann¹

¹Friedrich-Schiller-Universität, Jena
Institut für Ernährungswissenschaften
LB Modellsysteme molekularer Ernährungsforschung
Dornburger Str. 25-29
D-07743 Jena

²Universität Wien
Department für Ernährungswissenschaften
Molekulare Ernährungswissenschaft
Althanstraße 14 (UZA II)
A-1090 Wien

Zusammenfassung

Weltweit ist die Prävalenz von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes in den letzten Jahren deutlich angestiegen. Nach wie vor zählen Lebensstil-Interventionen, die auf eine Reduktion der Energieaufnahme und eine Erhöhung der physischen Aktivität fokussieren zu den wesentlichen Ansätzen der Prävention aber auch der Therapie sowohl der Insulinresistenz als auch des Typ 2 Diabetes. Jedoch sind diese Ansätze häufig mit einer geringen Adhärenz und hohen Rückfallquoten behaftet. Die Ergebnisse epidemiologischer Studien und von tierexperimentellen sowie humanen Interventionsstudien weisen darauf hin, dass eine Veränderung der Fettzusammensetzung in der Ernährung und hierbei vor allem eine Veränderung des Zufuhrverhältnisses von n-3-/ n-6 Fettsäuren einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Insulinresistenz, Typ 2 Diabetes und damit assoziierter Erkrankungen haben könnte. Ob eine erhöhte Aufnahme von Rapsöl bei einem ansonsten unveränderten Ernährungsmuster einen Einfluss auf die Insulinresistenz hat und dieser sich von der Aufnahme von Olivenöl unterscheidet, und wenn ja, ob hier Veränderungen der Darmbarriere und der metabolischen Endotoxämie von Bedeutung sind, ist bisher nicht abschließend geklärt. Ausgehend von diesem Hintergrund war es das Ziel des Projekts in Modellsystemen des diätinduzierten Typ 2 Diabetes zu untersuchen, ob die Supplementation von Rapsöl das Voranschreiten eines diätetisch-induzierten Typ 2 Diabetes positiv beeinflusst und ob es hierbei einen Unterschied zur Aufnahme von Olivenöl gibt. Des Weiteren sollten die molekularen Mechanismen, die den protektiven Effekten von Rapsöl unterliegen, untersucht werden. Insgesamt weisen die Ergebnisse unserer Untersuchungen darauf hin, dass ein Austausch von Butterfett durch Rapsöl, weniger jedoch durch Olivenöl, das Voranschreiten der Insulinresistenz abmildert und auch Begleiterkrankungen wie die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) positiv beeinflusst. Hierbei scheint der protektive Effekt mit einer Wirkung des Rapsöls auf die Darmbarrierefunktion assoziiert zu sein. Ob eine Supplementation von Rapsöl jedoch auch beim Menschen ähnlich positive Effekte auf den Verlauf des Typ 2 Diabetes und der NAFLD hat und welche molekularen Mechanismen hierbei von Bedeutung sind, muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

1. Aufgabenstellung

1.1 Hintergrund und Stand der Forschung

In den letzten Jahrzehnten ist aufgrund der steten Zunahme der Prävalenz von Übergewicht und Adipositas auch die Zahl der Individuen mit assoziierten Erkrankungen wie Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes stark angestiegen [1, 2]. Die weltweit zunehmende Prävalenz von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes ist verbunden mit dramatischen gesundheitlichen und ökonomischen Problemen [3], da sowohl Insulinresistenz als auch Typ 2 Diabetes häufig mit dem Auftreten einer Reihe anderer teilweise schwerwiegender metabolischer Erkrankungen wie kardiovaskulären Erkrankungen, Hypertriglyzeridämie, und der nicht-alkohol bedingten Lebererkrankung (NAFLD) assoziiert sind [4, 5].

Bisher stellt eine Lebensstilintervention, die meist aus einer Kombination einer allgemeinen Reduktionsdiät und vermehrter physischer Aktivität besteht, die primäre Intervention zur Behandlung sowohl von Insulinresistenz als auch Typ 2 Diabetes dar. Hierbei kommt es jedoch nicht nur häufig zu hohen Rückfallquoten, sondern auch eine mangelnde Therapieadhärenz stellt ein Problem dar, insbesondere bei komplexen, massiven Lebensstilinterventionen [6]. Vor diesem Hintergrund sind neuere diabetische Interventionen wünschenswert, die weniger „invasiv“ bezüglich der Modifikation des Lebensstils sind. Einige Studien weisen darauf hin, dass die Gabe von ungesättigten Fettsäuren (UFA) einen positiven Einfluss auf den Verlauf und das Voranschreiten des Typ 2 Diabetes haben können. Die diesen positiven Effekten zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch nicht vollständig geklärt.

Fettsäuren, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus:

Die Befunde einer Reihe von Untersuchungen beim Menschen weisen darauf hin, dass sich eine Ernährung, die reich an einfach (MUFA) und mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ist, präventiv auf die Entstehung und das Voranschreiten des Typ 2 Diabetes beim Menschen auswirken kann [3, 7-9]. So deuten die Ergebnisse von Untersuchungen bei gesunden Personen darauf hin, dass der 3-monatige Verzehr einer MUFA-reichen Diät im Vergleich zum Verzehr einer SFA-reichen (gesättigte Fettsäuren) Diät die Insulinsensitivität deutlich verbessert [10]. Ähnliche positive Ergebnisse bezüglich der Insulinsensitivität fanden sich auch für den Austausch von SFA zu Gunsten von PUFA [11]. Weiterhin war der Verzehr einer Rapsöl-angereicherte Diät bei Typ 2 Diabetikern mit erhöhtem systolischem Blutdruck mit einer signifikanten Verbesserung des Glukosestoffwechsels assoziiert [12]. Jedoch sind die Ergebnisse der Humanstudien bisher nicht einheitlich. So fand sich kein Unterschied bezüglich der Insulinsensitivität bei gesunden übergewichtigen Teilnehmern, die während einer 8-wöchigen Intervention eine MUFA-reiche Diät oder eine „mediterrane“ Diät (reich an Olivenöl), verglichen zu einer SFA-reichen Diät verzehrten [13]. Welche molekularen Mechanismen der protektiven Wirkung einer MUFA-reichen Ernährung bezüglich der Insulinsensitivität unterliegen, konnte bisher auch nicht abschließend geklärt werden.

