



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss von Hafer β -Glucan auf das Ernährungsmuster,
inflammatorische Marker und die intestinale Barriere:
Untersuchungen bei gesunden, normalgewichtigen
Frauen“

verfasst von / submitted by

Markus Oberlercher, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2022 / Vienna, 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dipl. oec. troph. Dr. Ina Bergheim,
Privatdoz.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei Prof. Dr. Bergheim für die großartige Unterstützung während sämtlicher Phasen der Masterarbeit bedanken. Vielen Dank, dass Sie es mir auch während der äußerst schwierigen und herausfordernden Umstände der Jahre 2021 und 2022 ermöglicht haben, ohne Zeitverlust voranzukommen und mir stets wertvolle Anregungen und Tipps gegeben haben.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamten Team von Prof. Dr. Bergheim für das sehr angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung bei den Versuchen und der Hilfe bei organisatorischen Fragen bedanken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Annette Brandt, die mir bei allen Versuchen im Labor und bei Fragen während der Auswertung immer unterstützend zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Familie, meiner Verlobten und sämtlichen Arbeitskollegen und -kolleginnen bedanken, ohne deren Unterstützung, Geduld und Hilfsbereitschaft die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ein weiteres herzliches Dankeschön geht an Fr. Barbara Dixer und Dr. Rainer Schmid für die grammatikalischen Korrekturen und an Fr. Mag. Ursula Posratschnig, MA für die Korrektur der englischen Zusammenfassung.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Einfluss von Hafer β - Glucan auf das Ernährungsmuster, inflammatorische Marker und die intestinale Barriere: Untersuchungen bei gesunden, normalgewichtigen Frauen“

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, sowie alle wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen aus anderen Schriften als solche kenntlich gemacht sind. Darüber hinaus versichere ich, dass die eingereichte Arbeit weder vollständig noch in wesentlichen Teilen Gegenstand eines anderen Prüfungsverfahrens gewesen ist.

Wien, April 2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Ballaststoffe in der Humanernährung: Rolle von Beta-Glucanen aus Hafer.....	1
1.2 Bakterielle Toxine als Modulatoren des Immunsystems und von Entzündungen beim Menschen	4
1.3 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit.....	6
2. Materialien.....	7
2.1 ELISA zur Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma.....	7
2.2 hTLR2/hTLR4 Reporter Assay.....	7
2.3 Proteinbestimmung nach Bradford.....	8
2.4 CD14 Western Blot.....	9
2.5 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	11
2.6 Software.....	11
3. Methoden.....	12
3.1 Beschreibung der Pilotstudie.....	12
3.2 Auswertung der Ernährungstagebücher.....	16
3.3 ELISA zur Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma.....	19
3.4 hTLR2/hTLR4 Reporter Assay.....	21
3.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
3.6 CD14 Western Blot.....	23
3.7 Statistische Auswertung.....	27

4. Ergebnisse.....	28
4.1 Charakteristik der Studienteilnehmerinnen.....	28
4.2 Analyse der Nährstoffaufnahmen und des Ernährungsmusters der Studienteilnehmerinnen.....	28
4.3 Healthy Eating Index und Healthy Beverage Index der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie.....	32
4.4 Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie.....	33
4.5 Bestimmung von hTLR2- und hTLR4-Liganden im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie.....	34
4.6 Bestimmung der Konzentration von sCD14 im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie.....	35
5. Diskussion.....	36
5.1 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Aufnahme von Lebensmittelgruppen, Nährstoffen und Gesamtkalorien.....	37
5.2 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Punktwerte von HEI und HBI.....	38
5.3 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf Marker der intestinalen Permeabilität im Plasma.....	39
5.4 Fazit und Ausblick.....	41
6. Zusammenfassung.....	43
7. Summary.....	44
Literaturverzeichnis.....	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Grundstruktur von Beta-Glucan aus Hafer
Abbildung 2:	Ablaufschema der Pilotstudie
Abbildung 3:	Versuchsablauf PAI-1 ELISA
Abbildung 4:	Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE
Abbildung 5:	Schema eines blotting sandwich
Abbildung 6:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die durchschnittliche Energiezufuhr
Abbildung 7:	Einfluss der Interventionen auf die durchschnittliche Ballaststoffzufuhr
Abbildung 8:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf den Healthy Eating Index
Abbildung 9:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf den Healthy Beverage Index
Abbildung 10:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Aktivität von PAI-1 im Plasma der Probandinnen
Abbildung 11:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Konzentration von (A) hTLR2-Liganden und (B) hTLR4-Liganden im Plasma der Probandinnen über Messung der Aktivität von transfizierten HEK-293-Zellen
Abbildung 12:	Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Konzentration von sCD14 im Plasma der Probandinnen, dargestellt als densitometrische Auswertung eines Western Blots

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ausschlusskriterien der Pilotstudie
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Cerealienmischungen an den Tagen 4-7
Tabelle 3:	Berechnungsschema des HEI
Tabelle 4:	Berechnungsschema des HBI
Tabelle 5:	Versuchsdurchführung hTLR2/hTLR4 Assay
Tabelle 6:	Standardreihe Bradford
Tabelle 7:	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE
Tabelle 8:	Zusammensetzung von SDS-Ladepuffer und DTT
Tabelle 9:	Vergleich der täglichen Zufuhr verschiedener Lebensmittelkategorien
Tabelle 10:	Vergleich der täglichen Zufuhr ausgewählter Nährstoffe

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APS	Ammonium-Persulfat
BG	Beta-Glucan
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
BSH	Bile salt hydrolase
CD14	Cluster of differentiation 14
CLGI	Chronic low-grade inflammation
D-A-CH	Deutschland-Österreich-Schweiz
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DHA	Docosahexaensäure
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPA	Eicosapentaensäure
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
FBS	Fetal bovine serum
FS	Fettsäuren
GU	Grundumsatz
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbA1c	Hämoglobin A1c
HBI	Healthy Beverage Index
HCl	Salzsäure
HDL	High-density lipoprotein
HEI	Healthy Eating Index
HEI-NVS	Healthy Eating Index Nationale Verzehrsstudie II
HEK	Human embryonic kidney cells
HOMA	Homeostatic model assessment
HRP	Horseradish peroxidase
hTLR	Human toll-like receptor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor

kcal	Kilokalorien
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LDL	Low-density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichoic acid
mAB	Monoclonal antibody
mCD14	Membrane cluster of differentiation 14
mM	Millimol
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NF-κB	Nuclear factor Kappa B
ns	nicht signifikant
NVS	Nationale Verzehrsstudie
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PRR	Pattern recognition receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Revolutions per minute
sCD14	Soluble cluster of differentiation 14
SCFA	Short chain fatty acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEAP	Secreted alkaline phosphatase
SEM	Standard error of mean
TBST	Tris-buffered saline with Tween® 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TJ	Tight junctions
TLR	Toll like receptor
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha
tPA	Tissue-type plasminogen activator
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	Unter anderem
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
Vit.	Vitamin

1 Einleitung

1.1 Ballaststoffe in der Humanernährung: Rolle von Beta-Glucanen aus Hafer

Ballaststoffe stellen Polysaccharide unterschiedlicher Länge dar, die aufgrund ihres Verhaltens in standardisierter Pufferlösung in *unlöslich* (z.B. Cellulose, einige Hemicellulosen) oder *löslich* (z.B. Pektin, Frukto-Oligosaccharide, Glucane) eingeteilt werden können [1]. Die tägliche Zufuhr von Ballaststoffen liegt lt. Österreichischem Ernährungsbericht deutlich unter dem Referenzwert von 30 g pro Tag. Dieser Wert wird nur von 14% der erwachsenen Bevölkerung erreicht [2].

Beta-Glucane

Beta-Glucane (BG) sind ein natürlicher Bestandteil der Zellwände von Hefen, Pilzen, Algen und Cerealien. Aus chemischer Sicht stellen BG eine heterogene Gruppe von Polysacchariden dar, die aus einem Grundgerüst von D-Glucose-Monomeren bestehen. Diese Bausteine sind charakteristisch für den jeweiligen Ursprung β -glykosidisch miteinander verbunden [3]. Hafer enthält unter den Cerealien den größten Anteil löslicher BG [4]. Haferprodukte, wie Flocken oder Kleie, enthalten meist den Kern mit dem Perikarp und der Testa, das Endosperm und den Keim [5].

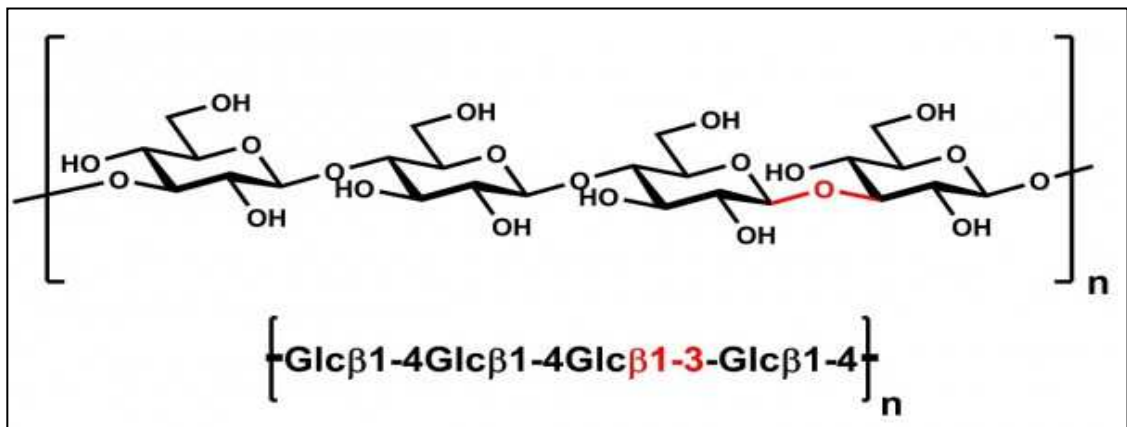


Abbildung 1: Grundstruktur von Beta-Glucan aus Hafer. Das lineare Homopolysaccharid besteht aus D-Glucose-Monomeren, die über $\beta(1 \rightarrow 4)$ -glykosidische Bindungen verbunden sind. In regelmäßigen Abständen kommt in der Struktur eine $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glykosidische Bindung vor. Modifiziert nach [6].

Effekte von Beta-Glucanen aus Hafer auf den Lipid- und Glucosestoffwechsel und weitere physiologische Funktionen

Interventionsstudien an Erwachsenen mit Hypercholesterinämie zeigten eine Reduktion von Gesamtcholesterin und low-density lipoprotein (LDL) durch BG aus Hafer [7, 8]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Autoren einer Meta-Analyse von 126 Studien. Hier wurde darüber hinaus eine Senkung der Triglyzeride und eine Erhöhung von high-density lipoprotein (HDL) durch BG aus Hafer und Gerste beschrieben. Die Wirkungen beziehen sich auf einen Konsum von mindestens 3 g täglich [9]. Ein möglicher Mechanismus für diese Effekte ist die Beeinflussung des Metabolismus von Gallensäuren, die in der Leber aus Cholesterin synthetisiert werden. Beta-Glucane erhöhen die Viskosität im Darmlumen, binden Gallensäuren und fördern deren Ausscheidung über den Stuhl [10]. Die Dauer der Interaktion zwischen Mizellen und luminalen Transportern auf der Oberfläche von Epithelzellen wird verringert. Durch die kompensatorisch gesteigerte Aktivität des Enzyms 7- α -Hydroxylase wird die Cholesterinsynthese stimuliert und die Konzentration von LDL im Blut gesenkt [11]. BG aus Hafer könnten sich auch über eine Beeinflussung bestimmter Bakterienstämme im Darm auf den Cholesterinmetabolismus auswirken. Die Förderung von Spezies, die eine Aktivität des Enzyms *bile salt hydrolase* aufweisen, wurde in Zusammenhang mit Veränderungen des Gallensäureprofils beschrieben. Diese könnten die Absorption von Cholesterin aus dem Darmlumen hemmen [12]. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass BG aus Cerealien präbiotische Wirkungen ausüben [Übersicht, siehe: 13].

Die verlängerte Transitzeit im Gastrointestinaltrakt durch BG führt wahrscheinlich auch zu Verzögerungen des enzymatischen Abbaus von Stärke und der Absorption von Kohlenhydraten. Dadurch kommt es zu einem verringerten postprandialen Blutzuckeranstieg und zu einer geringeren Insulinsekretion [14]. Interventionsstudien mit BG aus Hafer an Personen mit Diabetes Mellitus Typ 2 zeigten Reduktionen von Nüchtern-Blutzucker und HbA1c [15], sowie des HOMA-Index [16]. Brummer et al. wiesen in einer Studie an gesunden Personen eine verbesserte postprandiale Blutzuckerantwort durch Haferkleie im Vergleich zu Weißbrot, in Abhängigkeit von Molekulargewicht und Viskosität der Produkte, nach [17]. In 2009 und 2011 von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) veröffentlichten Stellungnahmen zu löslichen BG aus Hafer wurden Reduktionen der LDL-Konzentration im Blut, der Kalorienzufuhr und des postprandialen Blutzuckerspiegels beschrieben.

Dies bezieht sich auf eine Aufnahme von mindestens 4 g Beta-Glucan pro 30 g verfügbaren Kohlenhydrate [18].

Unverdauliche, langkettige Ballaststoffe werden nicht absorbiert und sind ein wichtiges Substrat für die Fermentation durch Darmbakterien. Der Großteil der Fermentation findet im Ileum und im Kolon statt [19]. Physiologisch wichtige Fermentationsprodukte sind kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFAs), v.a. Acetat, Butyrat und Propionat, sowie verschiedene Monosaccharide [20]. SCFAs, insbesondere Butyrat, dienen als Energiesubstrat für Epithelzellen und fördern deren Differenzierung. Des Weiteren führen SCFAs zu einer Senkung des pH-Wertes im Kolon und können so die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms positiv beeinflussen. Die Fermentation von Ballaststoffen zu SCFAs könnte einen bedeutenden stabilisierenden Faktor für die intestinale Barriere darstellen [21, 22].

Die Darmbarriere hängt von der Integrität und Funktion der Mucosa ab. Diese semipermeable Membran reguliert die spezifische Absorption von Nährstoffen und verhindert den unkontrollierten Übertritt von Mikroorganismen und Toxinen [23]. Im Darmlumen bildet die Mucus-Schicht ein Netzwerk aus Glykoproteinen, das mit Bakterien der Darmflora in Kontakt steht und eine Schutzfunktion für die darunter liegenden Epithelzellen ausübt. Verluste der polymeren Mucus-Proteine erhöhen die Anfälligkeit für entzündliche Erkrankungen [24]. Die Transportvorgänge durch das Epithel werden von spezifischen Transportproteinen und Pumpen, die in der Zellmembran der Enterozyten lokalisiert sind, und von interzellulären Proteinkomplexen reguliert. Zu letzteren zählen *tight junction*-Proteine (TJ), wie z.B. Occludine, Claudine oder Zonulin, die parazelluläre Transportmechanismen (z.B. für Endotoxin) regulieren [25, 26]. Einen weiteren Faktor für die Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere bilden dendritische Zellen in der Lamina Propria, die über ihre Fortsätze mit Mikroorganismen im Darmlumen in Kontakt stehen und Entzündungsvorgänge regulieren. Durch die Bildung von SCFAs können Bakterien der Darmflora das darmassoziierte Immunsystem und die Synthese von Mucus-Proteinen beeinflussen [27].

1.2 Bakterielle Toxine als Modulatoren des Immunsystems und von Entzündungen beim Menschen

TLRs weisen Funktionen bei der Vermittlung der angeborenen und adaptiven Immunität auf

Bei Toll-like-Rezeptoren (TLRs) handelt es sich um *pattern recognition receptors* (PRRs), deren Funktion die Erkennung spezifischer molekularer Muster ist. Von Bedeutung sind hierbei molekulare Strukturen, die bestimmten Mikroorganismen zuzuordnen und für deren Überleben essentiell sind. Solche Strukturmuster werden unter dem Begriff *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst [28]. Dazu zählen Lipopolysaccharide (LPS), die auch als Endotoxin bezeichnet werden und in der äußeren Zellwand von gram-negativen Bakterien vorkommen. Endotoxin ist ein wichtiger Ligand für TLR4 [29]. TLR2 ist einer der Rezeptoren für Lipoteichonsäure (LTA), einem PAMP auf der Oberfläche von gram-positiven Bakterien [30]. Eine hohe Dichte an TLRs findet sich auf Zellen, die an der Aufrechterhaltung der immunologischen und intestinalen Barriere beteiligt sind, wie z.B. Makrophagen und Epithelzellen der Darm-Mucosa [31]. Für die Induktion der Signalwege von TLR2 und TLR4 wird das Glykoprotein CD14 (cluster of differentiation 14) als Co-Rezeptor benötigt, das sowohl in membrangebundener (mCD14), wie auch in löslicher Form im Plasma (sCD14) vorkommt [32, 33]. In der Blutbahn wird Endotoxin zunächst an LBP (lipopolysaccharide-binding protein) gebunden und am jeweiligen Zielort auf CD14 übertragen [34].

