

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Einfluss einer kohlenhydratarmen Fütterung
auf den Stickstoff-Stoffwechsel
und die Kalziumverfügbarkeit bei Ratten**

von Lena Frommelt
aus Hechingen

München 2015

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.- Prof. Dr. Ellen Kienzle

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Für meine Eltern,
Hanna, Oma Gerda und Malte

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VI
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT.....	3
1. Einsatzgebiete der kohlenhydratarmen Ernährung.....	3
2. Effekte der kohlenhydratarmen Ernährung auf die Stickstoff-Bilanz, die Körperzusammensetzung und die Leistung von Tieren.....	5
3. Effekte der Fütterung von Fett auf die Absorption von Kalzium.....	9
3.1. Physiologie der intestinalen Kalziumresorption.....	9
3.2. Physiologie der Fettresorption.....	9
3.3. Einfluss des Fettgehalts und der Fettart auf die Absorption von Kalzium und die Mineralisierung der Knochen.....	10
3.3.1. Studien beim Menschen.....	10
3.3.2. Studien beim Hund.....	11
3.3.3. Studien beim Schwein.....	12
3.3.4. Studien beim Huhn.....	12
3.3.5. Studien bei Ratten.....	13
III. PUBLIKATION 1.....	15
IV. PUBLIKATION 2.....	36
V. DISKUSSION.....	59

1. Diskussion der Methoden	59
2. Diskussion der Ergebnisse	61
2.1. Wachstum, Energie- und Stickstoff-Stoffwechsel.....	61
2.2. Körperzusammensetzung und Blutwerte	63
2.3. Verdaulichkeit der Nährstoffe und Mineralstoffe	65
2.4. Kernpunkte	68
VI. ZUSAMMENFASSUNG	70
VII. SUMMARY	73
VIII. LITERATURVERZEICHNIS	75
IX. DANKSAGUNG	88

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATPase	Adenosintriphosphatase
BW	body weight; Körpermasse
bzw.	beziehungsweise
Ca	calcium; Kalzium
Cu	Kupfer
d	day; Tag
dcp	digestible crude protein; verdauliches Rohprotein
DE	digestible energy; verdauliche Energie
DM	dry matter; Trockensubstanz
et al.	et alii, -ae, -a; und andere
Fe	Ferrum; Eisen
Fig.	Figure; Abbildung
g	Gramm
GE	gross energy; Bruttoenergie
GH	growth hormone; Wachstumshormon
GLUT 1	Glukosetransporter 1
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
I	Iod
i.e.	id est; das ist
IE	Internationale Einheit
IGF 1	insulin-like growth factor 1; insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1

K	Kalium
KD	ketogenic diet; ketogene Diät
Kg	Kilogramm
kJ	Kilojoule
L	Liter
LBM	lean body mass; fettreie Körpermasse
LC	low-carbohydrate; kohlenhydratarm
LCHF	low-carbohydrate, high-fat; kohlenhydratarm, hoher Fettgehalt
ME	metabolizable energy; umsetzbare Energie
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MJ	Megajoule
Mn	Mangan
n	Anzahl
N	nitrogen; Stickstoff
Na	Natrium
NfE	nitrogen--free extracts; Stickstoff-freie Extraktstoffe
P	Phosphor
P; p	p-value; Signifikanzwert
PTH	parathyroid hormone; Parathormon
R; r^2	coefficient of determination; Bestimmtheitsmaß
SD	standard deviation; Standardabweichung
SE	standard error; Standardfehler
Se	Selen
SEE	standard error of the estimate; Standardabweichung vom Schätzer
sV	scheinbare Verdaulichkeit