Rolle der intestinalen Mikrobiota, Darmbarrierefunktion und Endotoxinämie in der Entstehung der Insulinresistenz und von Typ 2 Diabetes mellitus

Die Ergebnisse einer inzwischen Vielzahl von Studien weisen darauf hin, dass die molekularen Mechanismen, die der Entstehung der Insulinresistenz und auch dem Typ 2 Diabetes unterliegen, multifaktoriell sind (zur Übersicht siehe auch [14]). Seit einigen Jahren sind hierbei auch eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota, der Darmbarrierefunktion und damit assoziiert eine sogenannte metabolische Endotoxinämie in den Vordergrund gerückt. So fanden sich sowohl bei Patienten mit Typ 1 als auch Typ 2 Diabetes mellitus erhöhte bakterielle Endotoxinspiegel im peripheren Blut und eine erhöhte Darmpermeabilität [15-17]. In eigenen Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass eine Verbesserung von Markern der Insulinresistenz mit einer Verringerung des bakteriellen Endotoxinspiegels im peripheren Blut assoziiert war [18]. Zum Einfluss von Rapsöl auf die Darmpermeabilität gibt es bisher nur wenige Untersuchungen. Diese weisen jedoch darauf hin, dass Rapsöl einen protektiven Effekt auf die mit der Aufnahme einer fettreichen Diät einhergehenden Endotoxinämie haben könnte [19]. Untersuchungen in Schweinen, die mit verschiedenen Fetten/ Ölen gefüttert wurden, weisen weiter darauf hin, dass die Fettsäurenverteilung in der Nahrung die Permeation von bakteriellem Endotoxin vom Darm ins Blut und die postprandiale Endotoxinämie beeinflusst [20]. So war die postprandiale Endotoxinämie nach einer Gabe von SFA-haltigem Fett verglichen zu UFA-haltigen Ölen erhöht [20].

Untersuchungen in Tiermodellen weisen auch darauf hin, dass die chronische Aufnahme einer Diät, die reich an SFA ist mit einem Verlust von Tight Junction Proteinen im Dünndarm, einer vermehrten Translokation von bakteriellem Endotoxin und einer Induktion von Toll-like Rezeptoren in der Leber, aber auch im viszeralen Fettgewebe assoziiert ist [21]. In eigenen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die chronische Aufnahme sowohl von Fett als auch von Fruktose im Mausmodell zu einem Verlust von Tight Junction Proteinen im Dünndarm führte, die mit erhöhten bakteriellem Endotoxinspiegeln im Pfortaderblut assoziiert war [22]. Die Untersuchungen von Cani *et al.* und anderen Arbeitsgruppen weisen ebenfalls darauf hin, dass die mittels einer sogenannten Hochfett-diät induzierten Störungen der Darmbarrierefunktion und Insulinresistenz in Mausmodellen mit deutlichen Veränderungen der intestinalen Mikrobiota assoziiert sind [23-25]. Weiterhin weisen die Befunde von Roopchand *et al.* darauf hin, dass eine verringerte Ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* im Caecum und Faeces mit einem Schutz vor metabolischen Erkrankungen und Insulinresistenz assoziiert ist [26]. Neuere Untersuchungen weisen weiter darauf hin, dass hierbei aber auch einzelne Bakterienarten eine entscheidende Rolle spielen können. Ob jedoch die Fütterung von Rapsöl eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota und damit der Darmbarrierefunktion nach sich zieht, ist bisher nicht geklärt.

Ausgehend von diesem Hintergrund war es das Ziel des Projekts den Einfluss einer oralen Gabe von Rapsöl auf die Entstehung und das Voranschreiten eines diätetisch-induzierten Typ 2

Diabetes (T2DM) im Mausmodell zu untersuchen. Hierbei wurde der primäre Fokus auf die Untersuchung des Einflusses von Rapsöl auf die intestinale Barrierefunktion und die metabolische Endotoxämie gelegt.

2. Material und Methoden

Für die Untersuchungen des therapeutischen Einflusses von Rapsöl auf die Entstehung von Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes erhielten weibliche C57BL/6J Mäuse zunächst über 8 Wochen hinweg eine flüssige Kontrolldiät (K) oder eine flüssige Western-style Diät (WSD). Für letztgenannte Diät, die reich an Butterfett, Fructose und Cholesterin ist, wurde bereits nachgewiesen, dass sie innerhalb dieses Zeitraums zu Störungen der Glucosetoleranz und beginnenden Insulinresistenz führt [27-29 und unpublizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe]. Ein Teil der Tiere, die eine WSD erhielten, bekam anstelle von reinem Butterfett eine Diät, die eine Mischung aus Butterfett und Sojaöl enthielt (siehe auch Tabelle 1 und Abbildung 1). Anschließend folgte eine 5-wöchige Therapiephase mit Rapsöl bzw. Olivenöl, wobei das Butterfett in den beiden Western-style Diäten durch Olivenöl oder Rapsöl ersetzt wurde (siehe Abbildung 1 und Tabelle 1). Drei Wochen nach Beginn der Therapie wurde bei einem Teil der Tiere entweder ein Glukosetoleranztest oder ein Insulintoleranztest durchgeführt. Der Ablauf des Tierversuchs und die Zusammensetzung der Diäten sind in Abbildung 1 und Tabelle 1 A und B zusammengefasst.

Nach 13 Wochen wurde unter terminaler Narkose Blut aus der Pfortader sowie Darm-, Leber-, Muskel- und Fettgewebe entnommen. Neben Parametern des Glukosestoffwechsels, die im Blut sowie in Leber- und Muskelgewebe untersucht wurden, untersuchten wir den Einfluss der verschiedenen „Therapien“ und hierbei insbesondere der Austausch von Butterfett mit Rapsöl auf Marker der Darmbarrierefunktion. Hierzu wurden sowohl kommerziell erhältliche Assays zur Messung von bakteriellem Endotoxin sowie molekularbiologische Methoden (Western blot, real-time RT-PCR) und immunohistochemische Färbungen verwendet.

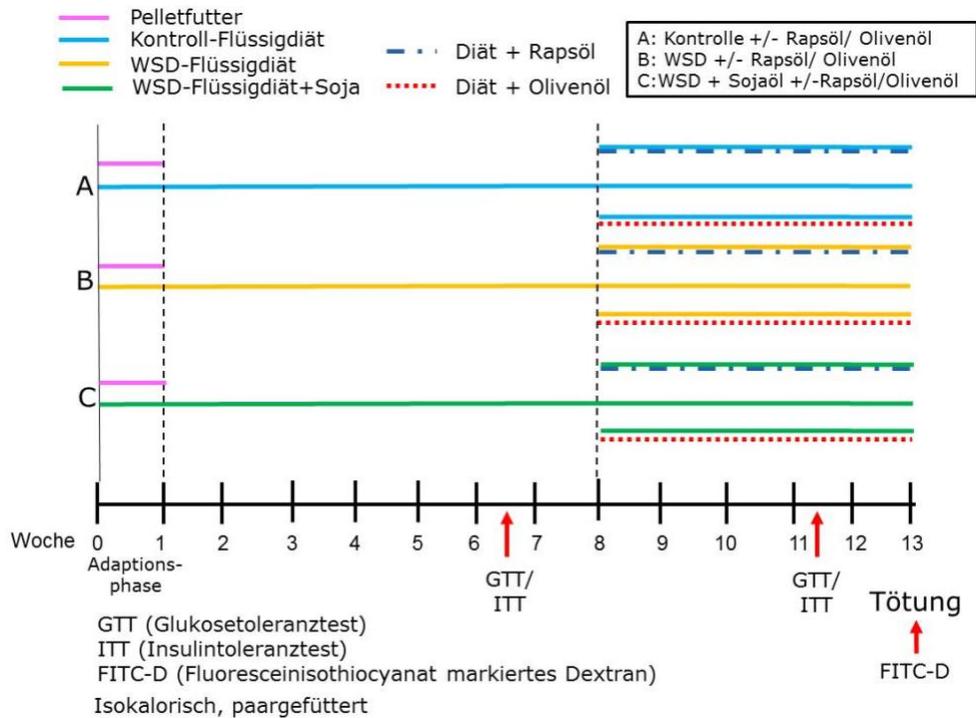


Abbildung 1: Schematischer Ablaufplan des tierexperimentellen Versuchsansatzes zur Untersuchung der therapeutischen Wirkung von Raps- und Olivenöl auf das Voranschreiten der Insulinresistenz im Mausmodell.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diäten, die (A) in den Wochen 1 bis 8 zur Induktion der Insulinresistenz gefüttert wurden und (B) in den Wochen 9-13, entsprechend der Therapiephase.