Veränderungen des Darm-Mikrobioms (Dysbiosen) werden mit Schäden an TJ-Proteinen in Verbindung gebracht und können zu erhöhter Durchlässigkeit des Epithels für bakterielle Toxine und Nahrungsbestandteile führen. Dieser, auch als metabolische Endotoxinämie bezeichnete Zustand, kann die Entwicklung chronischer Entzündungsvorgänge (chronic low-grade inflammation, CLGI) begünstigen [35, 36]. Bestimmte Ernährungsmuster, insbesondere jene, die Merkmale einer typischen *western diet* aufweisen, werden mit erhöhten Endotoxinspiegeln im Blut in Verbindung gebracht. In Studien an gesunden Personen führte die erhöhte Aufnahme von gesättigten Fettsäuren [37, 38] und Kalorien [39] zu höheren Endotoxinwerten im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolldiäten. Eine Intervention an normalgewichtigen ProbandInnen in Form einer Fruktosezufuhr in Höhe von 25 % der Gesamtenergie führte bereits nach drei Tagen zu signifikanten Erhöhungen des Endotoxinspiegels im Serum, sowie der Expression von TLR2 und TLR4 in peripheren, mononukleären Zellen [40]. Als weitere diätetische Komponente, die zu erhöhter intestinaler Permeabilität führen

kann, gilt Ethanol [41]. Es gibt wissenschaftliche Evidenz dafür, dass eine Reihe von metabolischen Erkrankungen mit Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota und einem Verlust der Darmbarrierefunktion einhergeht. So weisen Studien im Tiermodell und beim Menschen darauf hin, dass die Entstehung von Diabetes Mellitus und der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) häufig mit einer Verschiebung von bakteriellen Metaboliten im Stuhl, sowie einer verringerten Diversität des Darm-Mikrobioms (Dysbiose) assoziiert sind [42-46]. Weiters zeigte sich auch, dass sowohl die diätinduzierte Pathogenese der NAFLD, als auch die Entstehung von Diabetes Mellitus Typ 2 mit einer metabolischen Endotoxämie einhergehen [47-50]. Die Rolle von LPS in der Pathogenese von metabolischen Erkrankungen wurde in einer Studie an normalgewichtigen ProbandInnen nachgewiesen. Die intravenöse Gabe von LPS führte zur Induktion eines metabolischen Profils, das auch im Rahmen von Übergewicht und Insulinresistenz auftritt [51].

Erhöhte intestinale Permeabilität ist mit dem Auftreten metabolischer Erkrankungen assoziiert

Als Reaktion auf den verstärkten Übertritt von bakteriellen Toxinen in die Blutbahn kommt es in mehreren Geweben zu einer Hochregulierung von TLRs, die nach Bindung ihrer Liganden die Assoziation einer Reihe von Adapterproteinen induzieren. Die Signalkaskaden von TLR2 und TLR4 führen u.a. zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor Kappa B) und IRF3/IRF7 (Interferon regulatory factor 3 und 7) in Immunzellen, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, die dadurch vermehrt inflammatorische Proteine synthetisieren. Dazu zählen TNF- α , die Interleukine IL-1 β und IL-6, sowie Typ I Interferone [52, 53]. In der Leber führt die Bindung von LPS an TLR4 auf Kupffer-Zellen und eingewanderten Makrophagen zu entzündlichen Prozessen, vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und reduzierter Insulinsensitivität, die als Komponenten der multifaktoriellen Pathogenese einer NAFLD angesehen werden. [54, 55]. Im Fettgewebe kommt es durch Induktion von TLR4-abhängigen Signalwegen durch LPS und gesättigten Fettsäuren zu einer verstärkten Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen, die ebenfalls die Entwicklung von Insulinresistenz begünstigt [56]. Der Kreislauf aus kontinuierlich erhöhten Zytokinen und verminderter Insulinsensitivität fördert die Lipolyse und den Transport von freien Fettsäuren zur Leber. Dies trägt zur Akkumulation von Fett bei [57].

Endotoxin und pro-inflammatorische Zytokine können die Synthese von PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) in verschiedenen Geweben fördern. Dieses Enzym hemmt die Fibrinolyse und ist auf diesem Weg in die Entstehung von Blutgerinnungsstörungen involviert. Des Weiteren kann PAI-1 zur Ausbildung von Fibrosen, z.B. in Leber und Blutgefäßen, beitragen [58, 59].

1.3 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Die Ergebnisse einer Vielzahl von Studien weisen darauf hin, dass die Ballaststoffaufnahme, sowohl bei Gesunden als auch bei Personen mit metabolischen Erkrankungen, deutlich unter den Empfehlungen liegt [4, 60-62]. Darüber hinaus zeigte sich in einigen Studien, dass eine Erhöhung der Ballaststoffzufuhr die intestinale mikrobiologische Zusammensetzung [63, Übersicht: 64], die intestinale Barriere und in weiterer Folge auch die sogenannte metabolische Endotoxämie positiv beeinflussen kann [36, 65-67].

Wie sich verschiedene Ballaststoffe auf die bakteriellen Toxinspiegel bei gesunden Personen auswirken, ist bisher noch nicht im Detail untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer kurzfristigen ballaststoffreichen Ernährung bei gesunden Frauen auf bakterielle Toxine und Entzündungsmarker zu untersuchen.

Folgende spezifischen Fragestellungen wurden bearbeitet:

- 1) *Führt die Zufuhr einer Getreidemischung mit 4.5 g Beta-Glucan, im Vergleich zu einer Getreidemischung mit unlöslichem Ballaststoffgehalt, zu Veränderungen des Ernährungsmusters?*
- 2) *Führt die Zufuhr einer Getreidemischung mit 4.5 g Beta-Glucan, im Vergleich zu einer Getreidemischung mit unlöslichem Ballaststoffgehalt, zu Veränderungen der Aktivität von PAI-1 im Plasma?*
- 3) *Führt die Zufuhr einer Getreidemischung mit 4.5 g Beta-Glucan, im Vergleich zu einer Getreidemischung mit unlöslichem Ballaststoffgehalt, zu Veränderungen der Konzentration von hTLR2- und hTLR4-Liganden, sowie sCD14 im Plasma?*

2 Materialien

2.1 ELISA zur Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma

Chemikalien

Human PAI-1 Activity ELISA Kit	Molecular Innovations, Michigan, USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Molecular Innovations, Michigan, USA
Blocking buffer	Molecular Innovations, Michigan, USA
Wash buffer-Konzentrat	Molecular Innovations, Michigan, USA
Human PAI-1 Standard	Molecular Innovations, Michigan, USA
Anti-human PAI-1 Primär-AK	Molecular Innovations, Michigan, USA
Anti-rabbit Sekundär-AK, HRP-gekoppelt	Molecular Innovations, Michigan, USA
1N HCl	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER

Geräte und Verbrauchsmaterialien

96-well microtiter plate	Molecular Innovations, Michigan, USA
ThermoCell Mixing block MB-102	BIOER Technology Co, Hangzhou, CHN
SpectraMax M3 Mikroplatten-Reader	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, GER

2.2 hTLR2/hTLR4 Reporter Assay

Chemikalien

HEK-Blue™ hTLR2 cells	InvivoGen, Toulouse, FRA
HEK-Blue™ hTLR4 cells	InvivoGen, Toulouse, FRA
HEK-Blue™ Detection	InvivoGen, Toulouse, FRA
Rotipuran® Wasser	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
DBPS w/o: Ca and Mg	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
DMEM: • D(+)-Glucose 4.5 g/L, • L-Glutamin 2 mM/L	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, GER

FBS (10% v/v)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Penicillin (100 U/ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Streptomycin (100 µg/ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, GER
Normocin (50 mg/ml)	InvivoGen, Toulouse, FRA
Lipopolysaccharid (LPS-EB)	InvivoGen, Toulouse, FRA
Lipoteichonsäure (LTA-SA)	InvivoGen, Toulouse, FRA

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars	Labogene, Allerød, DK
Zählkammer: Neubauer improved	LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Wasserbad Typ 3044	Köttermann GmbH, Uetze, GER
Mikroskop Primovert 415510-1100-000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER
Zellkulturflasche T75	Sarstedt AG & Co.KG, Nürmbrecht, GER
Filter (0.2 µm Durchmesser)	Laborbestand
96-well-Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Zellschaber aus Kunststoff	Laborbestand

2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Chemikalien

Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER

Geräte und Verbrauchsmaterialien

SpectraMax M3 Mikroplatten-Reader	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, GER
96-well-Platte	VWR International GmbH, Darmstadt, GER

2.4 CD14 Western Blot

Chemikalien

Acrylamid 30%	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Ammoniumperoxidisulfat	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
2-β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Methanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Recombinant Human sCD14	PeproTech EC Ltd., London, UK
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Precision Plus Protein™ Standards Cat.# 161-0374	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER

SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD14 Rabbit (D7A2T) mAB	Cell Signalling Technology, Leiden, NLD
Anti-rabbit IgG Antikörper, HRP-gekoppelt	Cell Signalling Technology, Leiden, NLD

Geräte und Verbrauchsmaterialien

ThermoCell Mixing block MB-102	BIOER Technology Co, Hangzhou, China
Sonorex Digitech Ultraschallbad	BANDELIN electronic GmbH & Co.KG, Berlin, GER
Zentrifuge Z 216 MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, GER
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stand	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
Immun-Blot PVDF Membrane	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
Western Blotting Filter Paper, extra thick PowerPac™ HC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER
ChemiDoc™ XRS Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER

2.5 Allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien

Ethanol vergällt ($\geq 99,8\%$)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Eppendorf Research® Plus Kolbenhubpipetten	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Eppendorf Research® Plus 8-Kanal-Pipette (30 – 300 μ l)	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, GER
Falcon®-Tubes (15 ml + 50 ml)	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, GER
SafeSeal Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, GER
Vortex Reax 2000®	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, GER
Orbi-Blotter™	Benchmark Scientific, Sayreville NJ, USA
Orion 420A PH Meter	Orion Research Inc., Franklin, USA
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co.KG, Nümbrecht, GER
Mechanische Pipettierhilfe LEVO	DLAB Scientific Inc., City of Industry, USA

2.6 Software

GraphPad Prism 9.2.0	GraphPad Software, San Diego, USA
Ebis Pro® Version 2011	Dr. Jürgen Erhard, Universität Hohenheim, Stuttgart, GER
SoftMax Pro 7	Molecular Devices (Germany) GmbH, Biberach an der Riß, GER
Image Lab™ 5.2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER

3 Methoden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Blutproben und Ernährungstagebücher waren zum Zeitpunkt des Arbeitsbeginns bereits vorhanden. Erhoben wurden die Daten und Proben im Rahmen einer prospektiven Interventionsstudie mit dem Titel *Einfluss von Haferkleie auf die postprandiale Endotoxinämie und das intestinale Mikrobiom: Untersuchungen bei Gesunden* am Department für Ernährungswissenschaften, von der dem Fachbereich Molekulare Ernährungswissenschaften zugehörigen Arbeitsgruppe der Universität Wien. In dieser Pilotstudie wurde der Einfluss von zwei Getreidemischungen, die jeweils entweder einen hohen oder niedrigen Gehalt an Beta-Glucan bei gleichem Gesamtballaststoffgehalt aufwiesen, auf Veränderungen des Endotoxinspiegels im Blut, die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota und das Ernährungsverhalten der Teilnehmerinnen untersucht. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der Ernährungsmuster und die Untersuchungen einiger biochemischer Marker, die im Zusammenhang mit Veränderungen der physiologischen Darmbarriere und der Pathogenese einer nicht-alkoholbedingten Fettleber beim Menschen stehen. Die Rekrutierung für die Studie erfolgte über Aushänge in verschiedenen Gebäuden der Universität Wien. Die Blutproben wurden am Department für Ernährungswissenschaften bei -80°C gelagert. Die Studie wurde bei *clinicalTrials.gov* (Identifier: NCT04019457) registriert und die Durchführung durch die Ethikkommission der Universität Wien genehmigt.

3.1 Beschreibung der Pilotstudie

Die Fragestellungen der Pilotstudie beinhalteten die Auswirkungen von Getreideflockenmischungen mit unterschiedlichem Gehalt an Beta-Glucan auf Marker der Besiedelung und Permeabilität des menschlichen Darms (Zusammensetzung des Mikrobioms und Endotoxinspiegel). Außerdem waren eine Testung der grundlegenden Akzeptanz der Dosierungen der Getreidemischungen seitens der teilnehmenden Personen und die Erfassung möglicher Auswirkungen auf das Essverhalten Teil der Zielsetzung. Insbesondere Veränderungen des Ernährungsmusters in Bezug auf bestimmte Lebensmittelkategorien und Nährstoffgruppen waren von Interesse. Des Weiteren wurden verschiedene inflammatorische und immunologische Marker im Plasma der Probandinnen als Zielgrößen definiert, die mit verschiedenen biochemischen

Methoden untersucht wurden: PAI-1 (ELISA), Untersuchung der Stimulierbarkeit von hTLR2 und hTLR4 durch Humanplasma (Zellkultur-Assay) und sCD14 (Western Blot).

Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen werden konnten nur gesunde, normalgewichtige Personen aller Geschlechter, im Alter zwischen 20 und 60 Jahren. Die weiteren Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 1) wurden im Rahmen eines persönlichen Gesprächs zwischen der Studienleitung und den an der Teilnahme interessierten Personen abgeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Daten der Subpopulation gesunder, normalgewichtiger Frauen, die beide Interventionen lt. Studienplan im cross-over-Design durchliefen, ausgewertet. In die Pilotstudie wurden 17 Frauen eingeschlossen, von denen 10 beide Interventionsphasen absolvierten und in die Auswertung aufgenommen wurden.

Tabelle 1: Ausschlusskriterien der Pilotstudie

Ausschlusskriterien
- Nahrungsmittelunverträglichkeiten bzw. Nahrungsmittelintoleranzen und/oder Lebensmittelallergien, die besondere diätetische Interventionen erfordern - Schwankungen des Körpergewichtes von > 5% in den letzten 6 Monaten - BMI < 18.5 kg/m² oder ≥ 25 kg/m² - Bariatrische Operationen in den letzten 5 Jahren - Einnahme von Antibiotika innerhalb von 1 Monat vor Beginn der Studie oder während der Studie - Schwangerschaft oder Stillzeit - Virale oder bakterielle Infekte in den letzten 3 Wochen - Erhöhte Entzündungswerte unbekannter Ursache - Akute oder chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes - Alkoholkonsum > 10 g/Tag bei Frauen und > 20 g/Tag bei Männern

Beschreibung der Ballaststoff-Interventionen

In beiden Interventionsphasen erhielten die Probandinnen jeweils eine definierte Mischung aus kommerziell erhältlichen Cerealien. Dabei lag die Tageszufuhr an Ballaststoffen an den Tagen 1–3 bei 7.5 g (davon in der entsprechend benannten Interventionsgruppe 2.25 g Beta-Glucan) und an den Tagen 4–7 bei 11.7 g (mit einem Gehalt an Beta-Glucan von 4.5 g). In Tabelle 2 sind die einzelnen Komponenten der Cerealienmischungen, beispielhaft für die Tage 4–7 der Interventionen, inkl. Hersteller und Gewichtsangaben aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Cerealienmischungen an den Tagen 4-7

Cerealie (Hersteller)	Mischung <i>Beta-Glucan</i>	Mischung <i>Iso-Ballaststoff</i>
Haferkleieflocken (Kölln®)	60 g	
Hirsebrei (dmBio®)	10 g	8 g
Dinkelkleie (Demeter®)		15 g
Grieß-Getreidebrei (dmBio®)		48 g
Tagesportion	70 g	71 g
Energie pro Tagesportion	249.2 kcal	247.3 kcal
Ballaststoffe pro Tagesportion	11.7 g	11.7 g

Ablauf der Pilotstudie

Die Teilnehmerinnen wurden ersucht, für eine Zeitdauer von vier Wochen (run-in-Phase) vor Beginn der ersten Intervention sowohl auf Haferprodukte, als auch auf prä- und probiotische Produkte zu verzichten. Zur Erfassung des Ernährungsverhaltens erhielten die Probandinnen ein Ernährungstagebuch in Form eines vorgedruckten Protokolls, in dem sämtliche Haupt- und Zwischenmahlzeiten inkl. der Zubereitungsart und allen Getränken vermerkt werden sollten. Um eine möglichst einheitliche Einschätzung der jeweiligen Portionsgrößen zu erhalten, wurde ein Portionshandbuch ausgegeben. Dieses enthielt Abbildungen mit Zahlencodierungen aus dem *EPIC-soft picture book*,

das im Rahmen der *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* verwendet wurde [68]. In Abbildung 2 ist der Studienablauf detailliert dargestellt.