Tab.	Table; Tabelle
u.a.	unter anderem
Vit.	Vitamin
wV	wahre Verdaulichkeit
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Beziehung zwischen dem aufgenommenen Rohfett (x ; g/Tag) und dem scheinbar verdauten Rohfett (y ; g/Tag)
- Abb. 2 Rohfett-Gehalt des Körpers (g/Ratte)
- Abb. 3: Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium (Ca) zu scheinbar verdaulichem Phosphor (P) in g/g/Tier/Tag
- Abb. 4: Beziehung zwischen der Menge an Kot-TS (x ; g/kg BW/Tag) und der fäkalen Natriumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag)

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Kalziumaufnahme (g/Tier/Tag)

I. EINLEITUNG

Eine kohlenhydratarme (LC, low-carbohydrate) Diät wurde und wird häufig zur Gewichtsabnahme bei übergewichtigen Menschen eingesetzt. Eine erste Variante der LC-Diät zur Gewichtsabnahme entwickelte BANTING (1863) in England. Die populärste Phase hatte die LC-Diät zur Gewichtsreduktion als sogenannte „Atkins-Diät“ (ATKINS, 1972). BRAVATA et al. (2003) stellten dar, dass Wissenschaftler später kontrovers über Nutzen und Risiken dieser Form der Diät diskutierten.

Eine Variante der LC-Diät stellt eine ketogene Diät (KD) dar. BAUMEISTER et al. (2003) und BAUMEISTER und KLEPPER (2012) beschrieben diese für den Menschen als sehr fettreiche, protein- und energiebilanzierte LC-Diät. Die Autoren erklärten, dass Kohlenhydrate in so geringem Maße vorhanden sind, dass der Organismus seinen Energiebedarf nicht aus ihnen decken kann und deshalb Ketonkörper aus Nahrungsfett oder den Fettreserven des Körpers und über die Glukoneogenese Glukose aus Nahrungs-Protein gebildet werden. Die durch eine KD erzeugte Ketose wurde und wird in der Humanmedizin für verschiedene medizinische Zwecke genutzt. Ihre neuroprotektive Eigenschaft wurde u.a. angewandt zur Senkung der Anfallshäufigkeit bei pharmakoresistenter und inoperabler Epilepsie bei Kindern, beim Glukosetransporter-1 (GLUT-1) -Defekt und beim Pyruvatdehydrogenase-Mangel (BAUMEISTER und KLEPPER, 2012). Es sind vielfältige Nebenwirkungen beschrieben und ausführlich untersucht worden. Neben Apathie, Appetitminderung, Hypoglycämie, Hyperlipidämie und metabolischer Acidose beschrieben BAUMEISTER und KLEPPER (2012) z.B. massive Störungen im Kalzium-, Phosphor- und Knochenstoffwechsel und Wachstumsstörungen.

Die Vor- und Nachteile und die Wirkungsweise der KD wurden in vielen Tierversuchen erforscht. Eine LC-Diät (i.d.R. gekoppelt mit einem entsprechend hohen Fettgehalt) wurde bei verschiedenen Tierarten untersucht.

Viele Autoren stellten eine Wachstumshemmung und/oder Leistungsreduktion fest (ALLRED, 1969; KIENZLE et al., 1985; BIELOHUBY et al., 2010; JORNAYVAZ et al., 2010). Es wurden verschiedene Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung der Tiere beschrieben: etwa ein gesteigerter Fettgehalt und gleichzeitig erniedrigter Stickstoffgehalt des Körpers (JORNAYVAZ et al., 2010; BIELOHUBY et al., 2011a) oder ein erhöhter Fettgehalt der Leber (HYND und ROTTER, 1930; RESNICK, 1978; AXEN und AXEN, 2006). In einer Studie von BIELOHUBY et al. (2011a) mit Ratten erzeugte ein proteinunabhängiger LC-Effekt einer LCHF-Diät (low-carbohydrate, high-fat; kohlenhydratarme Hochfett-Diät) eine verminderte Expression von Wachstumshormon-Rezeptoren in der Leber mit entsprechend negativen Auswirkungen auf das Wachstum, eine Akkumulation von viszeralem Fett, einer Leberverfettung und einem gestörten Knochenwachstum.