(A) Induktion der Insulinresistenz

	Kontrolle	WSD	WSD+Soja
Kohlenhydrate	69 E% ➤ davon 36% Stärke (wt/wt)	60 E% ➤ davon 50% Fruktose (wt/wt)	60 E% ➤ davon 50% Fruktose (wt/wt)
Fett	12 E% ➤ Sojaöl	25 E% Butterfett 0,155 % Cholesterin (wt/wt)	25 E% 21% Butterfett 4 % Sojaöl 0,155 % Cholesterin (wt/wt)
Protein	19 E%	15 E%	15 E%

E% = % der Gesamtenergie der Diät; wt/ wt = Gewicht/ Gewicht

(B) Therapie der Insulinresistenz

	Kontrolle	WSD	WSD+Soja
Kohlenhydrate	69 E% davon 36% Stärke (wt/wt)	60 E% davon 50% Fruktose (wt/wt)	60 E% davon 50% Fruktose (wt/wt)
Fett	12 E% ➤ Sojaöl oder ➤ Olivenöl oder ➤ Rapsöl	25 E% ➤ Butterfett oder ➤ Olivenöl oder ➤ Rapsöl + 0,155 % Cholesterin (wt/wt)	25 E% ➤ 21% Butterfett oder ➤ 21% Olivenöl oder ➤ 21% Rapsöl + 4 % Sojaöl + 0,155 % Cholesterin (wt/wt)
Protein	19 E%	15 E%	15 E%

E% = % der Gesamtenergie der Diät; wt/ wt = Gewicht/ Gewicht

3. Ergebnisse

Gewicht und Futtermittelaufnahme

Während der ersten 8 Wochen des Fütterungsversuchs unterschied sich weder die Kalorienaufnahme noch die Gewichtszunahme zwischen den Tieren, die eine WSD oder eine WSD mit Sojaöl-Zusatz erhielten. Nach 6-wöchiger Fütterung der Diät, war die Glucosetoleranz signifikant und im Trend auch die Insulintoleranz in den WSD-gefütterten Tieren trotz gleicher Gewichtszunahme schlechter als die der WSD+Sojaöl-gefütterten Mäuse. Im Vergleich zu den Kontrollen wiesen zu diesem Untersuchungszeitpunkt jedoch beide WSD-Gruppen eine signifikant schlechtere Insulin- und Glucosetoleranz auf. Auch während der `Therapiephase`, die in Woche 9 des Fütterungsversuchs begann und während der ein Teil der mit einer WSD- bzw. einer WSD+Sojaöl gefütterten Tiere anstellen von Butterfett Olivenöl oder Rapsöl in der Diät erhielten (siehe auch Tabelle 1 B und Abbildung 1), unterschied sich die mittlere Gesamtenergieaufnahme und Gewichtszunahme nicht zwischen den WSD-gefütterten Gruppen, unabhängig von den verschiedenen Fetten, die der Diät zugesetzt wurden. Jedoch war sowohl die Energieaufnahme als auch die Gewichtszunahme dieser Fütterungsgruppen signifikant höher als bei den Kontrollen. Es fanden sich zwischen den Kontrollgruppen keine Unterschiede bezüglich der Gewichtszunahme, der Glucose- oder der Insulintoleranz. Auch die Nüchtern-glucosewerte unterschieden sich nicht zwischen den drei Kontrollgruppen. Wie erwartet verschlechterte sich sowohl die Glucose- als auch die Insulintoleranz sowohl in den WSD- als auch WSD+Sojaöl-gefütterten Tieren weiter und war signifikant von den Kontrollgruppen verschieden (siehe Abbildung 2). Ähnlich verhielt es sich auch für die Nüchtern-glucosespiegel (siehe Tabelle 2). Interessanterweise war der Effekt der „normalen“ WSD auf diese Parameter ausgeprägter als bei der Fütterung einer mit Sojaöl angereicherten Diät. Aufgrund der Vielzahl an Gruppen und der Streuung innerhalb der Gruppen erreichten diese Unterschiede jedoch nicht immer das Signifikanzniveau. Weiterhin führte der

Austausch von Butterfett gegen Rapsöl sowohl bei den Tieren, die eine „normale“ WSD erhielten als auch bei denen, die eine mit Sojaöl angereicherte WSD bekamen, zu einer signifikanten Verbesserung der Glucosetoleranz und im Trend auch der Insulintoleranz im Vergleich zu den Tieren, die nur eine WSD erhielten. Ein ähnlicher Effekt fand sich für die Supplementation von Olivenöl nicht.