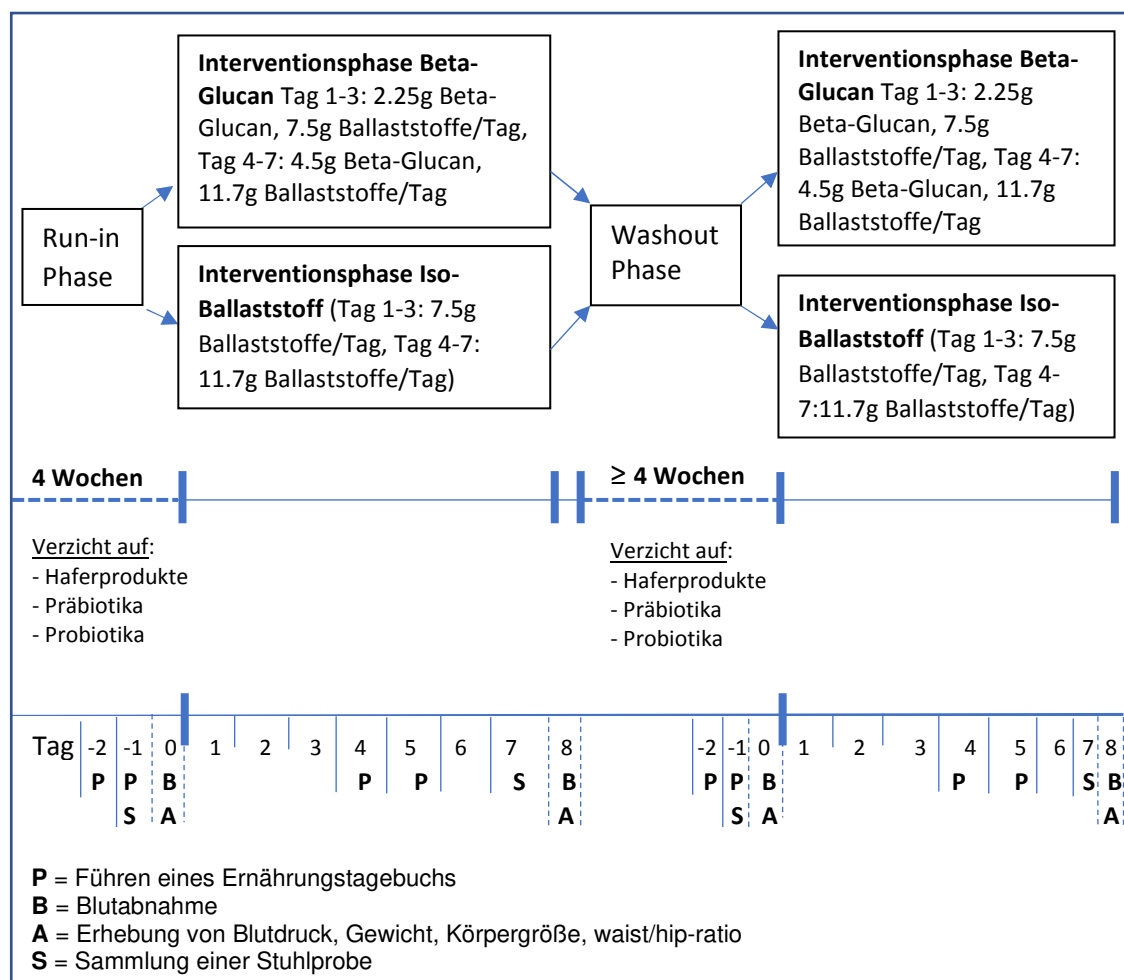


Abbildung 2: Ablaufschema der Pilotstudie

Die Ernährungstagebücher wurden vor Beginn und am Ende der Interventionsphasen geführt, wobei jeweils ein Tag der beiden Aufzeichnungen auf das Wochenende fallen sollte. Die Abgabe der Stuhlproben für die Mikrobiom-Analysen waren für die Tage -1 und 7 angesetzt. Am Tag vor dem Start der Interventionen (*Tag 0*) erfolgten jeweils die Blutabnahmen und die Messungen des Blutdrucks und anthropometrischer Parameter. Im Anschluss an die siebentägigen Interventionen erfolgte eine weitere Blutabnahme und erneute Messungen der anthropometrischen Parameter (*Tag 8*). Nach dem ersten Interventionsintervall wurden die Probandinnen gebeten, im Rahmen einer mindestens

vierwöchigen washout-Phase erneut auf Hafer-, prä- und probiotische Produkte zu verzichten. Durch das cross-over-Design der Pilotstudie durchlief jede der Teilnehmerinnen beide Ballaststoff-Interventionen.

3.2 Auswertung der Ernährungstagebücher

Die Analyse der Ernährungstagebücher erfolgte mit dem Programm Ebis Pro® (Version 2011). Die zugeführten Mengen in den einzelnen Lebensmittelkategorien wurden nach ihrem Prozentanteil an der Gesamtenergie (E-%) ermittelt. Der Vergleich der Nährstoffzufuhr erfolgte entweder als E-% (Makronährstoffe), % der Gesamtfettzufuhr (gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren) oder in Absolutwerten (Mikronährstoffe). Die Mittelwerte der zwei Aufzeichnungstage wurden für die Berechnung des Healthy Eating Index und des Healthy Beverage Index herangezogen.

Healthy Eating Index (HEI)

Die Berechnung des HEI wurde wie im Abschlussbericht zur *Auswertung der Daten der Nationalen Verzehrsstudie II (HEI-NVS)* beschrieben durchgeführt [69]. Der erreichbare Höchstwert des HEI-NVS liegt bei 110. In Tabelle 3 sind die Details zu den einzelnen Lebensmittelkategorien inkl. der jeweiligen Berechnungsformeln angeführt.

Tabelle 3: Berechnungsschema des HEI

Kategorie	Zufuhrempfehlung bzw. Richtwert (Soll) ¹	Schema der Punktevergabe (Empfehlungen und Zufuhrmengen in g pro Tag)
Obst	≥ 250 g/Tag	Ist-Zufuhr*10/Sollzufuhr Max. 15 Punkte erreichbar
Gemüse	≥ 400 g/Tag	
Getreide	350–560 g/Tag	Im empfohlenen Bereich: <i>10 Punkte</i>
Milch	2 Portionen ² pro Tag	Wenn darunter: <i>Ist-Zufuhr*10/Empfehlung</i>
Fisch	21–31 g/Tag	Wenn darüber: <i>Empfehlung*10/Ist-Zufuhr</i>
Fleisch	< 86 g/Tag	Wenn Zufuhr < 86 g/Tag: <i>10 Punkte</i> Wenn darüber: <i>Empfehlung*10/Ist-Zufuhr</i>
Eiprodukte	< 26 g/Tag	
Ethanol	Männer: ≤ 20 g/Tag Frauen: ≤ 10 g/Tag	
Streichfette	≤ 15–30 g/Tag	
Getränke	≥ 1500 ml/Tag	Wenn Zufuhr ≥ 1500 ml/Tag: <i>10 Punkte</i> Wenn darunter: <i>Ist-Zufuhr*10/Empfehlung</i>

¹Werte bezogen auf gesunde Erwachsene mit einem PAL von 1.4

²Eine Portion wird wie folgt definiert:

- 200–250 g Milch und/oder Joghurt
- 50–60 g Käse

Healthy Beverage Index (HBI)

Für die Erstellung des HBI wurde ein Berechnungsschema, wie bei Duffey & Davy, 2015 [70] beschrieben, herangezogen. Das ursprüngliche, aus sechs Ebenen bestehende *Beverage Guidance System* [71] wurde auf zehn Kategorien erweitert. Diese wurden nicht wie im Original in Unzen, sondern als Prozent der Gesamtaufuhr angegeben. Tabelle 4 gibt eine Übersicht zum Berechnungsschema.

Tabelle 4: Berechnungsschema des HBI

Kategorie	% der Empfehlung	Schema der Punktevergabe
Wasser	≥ 20% Fehlende Zufuhr < 20%	10 Punkte 0 Punkte Berechnung ¹
Kaffee und Tee (ungesüßt)	0–40% Darüber	5 Punkte 0 Punkte
Magermilch (≤ 1.5% Fettgehalt) oder Sojamilch (alle Arten)	0–16% Darüber	5 Punkte 0 Punkte
Künstlich gesüßte Getränke (inkl. Kaffee und Tee)	0–16% Darüber	5 Punkte 0 Punkte
Fruchtsäfte pur	0–8% Darüber	5 Punkte 0 Punkte
Alkohol	Männer: ≤ 2 drinks ² Frauen: ≤ 1 drinks	5 Punkte Ist-Zufuhr höher: 0 Punkte
Vollmilch (≥ 2% Fettgehalt)	Zufuhr bei 0% Darüber	5 Punkte 0 Punkte
Mit Saccharose, Fruktose- oder Glukosesirup gesüßte Getränke	0–8% Darüber	15 Punkte 0 Punkte
Gesamtenergiezufuhr aus Getränken	< 10% Gesamtenergie ≥ 10% bis < 15% ≥ 15%	20 Punkte Berechnung ³ 0 Punkte
Erreichen der Mindestzufuhr (1500 ml)	ja nein	20 Punkte Berechnung ⁴

^{1,4} Anteilsmäßiger Punktwert = $[(\text{ml Wasserzufuhr} \cdot 15) / (0.20 \cdot 1500)]$

² 1 drink $\triangleq$ 354.84 mL Bier bzw. 147.85 mL Wein

³ Anteilsmäßiger Punktwert = $(15 - \text{Energieprozent aus Getränken}) \cdot 3.333333$

Over- und underreporting der Energiezufuhr

Mittels der in Ebis Pro[®] integrierten Berechnungsformel nach Mifflin & St. Jeor, 1990 [72] wurde zunächst der Grundumsatz (GU) in kcal pro Tag für jede Probandin berechnet:

$$\text{GU} = (9.99 \cdot \text{Körpergewicht [kg]}) + (6.25 \cdot \text{Körpergröße [cm]}) - (4.92 \cdot \text{Alter [Jahre]}) - 161$$

Aus den ermittelten Werten erfolgte die Bildung eines Quotienten mit der durchschnittlichen, täglichen Energiezufuhr:

$$\text{Quotient GU} = \frac{\text{Energiezufuhr (kcal pro Tag)}}{\text{Grundumsatz (kcal pro Tag)}}$$

Ein Quotient < 0.4 wurde als underreporting eingestuft und der jeweilige Tag von der Auswertung ausgeschlossen. Dies war bei 1 von 40 ausgewerteten Tagen der Fall. Höhere Quotienten führten nicht zu einem Ausschluss.

3.3 ELISA zur Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma

Der Versuch wurde mit dem *Human PAI-1 Activity ELISA Kit* (Molecular Innovations®) nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein indirektes ELISA-Verfahren. Dieses beruht auf dem Prinzip, dass ein auf einer Oberfläche fest haftendes Antigen zunächst mit einem spezifischen Primär-AK inkubiert wird, zu dem nach einem Waschvorgang ein enzym-gekoppelter Sekundär-AK hinzugegeben wird [73, 74].

- | | |
|--|---|
| Pro well wurden verwendet: | <ul style="list-style-type: none">• 80 µl des assay diluent• 20 µl von Standards und Proben |
| Herstellung des Waschpuffers:
(1:10 Verdünnung) | <ul style="list-style-type: none">• 7 ml Pufferkonzentrat (10x konzentriert)• 63 ml ddH₂O |
| Vorgehen bei der Inkubation: | <ul style="list-style-type: none">• Lichtschutz mit Alufolie• 30 Min. bei 25°C• Auf ThermoCell mixing block mit 300 rpm |
| Vorgehen pro Waschvorgang: | <ul style="list-style-type: none">• 300 µl Waschpuffer pro well (8-Kanal-Pipette)• Ausschütten und mehrmaliges Abklopfen |

In Abbildung 3 ist der Versuchsablauf im Detail dargestellt.

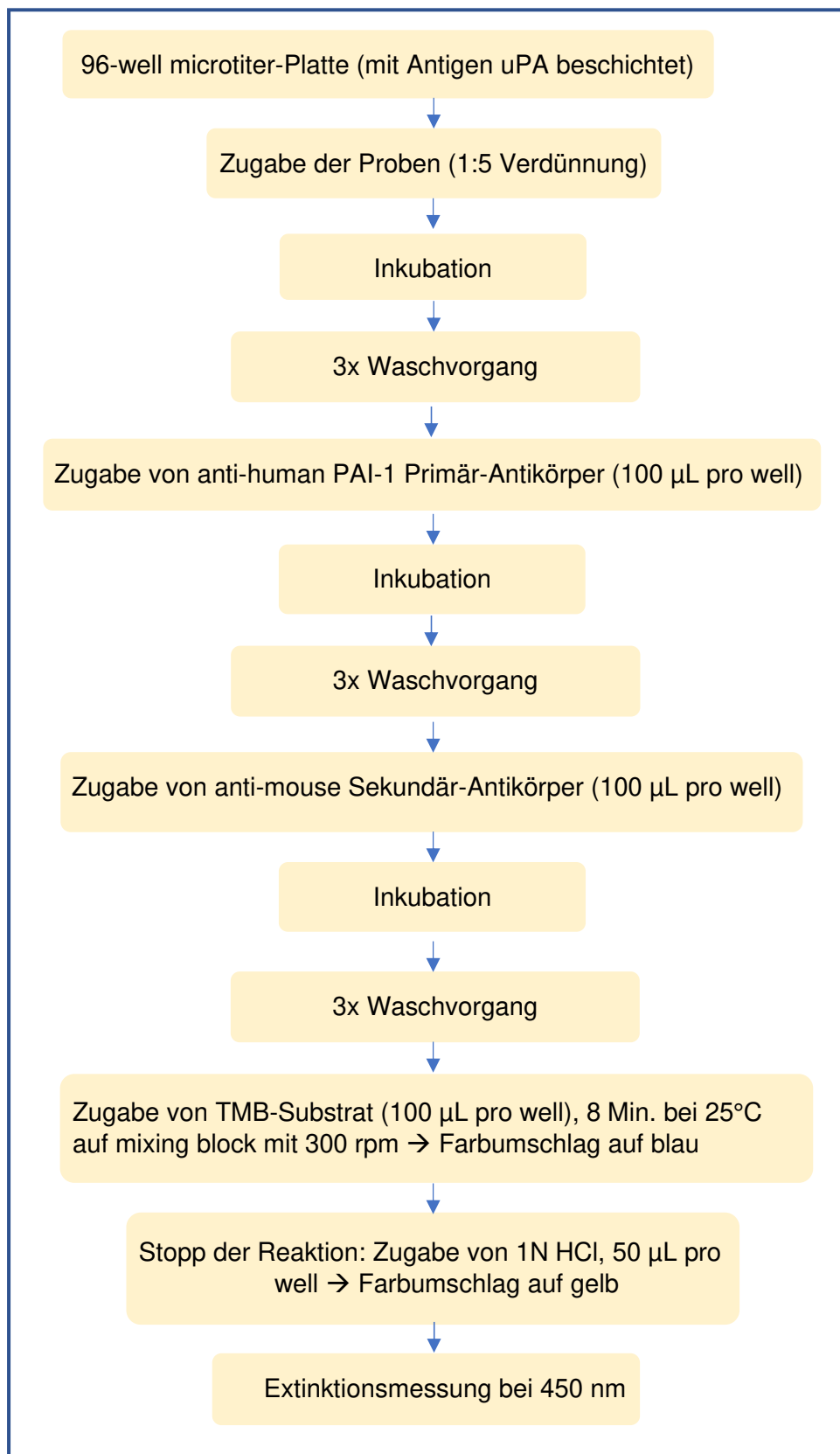


Abbildung 3: Versuchsablauf PAI-1 ELISA

3.4 hTLR2/hTR4 Reporter Assay

Das Prinzip der Methode beruht auf der Verwendung von präparierten Zellen der Zelllinie HEK-293 (= human embryonic kidney cells), denen über Transfektion ein spezifisches Reporterogen, *Secreted alkaline phosphatase* (SEAP), eingefügt wurde [75]. Die Durchführung des Versuchs erfolgte nach Vorgabe des Herstellers [76, 77] und wurde von Jung et al, 2021 beschrieben [78].

Allgemeine Vorbereitungen

Zunächst wurde das Detektionsmedium (HEK-Blue™ Detection) entsprechend den Angaben des Herstellers in 50 ml H₂O rekonstituiert, steril filtriert und gemeinsam mit DMEM und DPBS für 20 Min. im 37°C Wasserbad erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen für adhärente Zellen. Vor dem Versuch erfolgte eine mikroskopische Kontrolle auf ausreichende Konfluenz der Zellen von mindestens 50%.

Herstellung der Zellsuspension

Die Durchführung sämtlicher Arbeitsschritte erfolgte an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit laminar air flow. Nach Absaugen des Inhalts beider Zellkulturflaschen wurden diese 1x mit dem erwärmten DBPS gereinigt und für 2 Min. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Böden der Zellkulturflaschen abgeschabt und der Inhalt in einen sterilen Falcon überführt, mehrmals resuspendiert und 20 µl der Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß transferiert. Durch Zugabe weiterer 80 µl DBPS erfolgte eine 1:5 Verdünnung der Zellsuspension.