Beim Menschen und beim Tier wurde bei Anwendung einer KD eine beeinträchtigte Knochenbildung und Knochenmineralisierung festgestellt (LAC et al., 2008; BIELOHUBY et al., 2010). Die negativen Auswirkungen eines hohen Fettgehalts einer Diät (mehr ausgeprägt bei schlecht verdaulichen Fetten mit gesättigten, langkettigen Fettsäuren) auf die Kalziumabsorption und die Knochenmineralisierung wurden von vielen Autoren beschrieben (TADAYYON und LUTWAK, 1969; ATTEH et al., 1983; SALEM et al., 1992).

Bei der Ratte zeigte sich in einer Studie von BIELOHUBY et al. (2011b), dass eine Ketose nur dann sicher erzeugt werden konnte, wenn die LC-Diät außer dem hohen Fettgehalt einen sehr geringen Proteingehalt aufwies. Eine proteinbilanzierte KD erzeugte keine messbare Erhöhung von Ketonkörpern im Blut der Ratten. Die negativen LC-Effekte auf das Wachstum und die Leistung von Tieren konnte in Studien durch eine Erhöhung des Proteingehalts der Diäten verbessert werden, sie wurden aber nie ganz ausgeglichen (RENNER, 1964; KIENZLE et al., 1985).

In der folgenden Arbeit wurde bei Ratten der Einfluss von LC(HF)-Diäten mit verschiedenem Fett/Protein-Verhältnis, mit und ohne Erzeugung einer Ketose, auf die Energiebilanz, den Stickstoff-Stoffwechsel, die Körperzusammensetzung, einige Blutwerte und auf die Verdaulichkeit der Rohnährstoffe, Mineralstoffe und Spurenelemente überprüft. Es wurden LC-Effekte, Effekte der Ketose, Effekte des niedrigen Proteingehalts und Effekte des hohen Fettgehalts der Diäten untersucht und differenziert. Möglichkeiten und Probleme bei der Zusammensetzung einer KD für Ratten wurden diskutiert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Einsatzgebiete der kohlenhydratarmen Ernährung

Kohlenhydratarme (LC, low-carbohydrate) Diäten werden beim Menschen schon seit langer Zeit als Diäten zur Gewichtsreduktion angewandt. Die erste Diät dieser Art wurde von BANTING (1863) in England veröffentlicht. LUTZ (1986) stellte neben einer Gewichtsabnahme auch andere gesundheitsförderliche Aspekte seiner in den 50er- und 60er-Jahren entwickelten „Lutz-Diät“ fest. Am populärsten wurde die LC-Diät in den USA als sogenannte „Atkins-Diät“ (ATKINS, 1972; ATKINS, 1998). Bücher, die die Anwendung der LC-Diät beschreiben, wurden in den 90er-Jahren in den USA millionenfach verkauft (HELLER und HELLER, 1993; SEARS und LAWREN, 1995).

Die Sicherheit und die Nebenwirkungen der LC-Diät wurden zu einem späteren Zeitpunkt kontrovers diskutiert. BRAVATA et al. (2003) gaben hierzu einen Überblick. In den letzten Jahren erschienene Bücher propagierten (HEIMOWITZ, 2013) und kritisierten (CAMPBELL, 2014) LC-Diäten zur Gewichtsreduktion bezüglich ihrer Effektivität und ihrer Nebenwirkungen.

PAOLI et al. (2013) zeigten, dass die Mechanismen, die bei einer LC-Diät zur Gewichtsreduktion beim Menschen führten, zum Zeitpunkt ihrer Publikation noch nicht vollständig geklärt waren. Erklärungsversuche lieferten BLUNDELL et al. (1994), VOLEK und WESTMANN (2002) und ERLANSON-ALBERTSSON und MEI (2005), die ein erhöhtes Sättigungsgefühl (z.B. in Zusammenhang mit der erzeugten Ketose) feststellten. JOHNSTON et al. (2006) fanden heraus, dass eine LC-Diät zur Gewichtsreduktion keine ketogene Diät (KD) sein musste. Die KD hatte keine metabolischen Vorteile gegenüber einer nicht-ketogenen LC-Diät. VOLEK et al. (2002) stellten fest, dass die Umverteilung der Nährstoffe weg von den Fettspeichern (vermittelt durch den Proteinkatabolismus der Ketose) und gleichzeitig die Zunahme fettfreier Körpermasse und der Anstieg der Stoffwechselrate zur Gewichtsabnahme bei LC-Diäten führten.