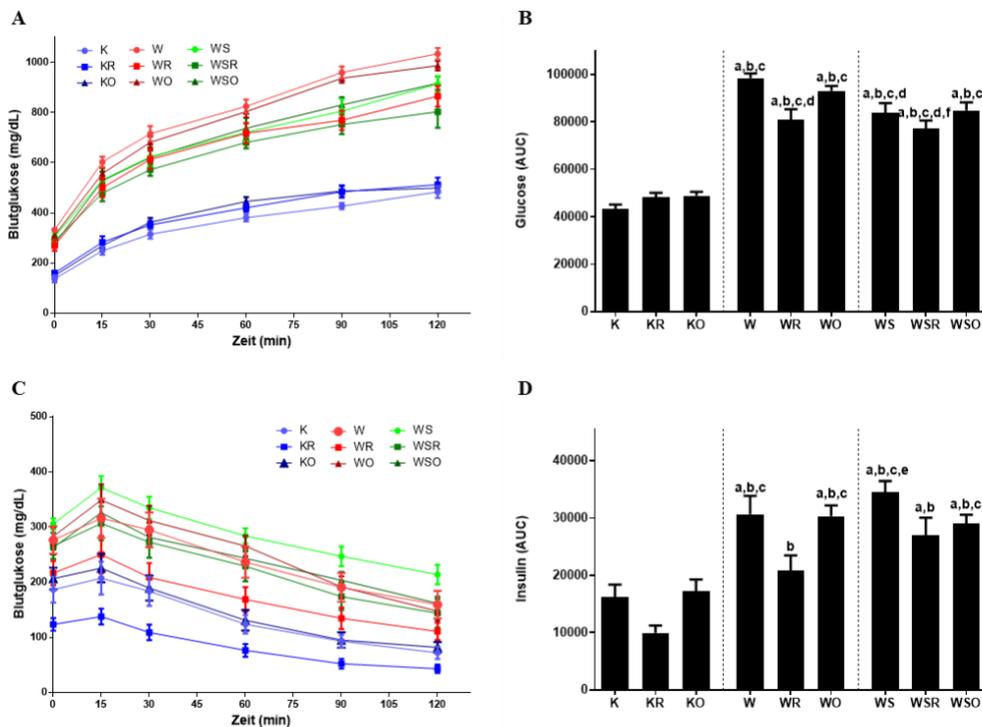


Abbildung 2: Einfluss der Supplementation von Oliven- und Rapsöl auf die WSD- und WSD-Sojaöl induzierte Insulinresistenz. (A) Kurvenverlauf des Blutglucosespiegels über 120 min und (B) Fläche unter der Kurve (AUC) von genücherten Mäusen, die einmalig 2g Glucose i.p./kg Körpergewicht erhielten und (C) Kurvenverlauf des Blutglucosespiegels über 120 min und (D) AUC von genücherten Mäusen, die einmalig 0,75 U Insulin i.p./kg Körpergewicht erhielten. Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt. $a_p < 0,05$ zu K, $b_p < 0,05$ zu KR, $c_p < 0,05$ zu KO, $a_p < 0,05$ zu W, $e_p < 0,05$ zu WR, $f_p < 0,05$ zu WO. K – Kontrolle, O – Olivenöl, R – Rapsöl, W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

Tabelle 2: Gewicht, Futtermittelaufnahme und nüchtern Blutglukose von Mäusen, die mit einer Kontrolldiät oder WSD bzw. WSD-Sojaöl gefüttert und mit Oliven- und Rapsöl supplementiert wurden.

	K	K+R	K+O	W	W+R	W+O	WS	WS+R	WS+O
Futtermittelaufnahme [kcal/g KG]	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,44 ± 0,01 _{a,b,c}	0,43 ± 0,01 _{a,b,c}	0,44 ± 0,01 _{a,b,c}	0,43 ± 0,01 _{a,b,c}	0,45 ± 0,01 _{a,b,c}	0,45 ± 0,01 _{a,b,c}
Gewichtszunahme [g]	3,6 ± 0,3	3,9 ± 0,2	3,9 ± 0,2	5,8 ± 0,4 _a	5,7 ± 0,4 _a	5,0 ± 0,5	5,5 ± 0,5 _a	5,8 ± 0,7 _{a,b}	5,5 ± 0,4 _a
Nüchtern Glucose [mg/dl]	137 ± 15	161 ± 11	150 ± 7,4	333 ± 5,4 _{a,b,c,e}	271 ± 22 _{a,b,c}	310 ± 11 _{a,b,c}	291 ± 13 _{a,b,c}	287 ± 19 _{a,b,c}	278 ± 13 _{a,b,c}

Daten sind dargestellt als MW ± SEM. ^ap<0,05 zu K, ^bp<0,05 zu KR, ^cp<0,05 zu KO, ^ep<0,05 zu WO. K – Kontrolle, O – Olivenöl, R – Rapsöl, W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

Tabelle 3: Expression von Markern der Insulinsignalkaskade im Muskelgewebe und Lebergewebe sowie von SREBP1 und FAS in Lebergewebe von Mäusen, die mit einer Kontrolldiät oder WSD bzw. WSD-Sojaöl gefüttert und mit Oliven- und Rapsöl supplementiert wurden.

	K	K+R	K+O	W	W+R	W+O	WS	WS+R	WS+O
IR (Muskel)	100 ± 12	71,7 ± 11	100 ± 17	66,7 ± 13	91,0 ± 21	95,6 ± 13	97,8 ± 15	102 ± 17	73,6 ± 19
IRS-2 (Muskel)	100 ± 37	55,0 ± 13	61,4 ± 13	55,5 ± 16	64,5 ± 11	55,3 ± 7,1	87,6 ± 25	37,2 ± 6,9	41,1 ± 9,5
IR (Leber)	100 ± 4,4	105 ± 17	69,0 ± 12	76,0 ± 6,3	71,0 ± 11	85,8 ± 17	107 ± 10	75,7 ± 14	59,6 ± 7,6
IRS-2 (Leber)	100 ± 15	94,2 ± 12	80,1 ± 10	66,6 ± 3,7	81,2 ± 11	94,0 ± 24,4	122 ± 15	75,2 ± 8,4	56,3 ± 7,4
SREBP1	100 ± 9,5	93,6 ± 13	101 ± 8,4	130 ± 17	96,0 ± 10	157 ± 27	117 ± 12	79,7 ± 6,6	85,1 ± 6,5
FAS	100 ± 15	216 ± 49	93,6 ± 22	617 ± 65 _{a,b,c}	423 ± 90 _{a,c}	483 ± 73 _{a,c}	386 ± 63	371 ± 109	152 ± 39 _{d,f}

Daten sind dargestellt als MW ± SEM. ^ap<0,05 zu K, ^bp<0,05 zu KR, ^cp<0,05 zu KO, ^ap<0,05 zu W, ^fp<0,05 zu WO. K – Kontrolle, FAS – *fatty acid synthase*, IR – Insulinrezeptor, IRS – Insulinrezeptor-Substrat, O – Olivenöl, R – Rapsöl, SREBP - *sterol regulatory element binding protein* W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

Parameter des Glucosemetabolismus und der Insulinsignalkaskade im Muskelgewebe und der Leber sowie des Fettmetabolismus in der Leber

Wie bereits für die Glucose- und Insulintoleranz in Abbildung 2 und Tabelle 2 gezeigt, unterschied sich auch die Expression des Insulinrezeptors (IR) und des Insulinrezeptorsubstrats (IRS) 2 sowie des Glucosetransporters (Glut 4) nicht zwischen den Kontrollgruppen. Aufgrund der teilweise starken Streuung innerhalb der Gruppen aber auch der Vielzahl an Gruppen verhielt es sich auch beim Vergleich der Kontrollgruppen und der mit einer WSD-gefütterten Gruppe ähnlich. Auch im Lebergewebe verhielt es sich ähnlich. Hier fand sich lediglich beim statistischen Vergleich der Kontrollgruppe, die keine zusätzlichen Öle in der Therapiephase erhalten hatte und der WSD-Sojaöl+Olivenöl-Gruppe ein signifikanter Unterschied, wobei in Letzt genannter Gruppe die Expression des IR um ca. 50% vermindert war (siehe Tabelle 3).

Die mRNA Expression von SREBP1 in der Leber unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Im Gegensatz dazu war die Expression der FAS sowohl in den Lebern der WSD-gefütterten Tiere als auch in den Lebern der Tiere, die zusätzlich mit Raps- oder Olivenöl behandelt wurden signifikant höher als in den Lebern der Kontrollen. Die mRNA Expression von FAS in der Leber der WSD+Sojaöl-gefütterten Tieren unterschied sich nicht signifikant von der, der Kontrollen. Jedoch war die mRNA Expression bei den Tieren, die eine WSD+Sojaöl erhielten und mit Olivenöl behandelten wurden signifikant niedriger als bei den Tieren, die nur eine WSD oder eine WSD+Olivenöl erhielten (siehe Tabelle 3).