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung erfolgte mit einer Zählkammer vom Typ *Neubauer improved* mit jeweils 10 µl der beiden zuvor hergestellten Zellsuspensionen. Jedes der vier äußeren Quadrate (Kammern) wurde 2x durchgezählt und das Ergebnis gemittelt. Aus diesen vier Werten wurde der *Mittelwert pro Kammer* bestimmt. Für die Berechnungen der erforderlichen Volumina von Zellsuspension und Detektionslösung wurden daraufhin folgende Formeln herangezogen:

$$\boxed{\text{Faktor Zellsuspension}} = \frac{(\text{Mittelwert pro Kammer}) * \text{Verdünnungsfaktor } 5 * 10^4}{\text{Sollzellzahl pro ml lt. Standard des assay}}$$

(Anmerkung: 10^4 = Neubauer-Faktor)

$$\boxed{\text{Erforderliches Volumen pro Zellsuspension } (\mu\text{l})} = \frac{(\text{Anzahl der Proben} * 180 \mu\text{l})}{\text{Faktor Zellsuspension}}$$

$$\boxed{\text{Erforderliches Volumen HEK-Blue™ Detection } (\mu\text{l})} = (\text{Anzahl der Proben} * 180 \mu\text{l}) - \text{Volumen pro Zellsuspension}$$

Die Zellsuspensionen wurden mit dem Detektionsmedium im errechneten Verhältnis vermischt und von der erhaltenen Lösung je 180 µl in jedes well pipettiert. In Tabelle 5 sind die Details der Versuchsdurchführung aufgelistet.

Tabelle 5: Versuchsdurchführung hTLR2/hTLR4 Assay

	hTLR2	hTLR4
Anzahl der Proben (für Berechnung)	55	55
Sollzellzahl pro ml	280.000	140.000
Verdünnung Zellsuspension	1:5	1:5
Volumen pro Probe (µl)	20	20
Endvolumen pro well (µl)	200	200
Positivkontrolle mit	Lipoteichonsäure	Lipopolysaccharid
Inkubationszeit	12 Stunden	12 Stunden
Photometrische Messung	625/635/655 nm	625/635/655 nm
Auswertung	655 nm	655 nm

3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode zur Ermittlung der Proteinkonzentration beruht auf einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Blau von 465 nm auf 595 nm. Induziert wird die veränderte Absorption durch denaturierte Proteine, an die der Farbstoff mit hoher Affinität bindet [79]. Die Effektivität der Bindung des Farbstoffs hängt u.a. von der Aminosäurestruktur der untersuchten Proteine ab und steigt mit der Anzahl an basischen und aromatischen Resten [80]. Beim vorliegenden Versuch erfolgte die Kalibrierung durch Erstellung einer Standardreihe unter Verwendung von BSA (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 : Standardreihe Bradford

Standard	Protein	ddH ₂ O (µl)	Konzentration [mg BSA/ml]
A	2 µl BSA Stocklösung	198	1
B	100 µl von Std. A	100	0.5
C	100 µl von Std. B	100	0.25
D	100 µl von Std. C	100	0.125
E	100 µl von Std. D	100	0.0625
F	--	100	0

Das Farbreagens wurde im Verhältnis 1:5 mit ddH₂O verdünnt und während der weiteren Schritte lichtgeschützt gelagert. Von jeder Probe erfolgte eine 1:200 Verdünnung (2 µl mit 398 µl ddH₂O). Auf eine 96-well Mikrotiter-Platte wurden von den Standards und den Proben jeweils 5 µl in Dreifachbestimmung aufgetragen und anschließend mittels einer 8-Kanal-Pipette mit 200 µl des Farbreagens versetzt. Die Messung erfolgte ohne Zeitverzögerung im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 590 nm.

3.6 CD14 Western Blot

Die *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE) ist eine routinemäßig angewendete Methode zur Auftrennung von Proteinen. Grundlage für die Anwendung ist die Herstellung eines Gels aus Acrylamid-Polymeren, dessen Eigenschaften (Festigkeit, Porengröße etc.) auf die entsprechende Zielsetzung ausgerichtet sind [81]. Die

Zusammensetzungen der für den vorliegenden Versuch verwendeten Gele sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf jeweils zwei Trenn- bzw. Sammelgele, mit einem Abstand von 1 mm zwischen den eingespannten Glasplatten.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Substanz	10% Trenngel (µl)	5% Sammelgel (µl)
ddH ₂ O	4170	1512.5
1.5M TRIS (pH 8.8)	2600	625
30% Acryl/BIS	3330	312.5
10% SDS	100	25
10% APS	100	25
TEMED	6	3

Vor der Auftrennung im Gel wurden die Proteine zunächst durch Zugabe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert. Vor der Durchführung der Western Blots erfolgte jeweils eine Proteinbestimmung nach Bradford mit einer Zielkonzentration von 2 µg/µl (vgl. Kapitel 3.5). Zur weiteren Denaturierung der Proteine durch Bruch der Disulfidbrücken [82] wurden die reduzierenden Agenzien 2-β-Mercaptoethanol (als Bestandteil des Ladepuffers) und Dithiothreitol (DTT) zugegeben. In Tabelle 8 sind die jeweiligen Zusammensetzungen aufgelistet.

Tabelle 8: Zusammensetzung von SDS-Ladepuffer und DTT

	4x SDS-Ladepuffer	100 mM DTT
TRIS (1.5M) pH 6.8	5.22 ml	--
10% SDS	2.5 g	--
50% Glycerol	12.5 ml	--
20% 2-β-Mercaptoethanol	5 ml	--
0.05% Bromphenolblau	12.5 mg	--
ddH ₂ O	2.28 ml	10 ml
Dithiothreitol	--	4.25 mg

In Abbildung 4 ist das weitere Vorgehen zur Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese ab der Zugabe von SDS-Ladepuffer und DTT angeführt.

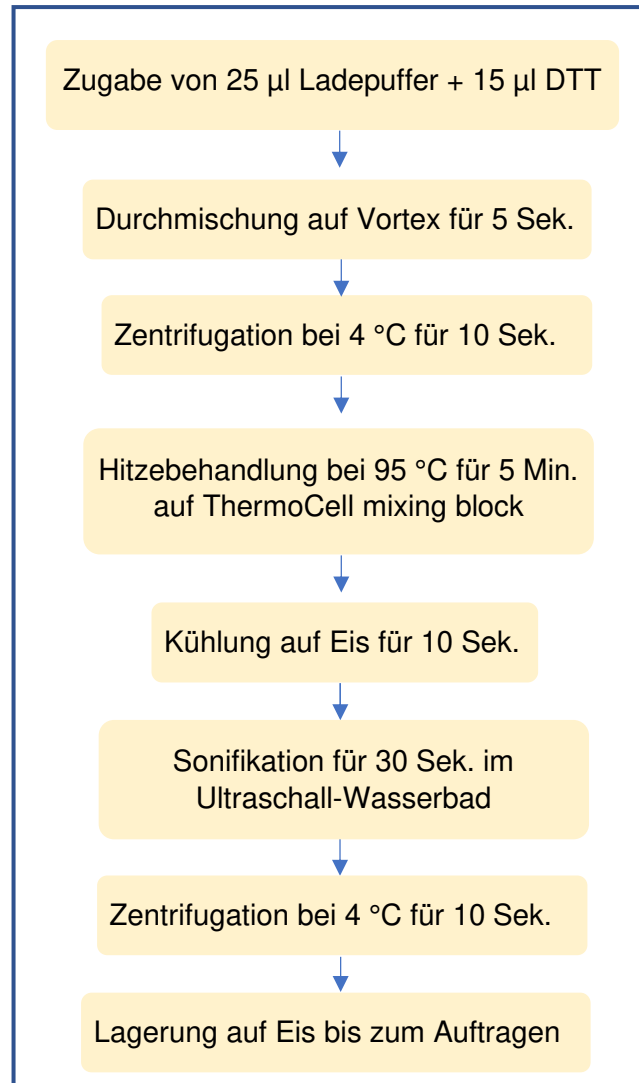


Abbildung 4: Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE

Von jeder Probe wurden jeweils 10 µl und vom Proteinstandard 2 µl in die Kammern des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 110 V für ca. 1.5 Stunden. Die exakte Laufzeit richtete sich nach dem Fortschritt des Lauffrontmarkers.

Blotting

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine im semi dry-Verfahren auf zuvor mit Methanol aktivierten Polyvinyliden-Membranen (PVDF) übertragen. Sowohl die Gele, als auch die für den Aufbau des Sandwich-Blot verwendeten Membranen und Filterpapiere, wurden für 10 Min. in Transferpuffer inkubiert. Der Aufbau des blotting sandwich gestaltete sich wie folgt:

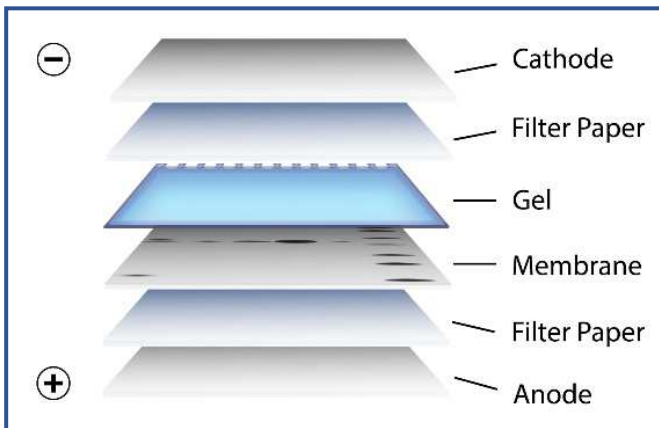


Abbildung 5: Schema eines blotting sandwich [83]

Für das blotting der Membranen wurde die Einstellung *SD* (25 V für 30 Min.) im Trans-Blot®Turbo™ Transfer System verwendet. Nach Durchlauf des Programms wurden die Membranen zunächst für 1 Stunde getrocknet, dann erneut in Methanol aktiviert und für 3 Minuten in Ponceau S Färbelösung geschwenkt. Dieser Schritt diente als Kontrolle der Proteinladung der Membranen und Visualisierung der Proteinbanden.

Inkubation mit Antikörpern und Detektion der Banden

Als Primär-Antikörper wurde ein monoklonaler CD14 rabbit-Antikörper in der Verdünnung 1:250 verwendet. Als blocking-Puffer diente 5% BSA in 1xTBST. Die Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C für 14–16 Stunden auf einem Orbital-Laborrührer inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Membranen 3x für je 10 Min. in 1xTBST gewaschen und für 1.5 Stunden mit einem HRP-gekoppelten anti-rabbit IgG-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 (5% BSA) inkubiert. Danach erfolgten erneut drei Waschgänge in 1xTBST für je 10 Min. Zur Vorbereitung der Detektion wurden die Membranen für 5 Min. lichtgeschützt mit einer 1:1 Mischung aus Luminol + Enhancer inkubiert. Das an H₂O₂ gekoppelte Luminol dient als Substrat für

das Enzym HRP, das an den Sekundär-Antikörper gebunden ist. Bei der Umsetzung kommt es zu messbarer Chemilumineszenz, die durch Zugabe einer Enhancer-Substanz (häufig mit phenolischen Grundstrukturen) weiter verstärkt wird [84]. Für die Analyse der Proteinbanden wurde ein ChemiDoc™ XRS-System in Kombination mit der Software Image Lab™ verwendet.

3.7 Statistische Auswertung

Sämtliche Auswertungen und grafischen Darstellungen der Ergebnisse wurden in Graphpad Prism Version 9.2.0 durchgeführt. Die Daten sind durchgehend als Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM, als Fehlerbalken) dargestellt. Vor der Auswertung wurde jeder Datensatz auf Normalverteilung (Tests nach D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnov) überprüft und ggf. entsprechend transformiert. Als statistischer Test kam für normalverteilte Daten ein zweiseitiger t-Test für verbundene Stichproben, und für nicht-normalverteilte Daten ein Wilcoxon-Test zur Anwendung. Die statistische Auswertung erfolgte jeweils paarweise für die Gruppen Beta-Glucan und Iso-Ballaststoff. Als Grenze für ein signifikantes Ergebnis wurde vorab ein p-Wert von 0.05 festgelegt. Für jedes der dargestellten Ergebnisse gilt $n = 10$, sofern nicht anders angegeben.

4 Ergebnisse

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf dem Vergleich der Wirkung von zwei Mischungen von Getreideflocken, die identische Mengen an Ballaststoffen und unterschiedliche Mengen an Beta-Glucan und unlöslichen Fraktionen beinhalteten. Im Folgenden wurden die Daten der Ernährungserhebungen sowie Parameter der intestinalen Permeabilität ausgewertet.

4.1 Charakteristik der Studienteilnehmerinnen

Es wurden 17 Probandinnen in die Pilotstudie eingeschlossen. Beide Interventionen wurden von 10 Probandinnen beendet. Das mittlere Alter betrug 31.9 ± 2.56 Jahre. Die Spannweite des Body-Mass-Index (BMI) lag zwischen 19.19 und 24.93 kg/m². Im Durchschnitt wurde ein BMI von 20.89 ± 0.64 kg/m² ermittelt. Die Probandinnen wiesen einen durchschnittlichen Grundumsatz von 1288 ± 33.36 kcal pro Tag auf. Die Spannweite reichte hierbei von 1102 bis 2438 kcal pro Tag.

4.2 Analyse der Nährstoffaufnahmen und des Ernährungsmusters der Studienteilnehmerinnen

Die Probandinnen führten jeweils zu Beginn und am Ende jeder Ballaststoff-Intervention ein Ernährungstagebuch über zwei Tage. Um zu untersuchen, ob die Ernährungsinterventionen einen Einfluss auf die Nährstoffaufnahme und das Ernährungsmuster hatten, wurden die täglichen Zufuhrmengen verschiedener Lebensmittelgruppen und Nährstoffe erfasst. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte der beiden Aufzeichnungstage dar. Die Ergebnisse dieser Erhebungen sind in den Tabellen 9 und 10 zusammengefasst. In beiden Gruppen stieg der Konsum von Cerealien signifikant während der Interventionen an (um 202% bei Beta-Glucan und 219% bei Iso-Ballaststoff, $p = 0.003$ jeweils). Gleichzeitig sank der Konsum in der Kategorie *Brot und Gebäck* jeweils im Vergleich zwischen Beginn und Ende, der jedoch nur in der Intervention mit Iso-Ballaststoff statistische Signifikanz ($p = 0.02$) erreichte. In der Gruppe Beta-Glucan wurde eine signifikante Steigerung des Konsums von Milchprodukten um 78% ($p = 0.01$), sowie ein signifikanter Rückgang des Konsums von Gemüse um 78% ($p = 0.03$) nachgewiesen. Bei der Intervention mit Iso-Ballaststoff kam es in der Kategorie *Öle und Fette* zu einem um 31% verringerten Konsum ($p = 0.02$).

Tabelle 9: Vergleich der täglichen Zufuhr verschiedener Lebensmittelkategorien¹

	Beta-Glucan		Iso-Ballaststoff	
	baseline	end	baseline	end
Brot/Gebäck	16.1 ± 2.3	10.9 ± 2.3	14.2 ± 1.6	9.3 ± 1.5*
Cerealien	5.8 ± 2.0	17.5 ± 1.3*	5.3 ± 1.8	16.8 ± 1.6*
Dauerbackwaren	9.1 ± 2.5	10.7 ± 2.9	9.7 ± 2.3	9.1 ± 2.9
Eier-/Teigwaren	5.3 ± 1.5	2.4 ± 0.9	5.2 ± 1.6	2.8 ± 1.4
Obst	5.7 ± 1.2	5.6 ± 1.5	6.0 ± 1.7	7.3 ± 2.3
Gemüse	3.4 ± 0.6	1.9 ± 0.4*	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3
Hülsenfrüchte	0.2 ± 0.1	1.7 ± 0.7	1.3 ± 0.9	2.2 ± 0.9
Kartoffel- und Pilzprodukte	3.5 ± 1.0	2.6 ± 0.7	3.5 ± 1.3	2.4 ± 0.9
Milchprodukte	12.9 ± 2.0	22.9 ± 2.9*	23.7 ± 3.6	23.3 ± 1.4
Nichtalkoholische Getränke	1.7 ± 0.6	1.2 ± 0.4	1.6 ± 0.9	1.1 ± 0.4
Öle und Fette	12.7 ± 2.6	8.6 ± 1.7	11.0 ± 1.5	7.6 ± 1.2*
Gewürze/Saucen	1.0 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Süßwaren	10.4 ± 2.7	6.0 ± 1.3	8.4 ± 1.5	8.4 ± 1.5
Fisch	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.4	1.6 ± 0.7
Fleischprodukte	3.5 ± 1.2	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.7	1.3 ± 0.6

¹⁾ *p < 0.05. Alle Lebensmittelkategorien dargestellt als Prozentanteile an der Gesamtenergiezufuhr. ¹⁾ Alle Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler (SEM).