Die Effektivität einer ketogenen LC-Diät als unterstützende Therapie zur Behandlung der Epilepsie des Menschen (meist bei einer pharmakoresistenten und inoperablen Form der Epilepsie bei Kindern) wurde durch zahlreiche Studien gut belegt. Die ersten Erfolge in Kliniken wurden im frühen 20. Jahrhundert beschrieben (WILDER, 1921; PETERMANN, 1931; KESSLER et al., 2011). Von einer deutlichen Reduktion der Anfallsaktivität berichteten in den 70er-Jahren LIVINGSTON et al. (1972) und HUTTENLOCHER (1976).

KLEPPER und LEIENDECKER (2002) beschrieben, dass die Häufigkeit der Anwendung der

KD zur Therapie der Epilepsie aufgrund der Entwicklung neuer Antikonvulsiva abnahm. Durch Fehlschlagen der antikonvulsiven medikamentösen Therapie und zur selben Zeit veröffentlichte Erfolge der in diesen Fällen erfolgreich angewendeten KD stieg das Interesse an der KD zur Behandlung der Epilepsie in den USA wieder an (FREEMAN et al., 1998).

Bis heute wurden sehr viele Studien zum erfolgreichen Einsatz der KD veröffentlicht (VINING et al., 1998; LEFEVRE und ARONSON, 2000; KLEPPER und LEIENDECKER, 2002; KOSSOFF et al., 2002; PORTA et al., 2009; HONG et al., 2010). Laut KOSSOFF et al. (2011) war die KD als unterstützende Therapie zur Medikation in allen großen Zentren für Epilepsiebehandlung der Welt etabliert. Den zugrundeliegenden Mechanismus der KD zur Reduzierung der Anfallshäufigkeit beschrieben KESSLER et al. (2011) als noch nicht vollständig geklärt. OWEN et al. (1967) untersuchten Auswirkungen einer Ketose auf den Gehirnstoffwechsel. MA et al. (2007) stellten eine positive Wirkung der KD auf neurologische Entgleisungen durch eine Modulation der ATP-abhängigen Kaliumkanäle fest.

Zur Therapie des Glukosetransporter (GLUT-1) -Defekts (KLEPPER et al., 2005; BAUMEISTER und KLEPPER, 2012) und des Pyruvatdehydrogenase-Mangels (WEXLER et al., 1997; BAUMEISTER und KLEPPER, 2012) beim Menschen, beides Erkrankungen des zerebralen Energiestoffwechsels, wurde die KD von NORDLI und DE VIVO (1997) als etabliert beschrieben. BAUMEISTER und KLEPPER (2012) berichteten von weiteren Indikationen, wie der Anwendung der KD beim Komplex-I-Defekt der Atmungskette und beim Rett-Syndrom. In der aktuelleren Forschung wurden bei vielen weiteren Erkrankungen des Menschen positive Auswirkungen einer KD untersucht, z.B. bei Typ2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Alzheimer und Parkinson (PAOLI et al., 2013). STAFSTROM und RHO (2012) beschrieben positive Auswirkungen (durch die neuroprotektive Rolle der KD) bei Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und amyotropher Lateralsklerose. Die Mitochondrienfunktion konnte durch eine KD verbessert werden, und sie wurde auch in der Onkologie als therapeutische Möglichkeit zur Tumorbehandlung überprüft.