Parameter der Leberschädigung und -entzündung

Wenngleich sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der untersuchten Parameter der Insulinsignalkaskade in der Leber fanden, zeigte sich in der histologischen Befundung der Leber ein deutlich therapeutischer Effekt der Behandlung der WSD-gefütterten Tiere mit Rapsöl (siehe auch Abbildung 3). So waren sowohl die Fetteinlagerung in der Leber als auch Zeichen der Entzündung (Zahl der Entzündungsherde) bei den mit Rapsöl behandelten Tieren, deutlich geringer. Dieser Effekt war in den mit einer mit Sojaöl angereicherten WSD weniger stark ausgeprägt. Ähnlich verhielt es sich auch bezüglich klinisch-chemischer Parameter. So war die Aktivität der ALT und der AST im Plasma der mit einer WSD-gefütterten Mäuse signifikant höher als in allen anderen Gruppen. Ein ähnlicher Unterschied fand sich nicht zwischen dem mit einer WSD+Sojaöl gefütterten Tieren und den anderen Behandlungsgruppen. Auch die Expression von $TNF\alpha$, die sich nicht zwischen den drei Kontrollgruppen unterschied, war in den Lebern der WSD-gefütterten Tiere im Trend um das ~2-fach höher als in den Lebern der Kontrollen. Dieser Effekt der Fütterung der WSD war bei den Tieren, die eine WSD+Sojaöl erhielten leicht abgeschwächt, ähnlich wie auch bei den Tieren, die ab der 9. Fütterungswoche ein mit Rapsöl oder Olivenöl angereichertes Futter erhielten. Insgesamt unterschieden sich jedoch die Gruppen aufgrund der interindividuellen Streuung nicht.

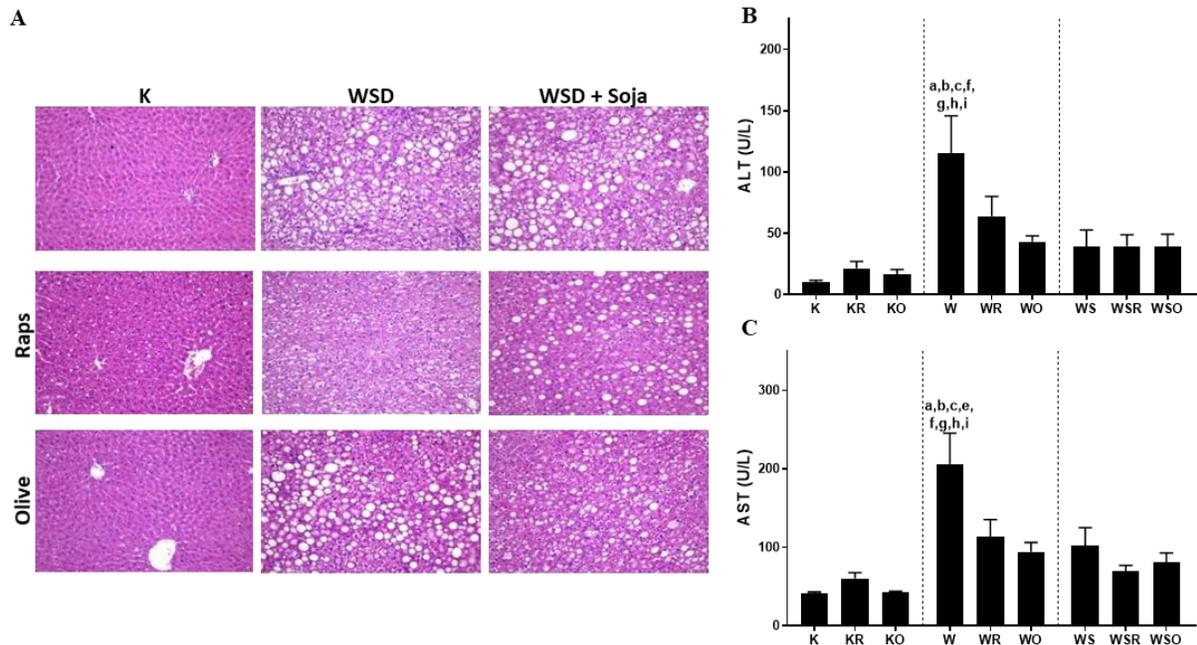


Abbildung 3: Einfluss der Supplementation von Oliven- und Rapsöl auf die WSD- und WSD+Sojaöl induzierte Leberschädigung. (A) Repräsentative Bilder der Leberhistologie der Tiere, (B) Aktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT) und (C) Aktivität der Aspartat-Aminotransferase (AST) im Plasma. Die Daten sind als MW \pm SEM dargestellt. $a_p < 0,05$ zu K, $b_p < 0,05$ zu KR, $c_p < 0,05$ zu KO, $e_p < 0,05$ zu WR, $f_p < 0,05$ zu WO, $g_p < 0,05$ zu WS, $h_p < 0,05$ zu WSR, $i_p < 0,05$ zu WSO. K – Kontrolle, O – Olivenöl, R – Rapsöl, W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

Marker der Lipidperoxidation und der TLR-4 Signalkaskade in der Leber

Die Konzentration von 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten, die als Marker der hepatischen Lipidperoxidation untersucht wurden, unterschied sich nicht zwischen den Kontrollgruppen. In den Lebern der WSD-gefütterten Tiere war die Konzentration deutlich höher als bei den Kontrollen. Ähnlich verhielt es sich auch für die Tiere, die eine mit Sojaöl angereicherte WSD erhielten. Auch hier war die Konzentration von 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten deutlich höher als bei den Kontrolltieren, jedoch unter dem Niveau der nur mit einer WSD-gefütterten Tiere. Der Zusatz von Rapsöl verminderte die Konzentration von 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten in der Leber, jedoch fand sich dieser Effekt nicht für den Zusatz von Olivenöl. Ähnlich verhielt es sich auch für die mRNA Expression von TLR-4 in den Lebern der Tiere, die in der WSD Rapsöl anstellen von Butterfett erhielten jedoch nicht für LBP. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von bakteriellem Endotoxin im Pfortaderblut der WSD-gefütterten Tiere unabhängig vom Zusatz von Sojaöl höher als in den Gruppen, deren Diäten mit Rapsöl angereichert war (siehe Abbildung 4, K ist repräsentative für alle Kontrollgruppen). Wenngleich sich bei der Untersuchung der intestinalen Barrierefunktion mittels der Gabe von FITC-Dextran keine Unterschiede zwischen den Gruppen fanden, war sowohl die Proteinkonzentration des Tight Junction Proteins Occludin als auch Claudin-2, die exemplarisch in n=4 Tieren im oberen Dünndarm untersucht wurde, in den mit einer WSD-gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen deutlich geringer (siehe Abbildung 5, K

ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen). Für das Tight Junction Protein Jam-1 fanden sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