Bei der Analyse der Zufuhrmengen von Makro- und Mikronährstoffen zeigte sich am Ende der Intervention mit Beta-Glucan eine signifikante, um 13.3% höhere Proteinzufuhr (p = 0.04). Außerdem wurden signifikant höhere Zufuhrmengen von Kalzium (+ 29.9%, p = 0.04) und Eisen (+18.4%, p = 0.04) nachgewiesen. Während der Intervention mit Iso-Ballaststoff kam es zu einer signifikanten Zunahme hinsichtlich der Aufnahme von Vitamin B1 (+ 78%, p < 0.0001) und Vitamin B6 (+ 17.4%, p = 0.03).

Tabelle 10: Vergleich der täglichen Zufuhr ausgewählter Nährstoffe¹

	Beta-Glucan		Iso-Ballaststoff	
	baseline	end	baseline	end
Energieprozent				
Protein	15.1 ± 0.8	17.4 ± 1.5*	16.3 ± 1.3	16.1 ± 0.8
Kohlenhydrate	45.7 ± 2.3	44.7 ± 2.2	43.6 ± 2.6	46.9 ± 1.8
Saccharose	11.1 ± 1.4	8.2 ± 1.3	9.4 ± 1.0	9.2 ± 1.7
Fruktose	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.5	3.1 ± 0.6	3.3 ± 0.7
Fett	39.3 ± 2.1	37.4 ± 1.7	39.7 ± 1.7	36.8 ± 1.4
Prozent der Fettzufuhr				
Gesättigte FS ²	43.6 ± 1.9	42.8 ± 1.9	46.1 ± 2.0	43.5 ± 1.5
Einfach unges. FS ²	13.8 ± 1.2	13.7 ± 1.9	11.2 ± 1.4	12.8 ± 1.3
Absolutzufuhr				
DHA + EPA (mg)	80 ± 20	35 ± 15	55 ± 20	140 ± 46
Vit. A (µg)	1002 ± 108.9	990.7 ± 176.4	1177 ± 156	1134 ± 161.5
Vit. D (µg)	2.0 ± 0.3	1.7 ± 0.3	2.6 ± 0.6	2.2 ± 0.5
Vit. B1 (mg)	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.6 ± 0.1*
Vit. B6 (mg)	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.1*
Folsäure (µg)	228.9 ± 27.9	181.4 ± 24.5	248.2 ± 29.4	254.0 ± 22.1
Vit. B12 (µg)	5.0 ± 1.6	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.8
Kalzium (mg)	753.9 ± 62.2	979.1 ± 125.6*	1021 ± 107.1	1099 ± 99.1
Eisen (mg)	11.1 ± 0.8	13.1 ± 0.9*	10.8 ± 1.2	9.5 ± 0.6

¹) FS = Fettsäuren, DHA = Docosahexaensäure, EPA = Eicosapentaensäure. *p < 0.05. ¹) Alle Werte dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler (SEM).

Wie aus Abbildung 6 zu entnehmen ist, kam es bei keiner der Ballaststoff-Interventionen zu Veränderungen der Gesamtenergiezufuhr.

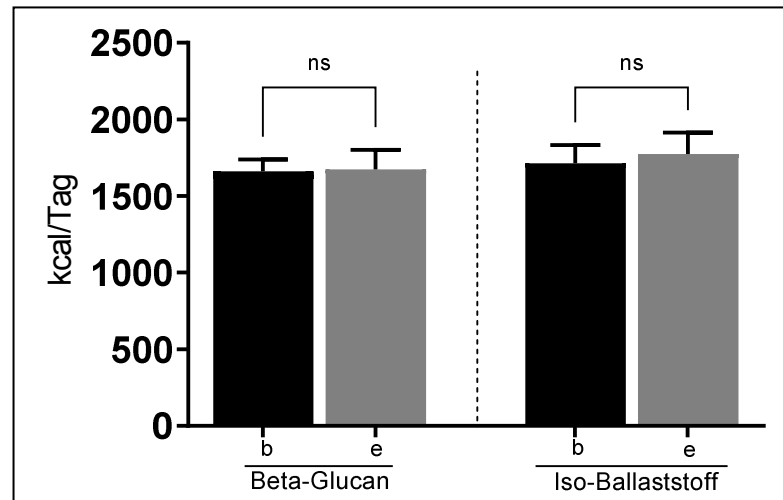


Abbildung 6: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die durchschnittliche Energiezufuhr. Die Daten sind ausgedrückt in kcal pro Tag. b = baseline, e = end. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

Abbildung 7 zeigt den Einfluss der Interventionen auf die Ballaststoffzufuhr. Diese führten jeweils zu einer signifikant erhöhten täglichen Aufnahme, die jedoch unter dem Richtwert von 30 g/Tag blieb.

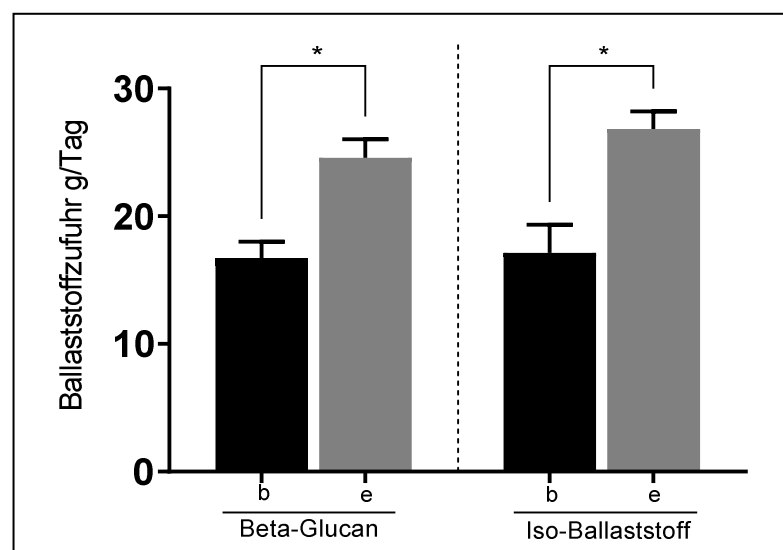


Abbildung 7: Einfluss der Interventionen auf die durchschnittliche Ballaststoffzufuhr. Die Daten sind ausgedrückt in Gramm pro Tag. b = baseline, e = end. *p < 0.05. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

4.3 Healthy Eating Index und Healthy Beverage Index der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie

Um zu untersuchen, ob die Interventionen einen Einfluss auf das Ernährungsmuster hatten, wurde der *Healthy Eating Index der Nationalen Verzehrsstudie II* (HEI-NVS, vgl. Kapitel 3.2) berechnet. Die Zufuhrmengen in den verschiedenen Lebensmittelkategorien wurden mit Empfehlungen und Richtwerten verglichen. In beiden Interventionsgruppen zeigten sich keine Änderungen des HEI (siehe Abbildung 8).

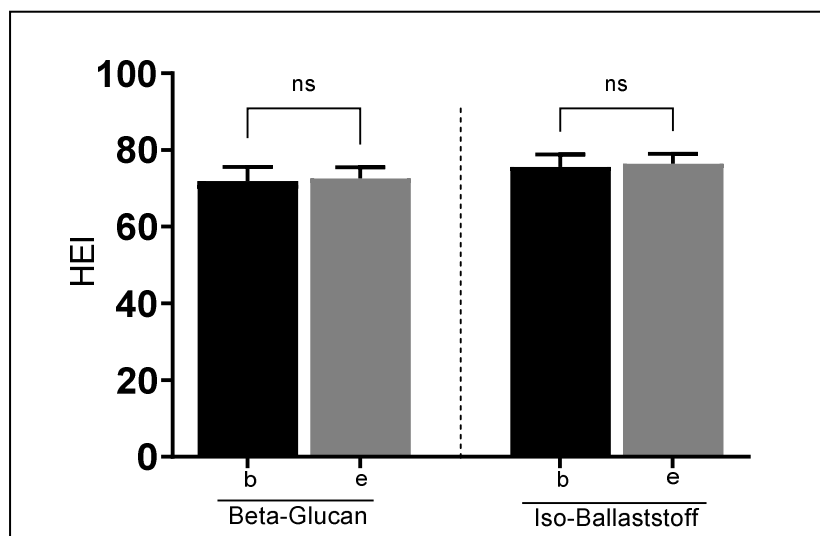


Abbildung 8: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf den Healthy Eating Index (HEI).
b = baseline, e = end. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

Zusätzlich wurde auch der Einfluss der Interventionen auf die Getränkeaufnahme mit Hilfe des *Healthy Beverage Index* durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2). Die Intervention mit Beta-Glucan ging mit keiner Veränderung des Scores einher, wohingegen die Intervention mit Iso-Ballaststoff zu einer signifikanten Verminderung führte (siehe Abbildung 9). Dies ist insbesondere auf den in dieser Gruppe höheren Konsum von Milch mit vollem Fettgehalt zurückzuführen. Daraus ergaben sich niedrige Punktwerte in der Bewertungskategorie *Energie aus Getränken*, die sich stark auf die Gesamtpunktzahl auswirkten.

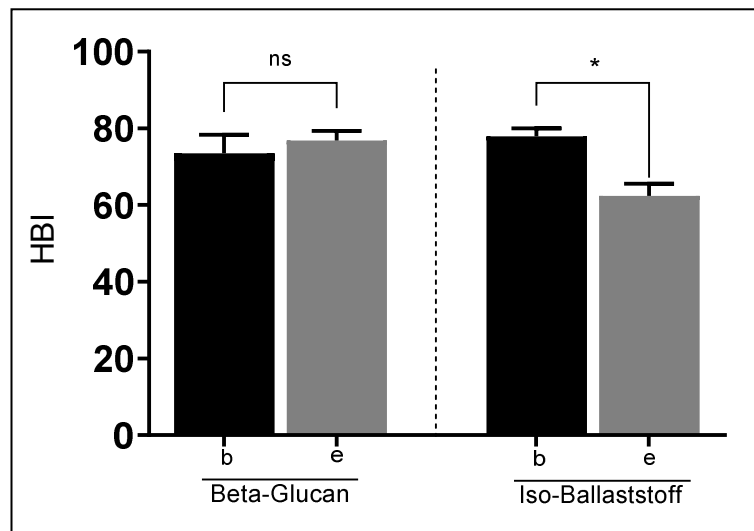


Abbildung 9: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf den Healthy Beverage Index (HBI).

b = baseline, e = end. Alle Gruppen: n = 9 (1 Probandin exkludiert wegen fehlenden Angaben).

*p < 0.05. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

4.4 Bestimmung der Aktivität von PAI-1 im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie

Um den Einfluss der Interventionen auf die Aktivität von PAI-1 im Plasma zu ermitteln, wurde ein indirektes ELISA-Verfahren angewendet. Beide Ballaststoff-Interventionen hatten keinen Einfluss auf die Aktivität im Plasma (siehe Abbildung 10).

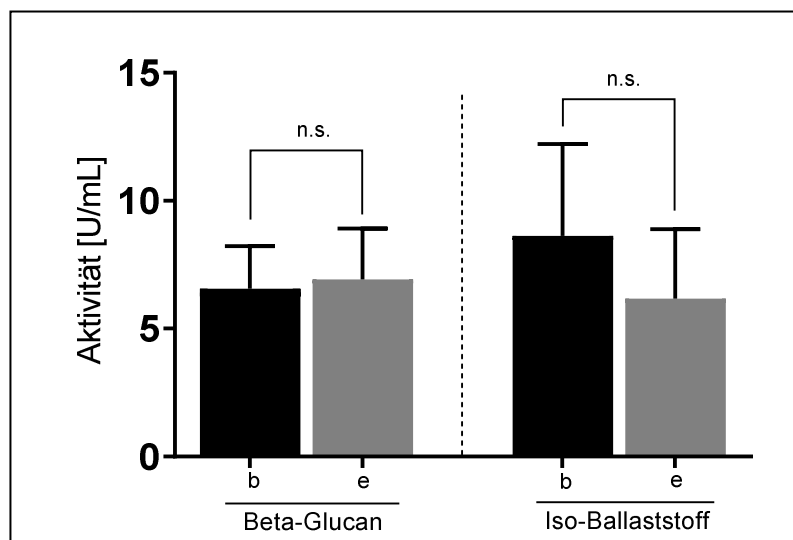


Abbildung 10: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Aktivität von PAI-1 im Plasma der Probandinnen. PAI-1 = Plasminogen Activator Inhibitor-1, b = baseline, e = end. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

4.5 Bestimmung von hTLR2- und h TLR4-Liganden im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie

Um zu untersuchen, ob die Interventionen mit Veränderungen der Konzentration von TLR2- bzw. TLR4-Liganden einhergingen, wurden Kulturen von HEK-293-Zellen für 12 Stunden mit Plasma der Probandinnen inkubiert. Die Aktivität der mit (A) TLR2- und (B) TLR4-Rezeptor transfizierten Zelllinie wurde über das Reportergen SEAP erfasst. Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass die Interventionen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des TLR2-Reporters ausübten. Bei der Aktivität des TLR4-Reporters zeigte sich in der Gruppe Beta-Glucan ein Trend zur Verminderung ($p = 0.09$)

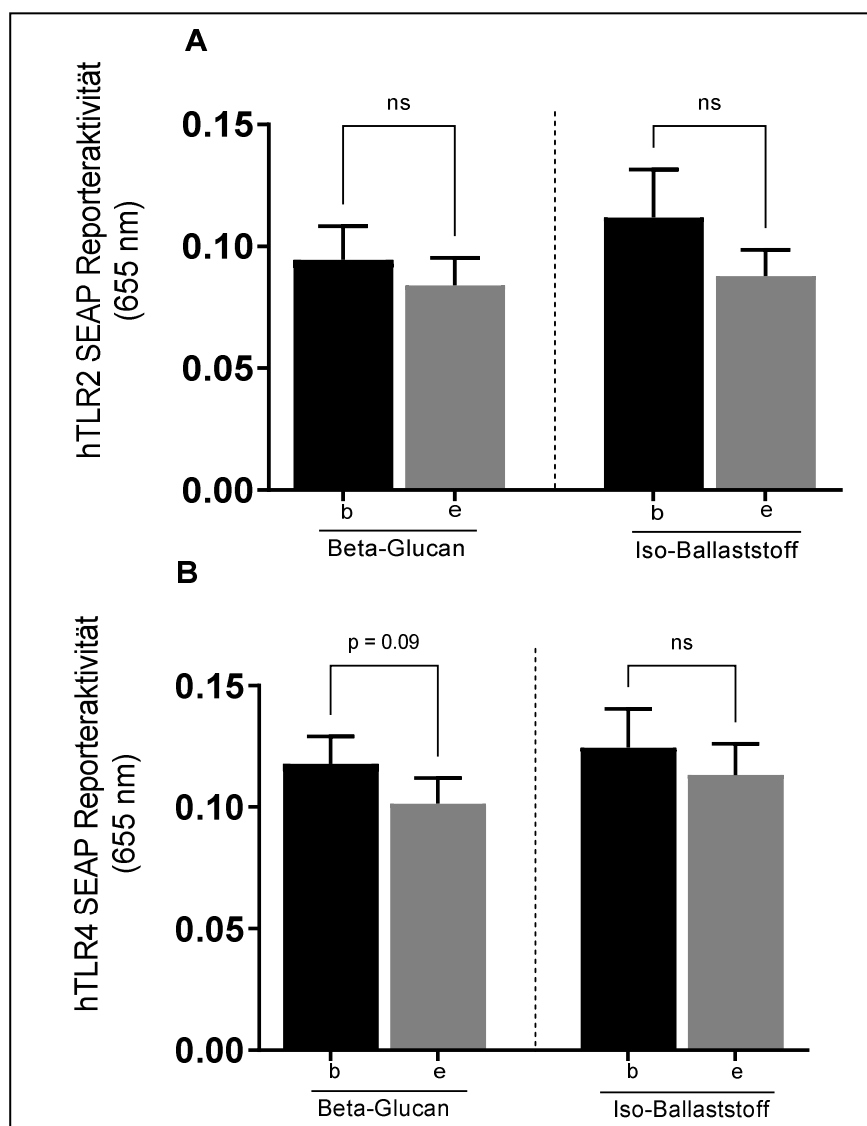


Abbildung 11: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Konzentration von (A) hTLR2-Liganden und (B) hTLR4-Liganden im Plasma der Probandinnen über Messung der Aktivität von transfizierten HEK-293-Zellen. hTLR = human Toll Like Receptor, HEK = Human Embryonic Kidney Cells, b = baseline, e = end. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

4.6 Bestimmung der Konzentration von sCD14 im Plasma der Studienteilnehmerinnen im Verlauf der Studie

Um den Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Konzentration von sCD14 im Plasma festzustellen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, kam es in der Gruppe Beta-Glucan zu einer signifikanten Abnahme der Konzentration. Die Abnahme in der Gruppe Iso-Ballaststoff erreichte keine statistische Signifikanz.

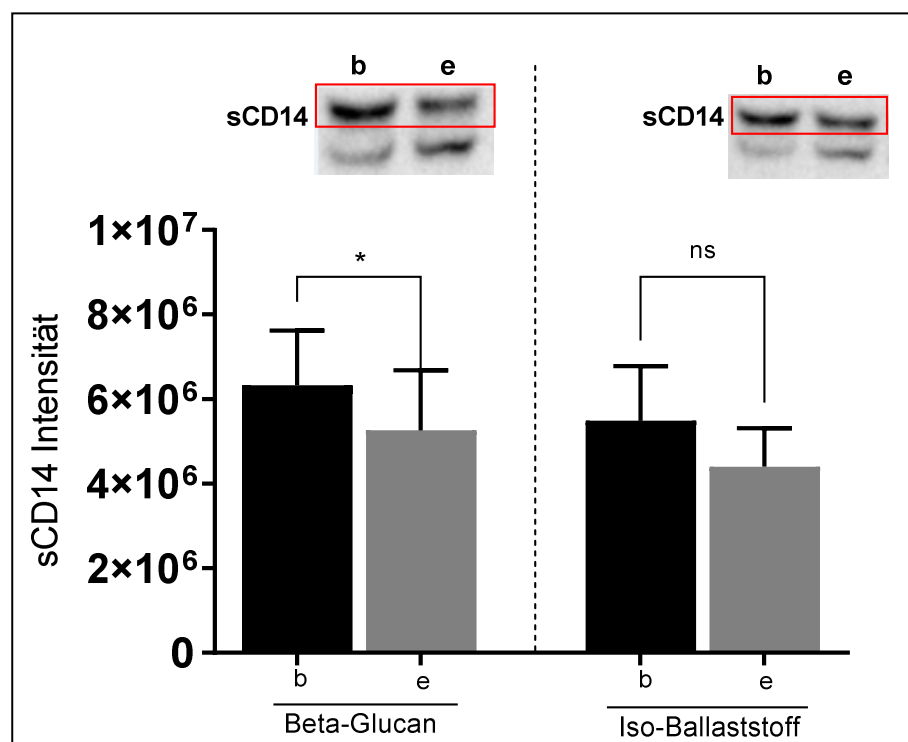


Abbildung 12: Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Konzentration von sCD14 im Plasma der Probandinnen, dargestellt als densitometrische Auswertung eines Western Blots. CD14 = Cluster Of Differentiation 14, b = baseline, e = end. * $p < 0.05$. Alle Werte dargestellt als Mittelwert + Standardfehler (SEM).

5 Diskussion

Die erhöhte Zufuhr bestimmter Nährstoffe, wie gesättigte Fettsäuren, Fruktose oder Ethanol, kann die intestinale Permeabilität erhöhen und bei gesunden Personen zur Entstehung einer metabolischen Endotoxinämie beitragen [37-41]. Bakterielle Toxine können durch ihre Bindung an TLRs und CD14 auf Immunzellen in mehreren Geweben die Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungsvorgängen fördern. Veränderungen des Darm-Mikrobioms sowie pro-inflammatorische Zytokine sind in die Entstehung mehrerer metabolischer Erkrankungen involviert [42-50].

Eine Erhöhung des Konsums von Vollkornprodukten und Ballaststoffen aus diversen Cerealien ist mit einem verringerten Risiko für einige dieser Erkrankungen assoziiert und kann zu einem verringerten Schweregrad beitragen [85, 86]. Die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen von löslichen und unlöslichen Ballaststoffen und die Eigenschaften, die zu ihrer Wirkung beitragen, sind hierbei noch nicht vollständig aufgeklärt [87]. In einem Tierversuch von Chen et al. zeigten beide Fraktionen Unterschiede in der Produktion von SCFAs und der Diversität bakterieller Spezies im Darm [88]. Bestimmte Bakterienstämme weisen Enzyme auf, die den Abbau von Cellulose-Einheiten ermöglichen und auf diesem Weg die Fermentation unlöslicher Ballaststoffe induzieren [89]. Die Fermentation von Ballaststoffen zu SCFAs (v.a. Acetat, Butyrat und Propionat) durch Darmbakterien wird mit einer Stärkung der Darmbarriere in Verbindung gebracht [21, 90]. Hafer enthält einen hohen Anteil an löslichem Beta-Glucan [4], das als gut zugängliches Substrat für die Fermentation eingestuft wird [91]. Studien weisen darauf hin, dass Ballaststoffe aus Hafer positive Wirkungen auf die Integrität der intestinalen Barriere sowie auf die Synthese von SCFAs im Darm ausüben können [92, 93].

Inwieweit sich lösliche und unlösliche Ballaststoffe hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Translokation bakterieller Toxine und auf Entzündungsmarker unterscheiden, ist noch nicht endgültig geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer kurzfristig erhöhten Zufuhr von Beta-Glucan und unlöslichen Ballaststoffen auf das Ernährungsverhalten und einige Marker der intestinalen Permeabilität bei gesunden, normalgewichtigen Frauen untersucht.

5.1 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Aufnahme von Lebensmittelgruppen, Nährstoffen und Gesamtkalorien

Die Interventionen führten zu Erhöhungen der Aufnahme von Cerealien und Ballaststoffen. Auf die Energieaufnahme zeigten sich keine Auswirkungen.

Wie zu erwarten war, kam es durch beide Ballaststoff-Interventionen zu einer ähnlich hohen, signifikanten Erhöhung des Konsums von Cerealien. Diese Lebensmittelkategorie wies auch die größte Veränderung zwischen Beginn und Ende auf. Auch in der täglichen Aufnahme von Ballaststoffen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit in beiden Interventionsgruppen signifikante Steigerungen verzeichnet werden. Dabei ist jedoch zu erwähnen, dass die jeweiligen Ausgangswerte relativ niedrig waren und auch nach den Interventionen unter dem von D-A-CH vorgegebenen Richtwert von 30 g Ballaststoffen pro Tag blieben [94]. In Österreich wurde allgemein eine geringe Zufuhr festgestellt, was sich dadurch ausdrückt, dass dieser Richtwert nur von 14 % der Erwachsenen erreicht wird [4]. Studien weisen darauf hin, dass Ballaststoffe die Energieaufnahme durch eine verzögerte gastrointestinale Entleerung, eine verringerten Absorption von Nährstoffen, sowie durch eine Verlängerung des Sättigungsgefühls beeinflussen können [95].

Trotz der deutlichen Erhöhung der Ballaststoffmengen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede bei den täglich aufgenommenen Gesamtkalorien. Das subjektive Sättigungsgefühl der Studienteilnehmerinnen wurde nicht erfasst. Die möglichen Auswirkungen verschiedener Ballaststoffe auf die Sättigung könnten Inhalt zukünftiger Studien sein. In einem Review von Wanders et al. wurden Beta-Glucane als eher kurzfristig wirksam auf die Energieaufnahme beschrieben, während Langzeiteffekte schwächer ausgeprägt waren [96]. Cicero et al. konnten hingegen durch eine achtwöchige Intervention mit Hafer-BG keinen Effekt auf die Energiezufuhr sowie auf das allgemeine Ernährungsverhalten nachweisen [8]. Die beiden Cerealienmischungen wurden von den Studienteilnehmerinnen über die Dauer der Interventionen jeweils vollständig wie vorgegeben konsumiert, was auf einen hohen Grad an Akzeptanz schließen lässt.

Die Interventionen mit Ballaststoffen führten zu Veränderungen der Aufnahme von Brot, Gebäck und Milchprodukten sowie von Kalzium und weiteren Mikronährstoffen.

Neben der erhöhten Cerealienzufuhr kam es in beiden Interventionsgruppen zu einer Abnahme der Aufnahme von Brot und Gebäck, die bei Iso-Ballaststoff statistische Signifikanz erreichte. In der Gruppe Beta-Glucan wurde eine signifikante Steigerung des Konsums von Milchprodukten und Proteinen festgestellt. Hier kam es gleichzeitig auch zu einer signifikanten Zunahme der Kalziumaufnahme auf ein Niveau, das nur knapp unter der von D-A-CH empfohlenen Menge von 1000 mg täglich lag [93]. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit mehreren Studien, die eine Erhöhung der Aufnahme von Milch und Kalzium in Verbindung mit dem Konsum von Cerealien zeigten [97, 98]. Aus den erhobenen Daten gehen darüber hinaus signifikant erhöhte Zufuhrmengen von Vitamin B1 und B6 (Gruppe Iso-Ballaststoff) sowie Eisen (Gruppe Beta-Glucan) hervor. Die Intervention mit Beta-Glucan führte des Weiteren zu einer signifikanten Abnahme der Aufnahme von Gemüse. In der Gruppe Iso-Ballaststoff zeigte sich eine verringerte Zufuhr von Ölen und anderen Fetten.

5.2 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf die Punktwerte von HEI und HBI

Die Interventionen mit Ballaststoffen zeigten keinen Einfluss auf den Healthy Eating Index.

Die Analyse von Ernährungsmustern auf Basis von bestehenden, diätetischen Empfehlungen und Scores wird als hypothesen-basierter oder *a priori* Ansatz bezeichnet [99]. Der Healthy Eating Index beruht auf den *dietary guidelines for americans* und wurde in der vorliegenden Arbeit in der für die *Nationale Verzehrsstudie II* adaptierten Form (HEI-NVS) angewendet. Ein Vorteil dieser Version ist die Unterteilung von Fleisch, Fisch und Eiprodukten in eigene Kategorien. Im Gegenzug wird die fehlende Klassifizierung der Qualität der zugeführten Fette als Kritikpunkt angesehen [100]. In einer Meta-Analyse wurden mehrere Ernährungsmuster, die einen hohen Wert in verschiedenen Versionen des HEI aufwiesen, mit einer Reduktion von Mortalität, kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes Mellitus Typ II in Verbindung gebracht [101].

Die Intervention mit Iso-Ballaststoff führte zu einer Abnahme des Healthy Beverage Index.

Der HBI wurde zur Einschätzung des Zusammenhangs zwischen den zugeführten Getränken und verschiedenen Parametern des Metabolischen Syndroms entwickelt [70]. In der Intervention mit Beta-Glucan zeigte sich kein Einfluss auf den HBI, während es bei Iso-Ballaststoff zu einer signifikanten Verminderung kam. Als Ursache dafür ist v.a. der in dieser Gruppe stark ausgeprägte Konsum von Kuhmilch mit einem Fettgehalt von mehr als 2.5% zu nennen, der sich in der Kategorie *Energie aus Getränken* sehr stark auswirkt. Da die Maximalpunktezahl in dieser Kategorie bei 20 liegt, führt eine Zufuhr von mehr als 10 E-% aus Getränken zu proportional stärkeren Abzügen beim HBI, als dies bei anderen Kategorien der Fall ist.

Insgesamt zeigten sich in der vorliegenden Arbeit zwischen den Gruppen kaum Änderungen in der Zusammensetzung der Ernährung, aber dennoch Effekte auf biochemische Parameter.

5.3 Einfluss der Ballaststoff-Interventionen auf Marker der intestinalen Permeabilität im Plasma

Weder die Aufnahme von Beta-Glucan aus Hafer, noch die Aufnahme von Getreideflocken mit unlöslichem Ballaststoffgehalt übten Einfluss auf die Aktivität von PAI-1 im Plasma aus.

PAI-1 ist der wichtigste Inhibitor der Plasminogen-Aktivatoren uPA (= urokinase-type plasminogen activator) und tPA (= tissue-type plasminogen activator) und unterdrückt auf diesem Weg die Bildung von Plasmin, dem Schlüsselenzym der Fibrinolyse [102]. Bei gesunden Menschen liegt PAI-1 in nur geringen Konzentrationen im Plasma vor. Durch verschiedene Stimuli kann die Bildung rasch hochreguliert werden [103]. Erhöhte Werte sind stark mit metabolischen Erkrankungen assoziiert [104, 105]. Die Synthese von PAI-1 wird u.a. durch erhöhte Level an pro-inflammatorischen Zytokinen, Endotoxin, freien Fettsäuren und Insulin gefördert [106]. PAI-1 wird in der aktiven Form gebildet und an die Blutbahn abgegeben. In dieser Form ist es in vitro sehr instabil, weist bei 37°C eine kurze Halbwertszeit von 1-2 Stunden auf und geht schnell in den stabileren, inaktiven (= latenten) Zustand über. In dieser Konformation erfolgt keine Bindung von

tPA [58]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von aktivem PAI-1 im Plasma untersucht. Die Möglichkeit, dass die Ergebnisse durch die Instabilität des untersuchten Parameters beeinflusst wurden, kann nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz zu den erhobenen Daten steht eine Studie von Kristensen et al., die bei jungen, normalgewichtigen Personen eine Senkung der Aktivität von PAI-1 durch Haferkleie nachweisen konnten. Allerdings müssen hierbei die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit doppelt so lange Dauer der Interventionsphase und die höhere Dosierung von Beta-Glucan erwähnt werden [107]. In einer Untersuchung von Belobrajdic et al. an Zucker-Ratten führte die Fütterung mit 2% Beta-Glucan aus Weizenkleie bzw. 3% aus Gerste zu einer Reduktion der PAI-1-Konzentration auf das Niveau der schlanken Vergleichsgruppe. Diese Änderung war lt. den Autoren nicht alleinig auf reduzierte Sekretion aus dem Fettgewebe zurückzuführen. Diskutiert wird eine vermehrte Fermentation von BG im Kolon, die über SCFAs zu einer Reduktion der Synthese von PAI-1 in der Leber führt [108]. Inwieweit diese Mechanismen die Expression und Synthese von PAI-1 in Leber und Fettgewebe auch beim Menschen beeinflussen könnten, muss in weiterführenden Studien untersucht werden.

Die Aufnahme von Beta-Glucan aus Hafer führte zur Reduktion von hTLR4-Liganden und zu einem signifikanten Absinken der Konzentration von sCD14 im Plasma. Die Ballaststoff-Interventionen zeigten keine Auswirkungen auf die Konzentration von hTLR2-Liganden.

Eine Vermehrung von bakteriellen Toxinen im Blut kann im Rahmen einer Dysbiose des Darms in Verbindung mit erhöhter intestinaler Permeabilität auftreten und inflammatorische Prozesse in mehreren Geweben fördern [109]. In den erhobenen Daten zeigte sich durch die Aufnahme von Beta-Glucan in mit hTLR4 transfizierten Zellen ein Trend zur Reduktion von TLR4-Liganden ($p = 0.09$) im Plasma. TLR4 erkennt neben anderen bakteriellen Molekülen spezifisch LPS aus gram-negativen Bakterien [110]. Bei keiner der Ballaststoff-Interventionen war ein Einfluss auf die Konzentration von TLR2-Liganden nachweisbar. TLR2 bindet u.a. Lipoteichonsäure aus gram-positiven Bakterien [30].

Das Glykoprotein CD14 ist Bestandteil eines Proteinkomplexes, der die TLR4-abhängigen Signale vermittelt [32-34]. Die Funktion von CD14 und dessen löslicher Form im Stoffwechsel ist noch nicht exakt aufgeklärt. Eine Erhöhung von sCD14 im

Plasma wurde im Rahmen einer Endotoxinämie bei Ratten nachgewiesen [111]. De Courten et al. zeigten in einer Studie, dass die Konzentration von sCD14 im Serum bei übergewichtigen und normalgewichtigen Personen unterschiedliche Assoziationen mit LPS aufweist. Möglicherweise hat sCD14 bei Normalgewichtigen eher die Funktion eines acute-phase-Proteins. Darüber hinaus könnten erhöhte Werte im Rahmen einer Adipositas auf eine „Pufferung“ einer metabolischen Endotoxinämie hindeuten [112]. Nier et al. wiesen in einer Studie an Kindern mit NAFLD eine Korrelation von sCD14 mit LBP, nicht jedoch mit Endotoxin nach. Außerdem zeigte sich, dass CD14 und LBP eine wichtige Rolle in der Endotoxin-vermittelten Aktivierung von PAI-1 einnehmen könnten [113].

Daten aus mehreren Studien weisen darauf hin, dass Beta-Glucan aus Hafer zu einer Verbesserung einer metabolischen Endotoxinämie und der Integrität der intestinalen Barriere beitragen können. In einer Studie von Kundi et al. an Mäusen führte mit Hafer angereichertes Futter zu einer Reduktion der durch *western diet* erhöhten Expression von TLR4 in der Leber. Darüber hinaus kam es zu einer erhöhten Expression von TJ-Proteinen im Kolon [91]. You et al. wiesen in einer Studie an Mäusen mit LPS-induzierter Steato-Hepatitis eine Abschwächung der Leberschädigung und der Konzentration von LPS im Serum durch BG aus Hafer nach [114]. In vitro durchgeführte Studien zeigten, dass die Inkubation von Stuhlproben gesunder Personen mit Hafer-BG zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms und des SCFA-Musters führte. Dabei handelt es sich um Veränderungen, die mit positiven Auswirkungen auf die Gesundheit in Verbindung gebracht werden [92, 115, 116]. Des weiteren führte die Inkubation mit Beta-Glucan aus Hafer zu einer reduzierten Permeabilität in einem leaky gut-Modell [117].