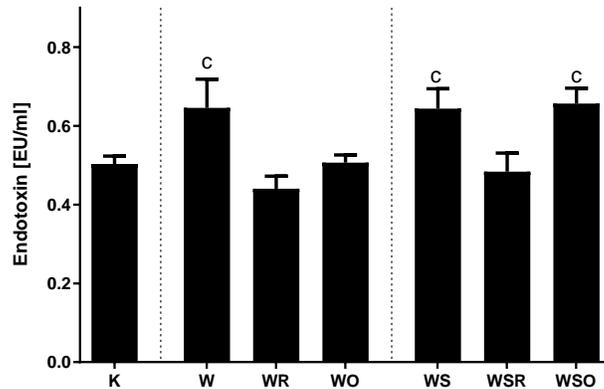


Abbildung 4: Einfluss der Supplementation von Oliven- und Rapsöl auf die Endotoxinkonzentration im Pfortaderblut von Tieren, die mit einer WSD- oder einer WSD+Sojaöl gefüttert wurden. K ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen (K, KR und KO). Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt. $p < 0,05$ zu WR. K – Kontrolle, O – Olivenöl, R – Rapsöl, W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

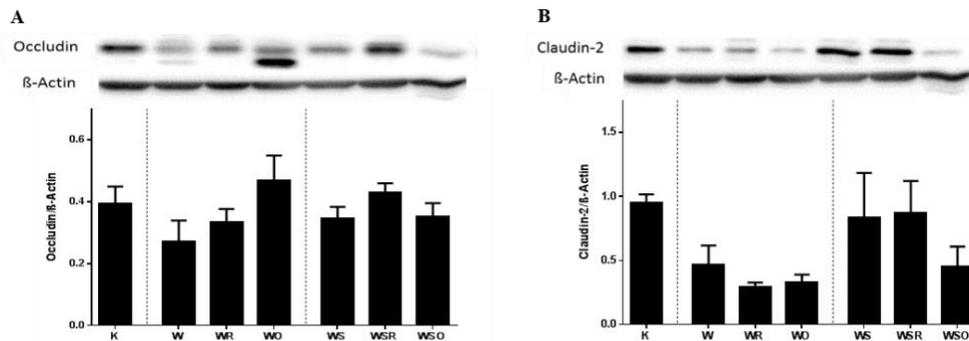


Abbildung 5: Exemplarische Untersuchung des Einflusses der Supplementation von Oliven- und Rapsöl auf Tight Junction Proteine im oberen Dünndarm von Tieren, die mit einer WSD- oder einer WSD+Sojaöl gefüttert wurden. (A) Exemplarischer Western blot des Tight Junction Proteins Occludin und densitometrische Auswertung (n=4/ Gruppe) und (B) exemplarischer Western blot des Tight Junction Proteins Claudin-2 und densitometrische Auswertung (n=4/ Gruppe). K ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen (K, KR und KO). Die Daten sind als MW ± SEM dargestellt. K – Kontrolle (steht repräsentativ für alle Kontrollgruppen), O – Olivenöl, R – Rapsöl, W – Western-style Diät, WS – WSD+Sojaöl.

4. Diskussion

Die Zahl der Personen, die an einer Insulinresistenz bzw. einem Typ 2 Diabetes leidet ist in den letzten Jahrzehnten weltweit deutlich gestiegen und es wird erwartet, dass die Prävalenz sowohl von Insulinresistenz als auch Typ 2 Diabetes in den nächsten Jahren noch weiter zunimmt [30]. Primärer Fokus in der Therapie und auch der Prävention dieser metabolischen Erkrankung ist eine Lebensstiländerung, die neben einer Erhöhung der physischen Aktivität vor allem auf eine Veränderung der Ernährungsgewohnheiten abzielt. Jedoch sind diese Lebensstiländerungen häufig mit einer mangelnden Adhärenz gegenüber den Empfehlungen und hohen Rückfallquoten behaftet. In den letzten Jahren weisen eine Reihe von Studien in Modellorganismen aber auch beim Menschen darauf hin, dass die Zufuhr bestimmter Fettsäuren und offenbar auch das Verhältnis der Zufuhr verschiedener Fettsäuren zu einander, nicht nur den Fettstoffwechsel sondern auch die Entstehung und das Voranschreiten metabolischer Erkrankungen positiv beeinflussen könnte [31, 32]. In der vorliegenden Studie wurde ein Tiermodell der diätetisch induzierten Insulinresistenz verwendet, um nicht nur den therapeutischen Einfluss von verschiedenen Ölen -Rapsöl, Olivenöl- bei einer bereits vorliegenden Insulinresistenz zu untersuchen, sondern auch die Wirkung der Zufuhr von n-3 und n-6 Fettsäuren auf die Entstehung der Insulinresistenz und damit assoziierter Erkrankungen zu ermitteln. Da die Tiere bei diesem Fütterungsmodell ihre Nahrung in flüssiger Form erhalten, war eine isokalorische Fütterung der Gruppen (hier der WSD oder WSD+Sojaöl gefütterten Gruppen) möglich und somit auch die Kontrolle eines aus einer unterschiedlichen Kalorienaufnahme resultierenden Effekts auf die untersuchten Parameter.

Die Fütterung der WSD führte bereits nach 6 Wochen zu einer deutlichen Verschlechterung der Glucose- und der Insulinresistenz, die bis zum Ende des Versuchs noch voranschritten. Interessanterweise waren die Veränderungen der Glucose- und Insulintoleranz bei den Tieren, die zusätzlich zur WSD Sojaöl in der Diät erhielten, deutlich weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den WSD-gefütterten Mäusen. Ähnlich verhielt es sich auch für die mRNA Expression des Insulinrezeptors im Muskel- und Lebergewebe und die Expression von Glut4 im Muskelgewebe, wohingegen sich die Expression von IRS-2 im Muskelgewebe zwischen den beiden WSD-Gruppen kaum unterschied. Ähnlich verhielt es sich auch für die Leberschädigung und Lipidperoxidation in der Leber, die bei den WSD+Sojaöl gefütterten Tieren deutlich weniger stark ausgeprägt bzw. induziert war. Es unterschieden sich jedoch die Endotoxinkonzentrationen in der Pfortader zwischen den beiden WSD-Gruppen nicht, so dass die protektiven Effekte der Supplementation von Sojaöl in der WSD wahrscheinlich nicht aus einer Verbesserung der Darmbarrierefunktion resultieren. Insgesamt stehen die Ergebnisse zur Insulinresistenz und Leberschädigung im Gegensatz zu den Ergebnissen von Henkel et al. die nachweisen konnten, dass eine kombinierte 20-wöchige Gabe von Sojaöl und Cholesterin im Vergleich zur Fütterung einer Kombination aus Schweineschmalz, Fructose und Cholesterin zu einer deutlich ausgeprägteren Leberschädigung mit beginnender Fibrose führt, sowie einer deutlichen Verminderung der Expression von IRS2 im Lebergewebe im Vergleich zu den Kontrollen [33]. Unterschiede zwischen unserer Untersuchungen und denen von Henkel et al. könnten sich aus dem deutlich höheren Anteil an