5.4 Fazit und Ausblick

Insgesamt deuten die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass die tägliche Zufuhr von 4.5 g Beta-Glucan aus Hafer bei normalgewichtigen Frauen zu einer Reduktion der Konzentration von TLR4 und sCD14 im Plasma beitragen kann. Hier ist zu erwähnen, dass dieser Effekt ohne wesentliche Unterschiede des Ernährungsmusters in den beiden Interventionsgruppen nachgewiesen werden konnte. Die erhobenen Befunde deuten auf einen Einfluss von Haferkleie hin, die im Vergleich zu anderen Cerealien einen relativ hohen Anteil an löslichem Beta-Glucan enthält. TLR4 und CD14 sind wichtige

Rezeptoren bakterieller Toxine. Daten aus mehreren Publikationen weisen darauf hin, dass sich Beta-Glucan hinsichtlich der präbiotischen Wirkung auf Darm-Mikrobiota und der Fermentation kurzkettiger Fettsäuren von anderen Ballaststoffen unterscheidet. Diese Wirkungen könnten zur Stabilisierung der intestinalen Barriere und zur Reduktion von metabolischer Endotoxinämie beitragen. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine tägliche Aufnahme von 4.5 g Beta-Glucan aus Hafer einen vielversprechenden Ansatz bei Erkrankungen darstellt, die mit erhöhter intestinaler Permeabilität assoziiert sind. Es sind jedoch weitere Studien mit längerer Laufzeit, höherer Anzahl an teilnehmenden Personen und einem randomisierten Design notwendig, um die erwähnten Effekte zu bestätigen und Mechanismen auf molekularer Ebene exakt aufklären zu können.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen darüber hinaus Veränderungen des Ernährungsmusters in einzelnen Aspekten. So konnte in beiden Interventionsgruppen eine deutliche Steigerung der Ballaststoffzufuhr nachgewiesen werden, die in Österreich allgemein sehr niedrig ist. Es konnten Einflüsse auf die Aufnahme einzelner Lebensmittelgruppen und Nährstoffe gezeigt werden, die jedoch den Healthy Eating Index nicht beeinflussten. Dahingegen kam es bei der Intervention mit Iso-Ballaststoff zu einem signifikant niedrigeren Healthy Beverage Index. Um den langfristigen Einfluss einer täglichen Aufnahme von Beta-Glucan aus Hafer auf die Qualität und Zusammensetzung der Ernährung untersuchen zu können, wird ebenfalls auf weitere Studien mit den zuvor genannten Kriterien verwiesen.

6 Zusammenfassung

Die Aufnahme von Ballaststoffen liegt in vielen Ländern unter den jeweiligen Empfehlungen. In mehreren Studien zeigten sich bei gesunden Personen Zusammenhänge zwischen dem Ernährungsmuster und Parametern, die auf eine erhöhte Durchlässigkeit der intestinalen Barriere und eine negative Beeinflussung des Darm-Mikrobioms hinweisen. Ballaststoffe dienen als Substrat für die Fermentation durch Darmbakterien, die zu einer erhöhten Produktion von kurzkettigen Fettsäuren führt. Studien weisen darauf hin, dass diese Eigenschaften von Ballaststoffen zu einer Stärkung der Darmbarriere beitragen könnten. Ob die Löslichkeit von Ballaststoffen hierbei einen Einfluss ausübt, ist noch ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Cerealienmischungen mit identischem Gesamtgehalt an Ballaststoffen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf das Ernährungsverhalten, die Ernährungsqualität und die Plasmakonzentration von Entzündungsmarkern bei gesunden, normalgewichtigen Frauen verglichen. Im cross-over-Design konsumierten zehn Probandinnen jeweils über sieben Tage eine Mischung mit 4.5 g Beta-Glucan aus Hafer, das einen hohen Grad an Löslichkeit aufweist, sowie eine Mischung mit hohem Gehalt an unlöslichen Ballaststoffen. Durch Auswertung von Ernährungsprotokollen wurden geringfügig unterschiedliche Ernährungsmuster in den beiden Interventionsgruppen ermittelt, wobei sich bei der Energieaufnahme und beim Healthy Eating Index keine Unterschiede zeigten. Die Intervention mit Iso-Ballaststoff führte zu einem verringerten Healthy Beverage Index. Trotz des im Wesentlichen identischen Ernährungsverhaltens führte die Intervention mit Beta-Glucan zu einer Verringerung der Konzentration von TLR4-Liganden ($p = 0.09$) und von sCD14 ($p < 0.05$) im Plasma, die in der Gruppe Iso-Ballaststoff nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass sich Beta-Glucan aus Hafer von unlöslichen Ballaststoffen in der Wirkung auf inflammatorische Parameter beim Menschen unterscheidet.

7 Summary

In many countries worldwide people consume smaller amounts of dietary fibres than recommended by dietary guidelines. Several studies have shown correlations between dietary patterns and markers for increased intestinal permeability, as well as disruptions in the composition of the gut microbiome. Dietary fibres are fermented by the gut microflora to produce short chain fatty acids. Research indicates that such pathways could contribute to an enhancement of the gut barrier integrity. To date it remains unclear whether the solubility of fibres may modulate these effects. The purpose of the present study was to evaluate the effects of two mixtures of whole-grains, with equal amounts of total fibres, on eating habits, dietary quality and plasma levels of inflammatory markers in healthy women with normal weight. 10 female volunteers were enrolled in a crossover study with 2 interventions over a period of 7 days each. The first intervention diet was rich in oat bran, containing 4.5 g of soluble beta-glucan and the second intervention comprised cereals with larger amounts of insoluble fibres. Dietary record analysis revealed minor differences in eating habits between the 2 groups and no influence on energy intake or the healthy eating index. The intervention with iso-fibre significantly lowered the healthy beverage index. Despite the subtle effects on dietary patterns, plasma concentrations of TLR4-ligands ($p = 0.09$) and sCD14 ($p < 0.05$) were lower in the beta-glucan group. There was no such effect in the iso-fibre group. Taken together, the results of the present study indicate that high intakes of soluble and insoluble fibres each have a different impact on inflammatory markers in humans.

Literaturverzeichnis

- 1 Dhingra D, Michael M, Rajput H, Patil RT. Dietary fibre in foods: a review. *J Food Sci Technol* (May–June 2012) 49(3):255–266. doi: 10.1007/s13197-011-0365-5.
- 2 Rust P, Hasenegger V, König J. Österreichischer Ernährungsbericht 2017. Internet: <https://ernaehrungsbericht.univie.ac.at/> (Zugriff am 18.4.2022).
- 3 Han B, Baruah K, Cox E, Vanrompay D, Bossier P. Structure-Functional Activity Relationship of β -Glucans From the Perspective of Immunomodulation: A Mini-Review. *Front. Immunol.* 2020 11:658. doi: 10.3389/fimmu.2020.00658.
- 4 Havrlentová M, Petuláková Z, Burgárová A, Gago F, Hlinková A, Šturdík E. Cereal β -glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods – A Review. *Czech J. Food Sci.*, 29: 1–14. doi: 10.17221/162/2009-CJFS.
- 5 Grundy MML, Quint J, Rieder A, Ballance S, Dreiss CA, Cross KL, Gray R, Bajka BH, Butterworth PJ, Ellis PR, Wilde PJ. The impact of oat structure and β -Glucan on in vitro lipid digestion. *J Funct Foods.* 2017 Nov; 38(Pt A): 378–388. doi: 10.1016/j.ff.2017.09.011.
- 6 Internet: <https://www.megazyme.com/beta-glucan-mw-standard> (Zugriff am 18.4.2022).
- 7 Charlton KE, Tapsell LC, Batterham MJ, O'Shea J, Thorne R, Beck E, Tosh SM. Effect of 6 weeks' consumption of β -glucan-rich oat products on cholesterol levels in mildly hypercholesterolaemic overweight adults. *British Journal of Nutrition* (2012), 107, 1037–1047. doi: 10.1017/S0007114511003850.
- 8 Cicero AFG, Fogacci F, Veronesi M, Strocchi E, Grandi E, Rizzoli E, Poli A, Marangoni F, Borghi C. A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Medium-Term Effects of Oat Fibers on Human Health: The Beta-Glucan Effects on Lipid Profile, Glycemia and Intestinal Health (BELT) Study. *Nutrients* 2020, 12, 686. doi: 10.3390/nu12030686.
- 9 Tiwari U, Cummins E. Meta-analysis of the effect of β -glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition* 27 (2011) 1008–1016. doi: 10.1016/j.nut.2010.11.006.

- 10 Du B, Meenu M, Liu H, Xu B. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 4032. doi: 10.3390/ijms20164032.
- 11 Nakashima A, Yamada K, Iwata O, Sugimoto R, Atsuji K, Ogawa T, Ishibashi-Ohgo N, Suzuki K. β -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2018;64(1):8-17. doi: 10.3177/jnsv.64.8.
- 12 Joyce SA, Kamil A, Fleige L, Gahan CGM. The Cholesterol-Lowering Effect of Oats and Oat Beta Glucan: Modes of Action and Potential Role of Bile Acids and the Microbiome. *Front. Nutr.* (2019) 6:171. doi: 10.3389/fnut.2019.00171.
- 13 Lam KL, Cheung CK. Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates And Dietary Fibre* 2 (2013) 45-64. doi: 10.1016/j.bcdf.2013.09.001.
- 14 Ciecierska A, Drywień ME, Hamulka J, Sadkowski T. Nutraceutical Functions Of Beta-Glucans. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2019;70(4):315-324. doi: 10.32394/rpzh.2019.0082.
- 15 Li Shen X, Zhao T, Zhou Y, Shi X, Zou Y, Zhao G. Effect of Oat β -Glucan Intake on Glycaemic Control and Insulin Sensitivity of Diabetic Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients* 2016 Jan 13;8(1):39, 8, 39. doi: 10.3390/nu8010039.
- 16 Pino JL, Mujica V, Arredondo M. Effect of dietary supplementation with oat β -glucan for 3 months in subjects with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods* 77 (2021):104311. doi: 10.1016/j.ff.2020.104311.
- 17 Brummer Y, Duss R, Wolever TMS, Tosh SM. Glycemic Response to Extruded Oat Bran Cereals Processed to Vary in Molecular Weight. *Cereal Chem.* 89(5):255–261. doi: 10.1094/CCHEM-03-12-0031-R.
- 18 EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and “digestive function” (ID 850) pursuant to Article 13(1) of

- Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA Journal 2011;9(6):2207. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2207.
- 19 Atanasov J, Schlörmann W, Trautvetter U, Glei M. The effects of β -glucans on intestinal health. Ernährungs Umschau 2020; 67(3): 52-9. doi: 10.4455/eu.2020.010.
 - 20 Parekh PJ, Balart LA, Johnson DA. The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease. Clin Transl Gastroenterol. 2015 Jun 18;6(6):e91. doi: 10.1038/ctg.2015.16.
 - 21 Liu P, Wang Y, Yang G, Zhang Q, Meng L, Xin Y, Jiang X. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress and colonic carcinogenesis. Pharmacol Res 2021 Mar;165:105420. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105420 .
 - 22 Den Besten G, Van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J Lipid Res. 2013 Sep; 54(9): 2325–2340. doi: 10.1194/jlr.R036012.
 - 23 Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2017 September ; 11(9): 821–834. doi: 10.1080/17474124.2017.1343143.
 - 24 Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. Experimental & Molecular Medicine (2018) 50:103. doi: 10.1038/s12276-018-0126-x.
 - 25 Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal Barrier Function: Molecular Regulation and Disease Pathogenesis. J Allergy Clin Immunol. 2009 July ; 124(1): 3–22. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038.
 - 26 Camilleri M. The Leaky Gut: Mechanisms, Measurement and Clinical Implications in Humans. Gut. 2019 August ; 68 (8): 1516–1526. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318427.
 - 27 Okumura R, Takeda K. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 92 (2016). doi: 10.2183/pjab.92.423.

- 28 Suresh R, Mosser DM. Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ* 37: 284–291, 2013. doi: 10.1152/advan.00058.2013.
- 29 Zhang C, Tian F, Zhang M, Zhang Z, Bai M, Guo G, Zheng W, Wang Q, Shi Y, Wang L. Endotoxin contamination, a potentially important inflammation factor in water and wastewater: A review. *Science of The Total Environment* 681 (2019) 365-378. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.036.
- 30 Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity. *Front Immunol.*2012 Apr18;3:79. doi:10.3389/fimmu.2012.00079.
- 31 Zheng NX, Wang Y, Hu DD, Yan L, Jiang YY. The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*. *Virulence* 6:4, 347-361; May/June 2015. doi: 10.1080/21505594.2015.1014270.
- 32 Kelley SL, Lukk T, Nair SK, Tapping RI. The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket. *J Immunol* 2013; 190:1304-1311. doi: 10.4049/jimmunol.1202446.
- 33 Da Silva TA, Zorzetto-Fernandes ALV, Cecílio NT, Sardinha-Silva A, Fernandes FF, Roque-Barreira MC. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 7083 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-07397-0.
- 34 Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42 (2008) 145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- 35 Pérez-Montes de Oca A, Julián MT, Ramos A, Puig-Domingo M, Alonso N. Microbiota, Fiber, and NAFLD: Is There Any Connection? *Nutrients* 2020 Oct 12;12(10):3100. doi: 10.3390/nu12103100.
- 36 Krawczyk M, Maciejewska D, Ryterska K, Czerwinka-Rogowska M, Jamiol-Milc D, Skonieczna-Zydecka K, Milkiewicz P, Raszeja-Wyszomirska J, Stachowska E. Gut Permeability Might be Improved by Dietary Fiber in Individuals with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Undergoing Weight Reduction. *Nutrients* 2018, 10(11), 1793. doi: 10.3390/nu10111793.

- 37 Pendyala S, Walker JM, Holt PR. A High-Fat Diet Is Associated With Endotoxemia That Originates From the Gut. *Gastroenterology*. 2012 May; 142(5): 1100–1101.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.034.
- 38 Lyte JM, Gabler NK, Hollis JH. Postprandial serum endotoxin in healthy humans is modulated by dietary fat in a randomized, controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis* 15, 186 (2016). doi: 10.1186/s12944-016-0357-6.
- 39 Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B, Ferrieres J. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1219 –23. doi: 10.1093/ajcn/87.5.1219.
- 40 Nier A, Brandt A, Rajcic D, Bruns T, Bergheim I. Short-Term Isocaloric Intake of a Fructose- but not Glucose-Rich Diet Affects Bacterial Endotoxin Concentrations and Markers of Metabolic Health in Normal Weight Healthy Subjects. *Mol. Nutr. Food Res*. 2019, 63, 1800868. doi: 10.1002/mnfr.201800868.
- 41 Khoshbin K, Camilleri M. Effects of dietary components on intestinal permeability in health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 319: G589–G608, 2020. doi: 10.1152/ajpgi.00245.2020.
- 42 Aragonés G, Colom-Pellicer M, Aguilar C, Guiu-Jurado E, Martínez S, Sabench F, Porrás JA, Riesco D, Del Castillo D, Richart C, Auguet T. Circulating microbiota-derived metabolites: a „liquid“ biopsy? *Int J Obes* 44, 875–885 (2020). doi: 10.1038/s41366-019-0430-0.
- 43 Wang B, Jiang X, Cao M, Ge J, Bao Q, Tang L, Chen Y, Li L. Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep* 6, 32002 (2016). doi: 10.1038/srep32002.
- 44 Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, Yoshihara T, Goto H, Abe H, Komiya K, Kawaguchi M, Shimizu T, Ogihara T et al. Gut Dysbiosis and Detection of “Live Gut Bacteria” in Blood of Japanese Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Aug;37(8):2343-50 doi: 10.2337/dc13-2817.

- 45 Pierri L, Saggese P, Nuzio SG, Troisi J, Di Stasi M, Poeta M, Savastano R, Marchese G, Tarallo R, Massa G, Ciccone V, Ziegenhardt D, Cavallo P, Bergheim I, Weisz A, Vajro P. Relations of gut liver axis components and gut microbiota in obese children with fatty liver: A pilot study. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2018 Sep;42(4):387-390. doi: 10.1016/j.clinre.2018.03.015.
- 46 Maskarinec G, Raquinio P, Kristal BS, Setiawan VW, Wilkens LR, Franke AA, Lim U, Marchand LL, Randolph TW, Lampe JW, Hullar MAJ. The gut microbiome and type 2 diabetes status in the Multiethnic Cohort. *PLoS ONE* 16(6): e0250855. doi: 10.1371/journal.pone.0250855.
- 47 Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Humans Is Associated with Increased Plasma Endotoxin and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Concentrations and with Fructose Intake. *J Nutr* 2008 Aug;138(8):1452-5. doi: 10.1093/jn/138.8.1452.
- 48 Pussinen PJ, Havulinna AS, Lehto M, Sundvall J, Salomaa V. Endotoxemia Is Associated With an Increased Risk of Incident Diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Feb;34(2):392-7. doi: 10.2337/dc10-1676.
- 49 Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, Mohan V, Balasubramanyam M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2014 Mar;388(1-2):203-10. doi: 10.1007/s11010-013-1911-4.
- 50 Pang J, Xu W, Zhang X, Wong GLH, Chan AWH, Chan HY, Tse CH, Shu SST, Choi PCL, Chan HLY, Yu J, Wong VWS. Significant positive association of endotoxemia with histological severity in 237 patients with non - alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*.2017;46:175–182. doi: 10.1111/apt.14119.
- 51 Mehta NN, McGillicuddy FC, Anderson PD, Hinkle CC, Shah R, Pruscino L, Tabita-Martinez J, Sellers KF, Rickels MR, Reilly MP. Experimental Endotoxemia Induces Adipose Inflammation and Insulin Resistance in Humans. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):172-81. doi: 10.2337/db09-0367.

- 52 Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. doi: 10.1038/nr1863.
- 53 Mirea AM, Tack CJ, Chavakis T, Joosten LAB, Toonen EJM. IL-1 family cytokine pathways underlying NAFLD: towards new treatment strategies. *Trends Mol Med.* 2018 May; 24(5): 458–471. doi: 10.1016/j.molmed.2018.03.005.
- 54 Tilg H, Adolph TE, Moschen AR. Multiple Parallel Hits Hypothesis in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Revisited After a Decade. *Hepatology.* 2021 Feb;73(2):833-842. doi: 10.1002/hep.31518.
- 55 Muriel P, López-Sánchez P, Ramos-Tovar E. Fructose and the Liver. *Liver. Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6969. doi: 10.3390/ijms22136969.
- 56 Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. *Immunology* (2018) 155(4). doi: 10.1111/imm.13002.
- 57 Scarano F, Gliozzi M, Zito MC, Guarnieri L, Carresi C, Macrì R, Nucera S, Scicchitano M, Bosco F, Ruga S et al. Potential of Nutraceutical Supplementation in the Modulation of White and Brown Fat Tissues in Obesity-Associated Disorders: Role of Inflammatory Signalling. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3351. doi: 10.3390/ijms22073351.
- 58 Van De Craen B, Declerck PJ, Gils A. The Biochemistry, Physiology and Pathological roles of PAI-1 and the requirements for PAI-1 inhibition in vivo. *Thrombosis Research* 130(2012)576–585. doi: 10.1016/j.thromres.2012.06.023.
- 59 Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in Tissue Fibrosis. *J Cell Physiol.* 2012 February ; 227(2): 493–507. doi: 10.1002/jcp.22783.
- 60 Nier A, Huber Y, Labenz C, Michel M, Bergheim I, Schattenberg JM. Adipokines and Endotoxemia Correlate with Hepatic Steatosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Nutrients.* 2020 Mar; 12(3): 699. doi: 10.3390/nu12030699.
- 61 Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, Fagà E, Silli B, Pagano G. Dietary Habits and Their Relations to Insulin Resistance and Postprandial Lipemia in Nonalcoholic Steatohepatitis. *HEPATOLOGY*, Vol. 37, No. 4, 2003. doi: 10.1053/jhep.2003.50132.

- 62 Stephen AM, Champ MMJ, Cloran SJ, Fleith M, Van Lieshout L, Mejbourn H, Burley VJ. Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health. *Nutr Res Rev* 2017 Dec;30(2):149-190 doi: 10.1017/S095442241700004X.
- 63 De Angelis M, Montemurno E, Vannini L, Cosola C, Cavallo N, Gozzi G, Maranzano V, Di Cagno R, Gobbetti M, Gesualdo L. Effect of Whole-Grain Barley on the Human Fecal Microbiota and Metabolome. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Nov;81(22):7945-56. doi: 10.1128/AEM.02507-15.
- 64 Cronin P, Joyce SA, O'Toole PW, O'Connor EM. Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*. 2021 May; 13(5): 1655. doi: 10.3390/nu13051655.
- 65 Ghanim H, Batra M, Abuaysheh S, Green K, Makdissi A, Kuhadiya ND, Chaudhuri A, Dandona P. Antiinflammatory and ROS Suppressive Effects of the Addition of Fiber to a High-Fat High-Calorie Meal. *J Clin Endocrinol Metab* 102: 858–869, 2017. doi: 10.1210/jc.2016-2669.
- 66 Fei Y, Wang Y, Pang Y, Wang W, Zhu D, Xie M, Lan S, Wang Z. Xylooligosaccharide Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colonic Inflammation Caused by High Fat Diet Induced Obesity. *Front Physiol* 2020 Jan 22;10:1601 doi: 10.3389/fphys.2019.01601.
- 67 Parnell JA, Klancic T, Reimer RA. Oligofructose Decreases Serum Lipopolysaccharide and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Adults with Overweight/Obesity. *Obesity* (2017)25, 510-513. doi:10.1002/oby.21763.
- 68 Vilela S, Lopes C, Guiomar S, Severo M, Rangelova L, Petrova S, Horváth Z, Cseh J, Schweter A, Lindtner O, Ambrus Á, Torres D. Validation of a picture book to be used in a pan-European dietary survey. *Public Health Nutrition*:21(9), 1654-1663. doi: 10.1017/S1368980017004153.
- 69 Hoffmann I (Hrsg.), Spiller A (Hrsg.). Auswertung der Daten der Nationalen Verzehrsstudie II (NVS II): eine integrierte verhaltens- und lebensstilbasierte Analyse des Bio-Konsums. Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Internet: <https://www.mri.bund.de> (Zugriff am 21.4.2022).

- 70 Duffey KJ, Davy BM. The Healthy Beverage Index Is Associated with Reduced Cardiometabolic Risk in US Adults: A Preliminary Analysis. *J Acad Nutr Diet*. 2015;115:1682-1689. doi: 10.1016/j.jand.2015.05.005.
- 71 Popkin BM, Armstrong LE, Bray GM, Caballero B, Frei B, Willet WC. A new proposed guidance system for beverage consumption in the United States. *Am J Clin Nutr* 2006;83:529 – 42. doi: 10.1093/ajcn.83.3.529.
- 72 Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 1990 Feb;51(2):241-247. doi: 10.1093/ajcn/51.2.241.
- 73 Kohl TO, Ascoli CA. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb Protoc*; 2017. doi:10.1101/pdb.prot093708.
- 74 Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72 (2015) 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012 0196-978.
- 75 Yang TT, Sinai P, Kitts PA, Kain R. Quantification of Gene Expression with a Secreted Alkaline Phosphatase Reporter System. *BioTechniques* 23:1110-1114 (December 1997). doi: 10.2144/97236pf01.
- 76 Invivogen: Produktspezifikation für HEK-Blue™ hTLR2 reporter cells. Internet: <https://www.invivogen.com/hek-blue-htlr2> (Zugriff am 5.2.2022).
- 77 Invivogen: Produktspezifikation für HEK-Blue™ hTLR4 reporter cells. Internet: <https://www.invivogen.com/hek-blue-htlr4> (Zugriff am 5.2.2022).
- 78 Jung F, Burger K, Staltner R, Brandt A, Mueller S, Bergheim I. Markers of Intestinal Permeability Are Rapidly Improved by Alcohol Withdrawal in Patients with Alcohol-Related Liver Disease. *Nutrients* 2021, 13, 1659. doi: 10.3390/nu13051659.
- 79 Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc*; doi: 10.1101/pdb.prot102269.
- 80 Rekowski A, Langenkämper G, Dier M, Wimmer MA, Scherf KA, Zörb C. Determination of soluble wheat protein fractions using the Bradford assay. *Cereal Chemistry*. 2021;98:1059–1065. doi: 10.1002/cche.10447.

- 81 Carranza-Oropeza MV, Sherrill AW, Sanders JR, Arce PE, Giudici R. Performance assesment of protein electrophoresis by using polyacrylamide hydrogel with porous structure modified with SDS micelles as template. J. APPL. POLYM. SCI. 2016. doi: 10.1002/APP.44063.
- 82 Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. Scand J Med Sci Sports. 2017 January ; 27(1): 4–25. doi: 10.1111/sms.12702.
- 83 BioLegend®: How Western Blotting Works. Internet: <https://www.biolegend.com/fr-fr/western-blot/how-western-blotting-works> (Zugriff am 20.4.2022).
- 84 Yang L, Jin M, Du P, Chen G, Zhang C, Wang J, Jin F, Shao H, She Y, Wang S, Zheng L, Wang J. Study on Enhancement Principle and Stabilization for the Luminol-H₂O₂-HRP Chemiluminescence System. PLoS One. 2015; 10(7): e0131193. doi: 10.1371/journal.pone.0131193.
- 85 Huang T, Xu M, Lee A, Cho S, Qi L. Consumption of whole grains and cereal fiber and total and cause-specific mortality: prospective analysis of 367,442 individuals. BMC Med 13, 59 (2015). doi: 10.1186/s12916-015-0294-7.
- 86 Dorosti M, Heidarloo AJ, Bakhshimoghaddam F, Alizadeh M. Whole-grain consumption and its effects on hepatic steatosis and liver enzymes in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised controlled clinical trial. Br J Nutr 2020 Feb 14;123(3):328-336. doi: 10.1017/S0007114519002769.
- 87 Davison KM, Temple NJ. Cereal fiber, fruit fiber, and type 2 diabetes: Explaining the paradox. J Diabetes Complications. 2018 Feb;32(2):240-245. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2017.11.002.
- 88 Chen T, Chen D, Tian G, Zheng P, Mao X, Yu J, He J, Huang Z, Luo Y, Luo J, Yu B. Soluble Fiber and Insoluble Fiber Regulate Colonic Microbiota and Barrier Function in a Piglet Model. Biomed Res Int. 2019; 2019: 7809171. doi: 10.1155/2019/7809171.
- 89 Ayua EO, Kazem AE, Hamaker BR. Whole grain cereal fibers and their support of the gut commensal Clostridia for health. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, Volume 24, 2020, 100245 doi: 10.1016/j.bcdf.2020.100245.

- 90 Liu W, Luo X, Tang J, Mo Q. A bridge for short-chain fatty acids to affect inflammatory bowel disease, type 1 diabetes, and non-alcoholic fatty liver disease positively: by changing gut barrier. *Eur J Nutr.* 2021 Aug;60(5):2317-2330. doi: 10.1007/s00394-020-02431-w.
- 91 Guan ZW, Yu EZ, Feng Q. Soluble Dietary Fiber, One of the Most Important Nutrients for the Gut Microbiota. *Molecules* 2021, 26, 6802. doi: 10.3390/molecules26226802.
- 92 Kundi ZM, Lee JCY, Pihlajamäki J, Chan CB, Leung KS, Sik Yu So S, Nordlund E, Kolehmainen M, El-Nezami H. Dietary Fiber from Oat and Rye Brans Ameliorate Western Diet-Induced Body Weight Gain and Hepatic Inflammation by the Modulation of Short-Chain Fatty Acids, Bile Acids, and Tryptophan Metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* 2021;65,1900580. doi: 10.1002/mnfr.201900580
- 93 Hughes SA, Shewry PR, Gibson GR, McCleary BV, Rastall RA. In vitro fermentation of oat and barley derived β -glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008 Jun;64(3):482-93. doi: 10.1111/j.1574-6941.2008.00478.x.
- 94 Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE). In: Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Neuer Umschau Buchverlag, Bonn, 2. Auflage, 1. Ausgabe 2015.
- 95 Rebello CJ, O'Neil CE, Greenway FL. Dietary fiber and satiety: the effects of oats on satiety. *Nutr Rev.* 2016 Feb; 74(2): 131–147. doi: 10.1093/nutrit/nuv063.
- 96 Wanders AJ, Van den Borne JJGC, De Graaf C, Hulshof T, Jonathan MC, Kristensen M, Mars M, Schols HA, Feskens EJM. Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obes Rev.* 2011 Sep;12(9):724-39. doi: 10.1111/j.1467-789X.2011.00895.x.

- 97 Song WO, Chun OK, Kerver J, Cho S, Chung CE, Chung SJ. Ready-to-Eat Breakfast Cereal Consumption Enhances Milk and Calcium Intake in the US Population. *J Am Diet Assoc.* 2006 Nov;106(11):1783-9. doi: 10.1016/j.jada.2006.08.015.
- 98 Holmes BA, Kaffa N, Campbell K, Sanders TAB. The contribution of breakfast cereals to the nutritional intake of the materially deprived UK population. *Eur J Clin Nutr* 66, 10–17 (2012). doi: 10.1038/ejcn.2011.143.
- 99 Ocké MC. Evaluation of methodologies for assessing the overall diet: dietary quality scores and dietary pattern analysis. *Proc Nutr Soc.* 2013 May;72(2):191-9. doi: 10.1017/S0029665113000013.
- 100 Träger M, Peltner J, Thiele S. Evaluation of diet quality by means of the Healthy Eating Index and its modified variants. *Ernährungs-Umschau international* (2016), Nr 5, S 110-118. doi: 10.4455/eu.2016.023.
- 101 Schwingshackl Lukas, Hoffmann G. Diet Quality as Assessed by the Healthy Eating Index, the Alternate Healthy Eating Index, the Dietary Approaches to Stop Hypertension Score, and Health Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *J Acad Nutr Diet.* 2015 May;115(5):780-800. doi: 10.1016/j.jand.2014.12.009.
- 102 Yildiz SY, Kuru P, Oner ET, Agirbasli M. Functional Stability of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 85829. doi: 10.1155/2014/858293.
- 103 Tjärnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Thrombotic Cerebrovascular Diseases. *Stroke.* 2012 Oct; 43(10): 2833–2839. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.622217.
- 104 Chang ML, Hsu CM, Tseng JH, Tsou YK, Chen SC, Shiau SS, Yeh CT, Chiu CT. Plasminogen activator inhibitor-1 is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease whereas leptin and adiponectin vary between genders. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 Feb;30(2):329-36. doi: 10.1111/jgh.12705.

- 105 Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 (PAI-1): A KEY FACTOR LINKING FIBRINOLYSIS AND AGE-RELATED SUBCLINICAL AND CLINICAL CONDITIONS. *Cardiovasc Ther.* 2010 October ; 28(5): e72–e91. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00171.x.
- 106 Sillen M, Declerck PJ. A Narrative Review on Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its (Patho)Physiological Role: To Target or Not to Target? *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2721. doi: 10.3390/ijms22052721.
- 107 Kristensen M, Bügel S. A diet rich in oat bran improves blood lipids and hemostatic factors, and reduces apparent energy digestibility in young healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr* 65, 1053–1058 (2011). doi: 10.1038/ejcn.2011.102.
- 108 Belobrajdic DP, Lam YY, Mano M, Wittert GA, Bird AR. Cereal based diets modulate some markers of oxidative stress and inflammation in lean and obese Zucker rats *Hepatology. Nutrition & Metabolism* 8(1):27. doi: 10.1186/1743-7075-8-27.
- 109 Fianchi F, Liguori A, Gasbarrini A, Grieco A, Miele L. Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) as Model of Gut–Liver Axis Interaction: From Pathophysiology to Potential Target of Treatment for Personalized Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6485. doi: 10.3390/ijms22126485.
- 110 Vaure C, Liu Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol.* 2014 Jul 10;5:316. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316.
- 111 Liu S, Khemlani LS, Shapiro RA, Johnson ML, Liu K, Geller DA, Watkins SC, Goyert SM, Billiar TR. Expression of CD14 by Hepatocytes: Upregulation by Cytokines during Endotoxemia. *Infect Immun.* 1998 Nov;66(11):5089-98. doi: 10.1128/IAI.66.11.5089-5098.1998.
- 112 De Courten B, Moreno-Navarrete JM, Lyons J, Soldatos G, De Courten M, Dougherty S, Forbes J, Fernández-Real JM. Contrasting association of circulating sCD14 with insulin sensitivity in non-obese and morbidly obese subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2016;60,103–109. doi: 10.1002/mnfr.201500102.
- 113 Nier A, Engstler AJ, Maier IB, Bergheim I. Markers of intestinal permeability are already altered in early stages of non-alcoholic fatty liver disease: Studies in children. *PLoS ONE* 12(9):e0183282. doi: 10.1371/journal.pone.0183282.

- 114 You S, Hu X, Zhao Q, Chen X, Xu C. Oat β -glucan inhibits lipopolysaccharide-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Food Funct.*, 2013, 4, 1360. doi: 10.1039/c3fo60081e.
- 115 Fehlbaum S, Prudence K, Kieboom J, Heerikhuisen M, Van de Broek T, Schuren FHJ, Steiner RE, Raederstorff D. In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota. *Int J Mol Sci* 2018 Oct 10;19(10):3097. doi: 10.3390/ijms19103097.
- 116 Carlson JL, Erickson JM, Hess JM, Gould TJ, Slavin JL. Prebiotic Dietary Fiber and Gut Health: Comparing the in Vitro Fermentations of Beta-Glucan, Inulin and Xylooligosaccharide. *Nutrients*. 2017 Dec; 9(12): 1361. doi: 10.3390/nu9121361.
- 117 Pham VT, Seifert N, Richard N, Raederstorff D, Steiert R, Prudence K, Hasan M. The effects of fermentation products of prebiotic fibres on gut barrier and immune functions in vitro. *PeerJ*. 2018; 6: e5288. doi: 10.7717/peerj.5288.