Sojaöl (Henkel et al.: 25g / 100g n-6- PUFA vs. 4% Energieprozent) und Cholesterin (0,75% Cholesterin bei Henkel et al. vs. 0,15% (wt/wt) in der vorliegenden Studie) sowie der längeren Fütterungsdauer (20 Wochen bei Henkel et al. vs. 13 Wochen in der vorliegenden Studie) und dem Geschlecht der Tiere (männlich bei Henkel et al. vs. weiblich in der vorliegenden Studie) ergeben haben [33]. In den Untersuchungen von Deol et al. resultierte die hohe Gabe von Sojaöl und Fructose im Rahmen einer Hochfettdiät (40 E% als Fett, davon 19 E% Sojaöl und 21 E% Kokosfett) in einer deutlich stärkeren Insulinresistenz und Leberschädigung als die Fütterung von einer Kombination aus Kokosfett (40 E% als Fett, davon 36 E% Kokosfett, 4 kcal% Sojaöl) und Fructose [34]. Ob jedoch der Effekt einer reinen Kokosfett-Diät auf die untersuchten Parameter stärker gewesen wäre, wurde in der Studie nicht untersucht. Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass die Fütterung von 4E% Sojaöl in einer Fett-, Fructose- und Cholesterinreichen Diät einen positiven Effekt auf die Entstehung der Insulinresistenz und hierbei vor allem die Insulinsignalkaskade im Muskelgewebe sowie der NAFLD hat. Ob jedoch höhere Konzentrationen von Sojaöl diesen protektiven Effekt aufheben sowie die dem protektiven Effekt zugrundeliegenden Mechanismen, muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

Der Austausch des Butterfetts mit gleichen Mengen Rapsöl verbesserte sowohl bei den Tieren, die weiterhin eine „normale“ WSD bekamen als auch bei den Tieren, die eine WSD+Sojaöl erhielten die Glucose- und die Insulintoleranz aber auch den Leberstatus. Ähnliche Effekte fanden sich für die Supplementation von Olivenöl nicht. Der positive Effekt von Rapsöl auf den Glucosstoffwechsel und die Leber war mit einer leicht erhöhten mRNA Expression des Insulinrezeptors im Muskelgewebe assoziiert bei den Tieren, die eine „normale“ WSD erhielten. Auch in den Untersuchungen von Kruse et al. 2014 fand sich bei Übergewichtigen nach der Supplementation von Rapsöl eine deutliche Verbesserung von Parametern des Glucosstoffwechsels (Nüchtern-glucose und Nüchteninsulin) und des Leberstatus (Aktivität der ALT und AST im Serum), wohingegen ähnlich den Ergebnissen der vorliegenden Studie, die Effekte der Supplementation von Olivenöl auf diese Parameter deutlich weniger stark ausgeprägt waren [35]. Die protektiven Effekte der Supplementation von Rapsöl in der vorliegenden Studie scheinen jedoch nicht primär aus Veränderungen des hepatischen Lipidmetabolismus zu resultieren. So unterschied sich die Expression von SREBP1 nicht zwischen den Gruppen. Im Gegensatz dazu war die Expression von FAS in den Lebern aller WSD-gefütterten Tiere mit Ausnahme der Tiere, die eine WSD+Sojaöl und Olivenöl erhalten hatten, deutlich höher als in den Kontrollen, jedoch unterschieden sich die WSD-gefütterten Gruppen ansonsten nicht. Diese Ergebnisse sind ähnlich denen anderer, die ebenfalls bei einer längerfristigen Aufnahme von Rapsöl bei Nagern keine deutliche Änderung der SREBP1 oder FAS mRNA Expression in der Leber im Vergleich zur Aufnahme anderer Öle wie beispielsweise Sonnenblumenöl nachweisen konnten [36].

Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen darauf hin, dass Veränderungen der intestinalen Mikrobiota und der Darmbarrierefunktion eine wesentliche Rolle in der Entstehung metabolischer

Erkrankungen spielen (zur Übersicht siehe auch [37, 38]). In eigenen Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass eine mehrwöchige Aufnahme einer WSD mit einer deutlichen Verminderung von Tight Junction Proteinen im oberen Dünndarm sowie erhöhten Endotoxinspiegeln im Pfortaderblut bei Mäusen einhergeht [27-29, 39-41]. Damit assoziiert war auch eine Induktion der TLR-4 Signalkaskade in der Leber, eine Induktion der iNOS und erhöhte 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten Konzentrationen in der Leber sowie teilweise Veränderungen der Insulinsignalkaskade in der Leber [27, 28, 40, 41]. Ein Schutz vor dem Verlust von Tight Junction Proteinen im oberen Dünndarm war hierbei immer auch mit verminderten Endotoxinspiegeln im Pfortaderblut, aber auch einem verbesserten Leberstatus, Normalisierung der TLR-4-Signalkaskade und einer Verminderung der Konzentration von 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten in der Leber assoziiert [27-29, 39, 40]. Im vorliegenden Projekt ging der protektive Effekt der Supplementation von Rapsöl sowohl bei den Tieren, die eine „normale“ WSD erhielten als auch bei denen, die eine WSD mit Sojaöl bekamen mit einer Verminderung der bakteriellen Endotoxinspiegel im Pfortaderblut fast bis auch das Niveau der Kontrollen einher. Ähnlich verhielt es sich auch für die Konzentration von 4-Hydroxynonenal Proteinaddukten in der Leber, wohingegen sich die mRNA Expression von LBP zwischen den Gruppen unterschied. Jedoch weisen die Untersuchungen anderer darauf hin, dass LBP nicht ausschließlich auf mRNA-Ebene reguliert wird (zur Übersicht siehe [42]). Die exemplarischen Untersuchungen der Tight Junction Proteine weisen darauf hin, dass der protektive Effekt eventuell aus einem weniger starken Verlust von Tight Junction Proteinen resultiert sein könnte. Hierzu müssen im Rahmen des Projekts noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Auch die Untersuchungen anderer weisen darauf hin, dass das Verhältnis von n-3/ n-6 PUFA einen wesentlichen Einfluss auf die Glucosetoleranz, die Entstehung der Insulinresistenz sowie die Expression von Entzündungsparameter und die Aktivierung der TLR-4 Signalkaskade haben kann [43]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen nicht bestimmt, ob der positive Effekt der Gaben von n-3/ n-6 PUFA im Verhältnis 1:1 mit Veränderungen der Darmbarrierefunktion assoziiert war.

5. Schlussfolgerungen

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen drauf hin, dass ein Austausch der Fettquelle (Butterfett gegen Raps- oder Olivenöl) auch bei ansonsten gleichbleibender Zusammensetzung der Nährstoffzufuhr das Voranschreiten der Insulinresistenz und damit assoziierter metabolischer Erkrankungen wie der NAFLD deutlich abmildert. Hierbei waren die Effekte der Supplementation von Rapsöl deutlich ausgeprägter als die bei einer vergleichbaren Gabe von Olivenöl. Der positive Effekt der Gabe von Rapsöl scheint sich hierbei auch aus einer Wirkung des Öls auf die Darmbarrierefunktion zu ergeben. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen nötig, um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu klären und ob ähnliche Effekte auch beim Menschen auftreten. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen auch darauf hin, dass auch der Zusatz von Sojaöl in geringen Mengen einen Einfluss auf die Entstehung der Insulinresistenz haben könnte. Auch hier sind weiterführende

Untersuchungen nötig, um die molekularen Mechanismen zu klären und zu untersuchen, ob ähnliche Effekte auch beim Menschen auftreten.

6. Quellenangabe

1. Forouhi, N.G., et al., *Association of Plasma Phospholipid n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids with Type 2 Diabetes: The EPIC-InterAct Case-Cohort Study*. PLoS Med, 2016. **13**(7): p. e1002094.
2. Nguyen, D.M. and H.B. El-Serag, *The epidemiology of obesity*. Gastroenterol. Clin. North Am, 2010. **39**(1): p. 1-7.
3. Schwab, U., et al., *Effect of the amount and type of dietary fat on cardiometabolic risk factors and risk of developing type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer: a systematic review*. Food Nutr Res, 2014. **58**.
4. Ahmed, M.H., N.E. Husain, and A.O. Almobarak, *Nonalcoholic Fatty liver disease and risk of diabetes and cardiovascular disease: what is important for primary care physicians?* J Family Med Prim Care, 2015. **4**(1): p. 45-52.
5. Vollenweider, P., A. von Eckardstein, and C. Widmann, *HDLs, diabetes, and metabolic syndrome*, in *High Density Lipoproteins*. 2015, Springer. p. 405-421.
6. Dunkley, A.J., et al., *Diabetes prevention in the real world: effectiveness of pragmatic lifestyle interventions for the prevention of type 2 diabetes and of the impact of adherence to guideline recommendations: a systematic review and meta-analysis*. Diabetes Care, 2014. **37**(4): p. 922-33.
7. Djousse, L., et al., *Dietary omega-3 fatty acids and fish consumption and risk of type 2 diabetes*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(1): p. 143-50.
8. Khemayanto, H. and B. Shi, *Role of Mediterranean diet in prevention and management of type 2 diabetes*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(20): p. 3651-6.
9. Wu, J.H., et al., *Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Br J Nutr, 2012. **107 Suppl 2**: p. S214-27.
10. Vessby, B., et al., *Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study*. Diabetologia, 2001. **44**(3): p. 312-9.
11. Summers, L.K., et al., *Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity*. Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 369-77.
12. Jenkins, D.J., et al., *Effect of lowering the glycemic load with canola oil on glycemic control and cardiovascular risk factors: a randomized controlled trial*. Diabetes Care, 2014. **37**(7): p. 1806-14.
13. Bos, M.B., et al., *Effect of a high monounsaturated fatty acids diet and a Mediterranean diet on serum lipids and insulin sensitivity in adults with mild abdominal obesity*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(8): p. 591-8.
14. Soumaya, K., *Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Diabetes*, in *Diabetes: An Old Disease, a New Insight*, S.I. Ahmad, Editor. 2013, Springer New York: New York, NY. p. 240-251.
15. Al-Attas, O.S., et al., *Changes in endotoxin levels in T2DM subjects on anti-diabetic therapies*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**.

16. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
17. Devaraj, S., et al., *Increased levels of ligands of Toll-like receptors 2 and 4 in type 1 diabetes*. Diabetologia, 2009. **52**(8): p. 1665-8.
18. Volynets, V., et al., *A moderate weight reduction through dietary intervention decreases hepatic fat content in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a pilot study*. Eur J Nutr, 2013. **52**(2): p. 527-35.
19. Laugerette, F., et al., *Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(3): p. E374-86.
20. Mani, V., J.H. Hollis, and N.K. Gabler, *Dietary oil composition differentially modulates intestinal endotoxin transport and postprandial endotoxemia*. Nutr Metab (Lond), 2013. **10**(1): p. 6.
21. Kim, K.A., et al., *High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47713.
22. Sellmann, C., et al., *Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time*. J Nutr Biochem, 2015. **26**(11): p. 1183-92.
23. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-1772.
24. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
25. Daniel, H., et al., *High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice*. Isme j, 2014. **8**(2): p. 295-308.
26. Roopchand, D.E., et al., *Dietary Polyphenols Promote Growth of the Gut Bacterium Akkermansia muciniphila and Attenuate High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome*. Diabetes, 2015. **64**(8): p. 2847-2858.
27. Jin, C.J., et al., *Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice*. J Gastroenterol Hepatol, 2017. **32**(3): p. 708-715.
28. Jin, C.J., et al., *Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)*. Br J Nutr, 2015. **114**(11): p. 1745-55.
29. Sellmann, C., et al., *Oral citrulline supplementation protects female mice from the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Eur J Nutr, 2016.
30. IDF, *IDF Diabetes Atlas*. 2015, International Diabetes Federation. www.diabetesatlas.org.
31. Gulati, S. and A. Misra, *Abdominal obesity and type 2 diabetes in Asian Indians: dietary strategies including edible oils, cooking practices and sugar intake*. Eur J Clin Nutr, 2017.
32. Huang, C.W., et al., *Role of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Ameliorating the Obesity-Induced Metabolic Syndrome in Animal Models and Humans*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(10).
33. Henkel, J., et al., *Induction of steatohepatitis (NASH) with insulin resistance in wildtype B6 mice by a western-type diet containing soybean oil and cholesterol*. Mol Med, 2017. **23**.
34. Deol, P., et al., *Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver*. PLoS ONE, 2015. **10**(7): p. e0132672.

35. Kruse, M., et al., *Dietary rapeseed/canola-oil supplementation reduces serum lipids and liver enzymes and alters postprandial inflammatory responses in adipose tissue compared to olive-oil supplementation in obese men*. Mol Nutr Food Res, 2015. **59**(3): p. 507-19.
36. Rincón-Cervera, M.Á., et al., *Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA), 2016. **111**: p. 25-35.
37. Bouter, K.E., et al., *Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction*. Gastroenterology, 2017. **152**(7): p. 1671-1678.
38. Winer, D.A., et al., *Immunologic impact of the intestine in metabolic disease*. J Clin Invest, 2017. **127**(1): p. 33-42.
39. Engstler, A.J., et al., *Treatment with alpha-galactosylceramide protects mice from early onset of nonalcoholic steatohepatitis: Role of intestinal barrier function*. Mol Nutr Food Res, 2017. **61**(5).
40. Sellmann, C., et al., *Oral arginine supplementation protects female mice from the onset of non-alcoholic steatohepatitis*. Amino Acids, 2017.
41. Sellmann, C., et al., *Oral Glutamine Supplementation Protects Female Mice from Nonalcoholic Steatohepatitis*. J Nutr, 2015. **145**(10): p. 2280-6.
42. Chilton, P., C. Embry, and T. Mitchell, *Effects of Differences in Lipid A Structure on TLR4 Pro-Inflammatory Signaling and Inflammasome Activation*. Frontiers in Immunology, 2012. **3**(154).
43. Liu, H.Q., et al., *A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats*. Nutr Res, 2013. **33**(10): p. 849-58.