Bei vielen Untersuchungen zur Anwendung, zur Effektivität, zu Nebenwirkungen und zu Mechanismen der LC-Diät bzw. KD wurden Versuchstiere genutzt. Beispiele sind die Ratte zur Untersuchung der Regulation von Energiebilanz und Gesichtswiederzunahme bei LCHF-Diäten (low-carbohydrate, high-fat; kohlenhydratarme Hochfett-Diäten) (CATON et al., 2008) und die Maus bei der Untersuchung zur Effektivität einer KD bei einem malignen Gehirntumor (ZHOU et al., 2007).

2. Effekte der kohlenhydratarmen Ernährung auf die Stickstoff-Bilanz, die Körperzusammensetzung und die Leistung von Tieren

Die Effekte einer kohlenhydratarmen (LC, low-carbohydrate) oder kohlenhydratfreien Diät auf das Wachstum, die Leistung, die Körperzusammensetzung und die Blutwerte bei verschiedenen monogastrischen Tierarten wurden in vielen Studien untersucht.

Bei der Maus und der Ratte wurde eine Gewichtsabnahme bzw. Wachstumsretardation bei LC- oder kohlenhydratfreien Diäten mit hohem Fettgehalt beschrieben (HYND und ROTTER, 1930; GOLDBERG, 1971; MCCARGAR et al., 1989; KENNEDY et al., 2007; RUSKIN et al., 2009; BIELOHUBY et al., 2010; JORNAYVAZ et al., 2010). Beim Huhn stellten RENNER (1964) und ALLRED (1969) eine Gewichtsabnahme bei LC- oder kohlenhydratfreien Diäten fest. ALLRED und ROEHRIG (1970) beschrieben für das Huhn eine sinkende glykolytische und steigende glukogene Enzymaktivität in der Leber bei kohlenhydratfreien Diäten. Da auf diese Weise viele Aminosäuren verbraucht wurden, fehlten diese für das Wachstum der Tiere.

Es wurde von verschiedenen Autoren gezeigt, dass es bei Erhöhung des Proteinanteils einer LC-Diät zur Verbesserung des Wachstums der Tiere kam. RENNER (1964) beschrieb, dass LC-Diäten bei Hühnern zur Wachstumsreduzierung führten und sich das Wachstum bei einer Erhöhung des Proteinanteils der Ration verbesserte, wobei auch bei LC-Diäten mit hohem Proteingehalt die Höhe der Gewichtszunahme der Tiere der kohlenhydrathaltigen Diät der Kontrollgruppe nicht erreicht wurde. BIELOHUBY et al. (2011a) stellten in ihrer Studie bei Ratten fest, dass auch bei Erhöhung des Proteingehalts einer LC-Diät mit hohem Fettgehalt und verbessertem Wachstum der Tiere ein proteinunabhängiger LC-Effekt auf das Wachstum bestehen blieb. Bei wachsenden Hunden untersuchten BELO et al. (1976) und ROMSOS et al. (1976) kohlenhydratfreie Diäten und stellten kein reduziertes Wachstum fest. Allerdings lag der Proteingehalt der kohlenhydratfreien Diäten dieser Versuche über den Empfehlungen für wachsende Hunde (NRC, 2006).

Negative Auswirkungen von LC-Diäten auf die Reproduktionsleistung von Ratten beschrieben TAYLOR et al. (1983). ROMSOS et al. (1981) zeigten, dass bei einer kohlenhydratfreien Diät, mit einem zur kohlenhydrathaltigen Kontrolldiät identischen Proteingehalt, die Reproduktionsleistung von Hündinnen reduziert war. Die Autoren bemerkten eine veränderte Milchzusammensetzung mit erhöhtem Fettgehalt und vermindertem Laktosegehalt und die Jungtiersterblichkeit nahm zu. KIENZLE et al. (1985) beschrieben für Hündinnen, dass bei einer kohlenhydratarmen Diät, mit einem geringeren Proteingehalt als in der von ROMSOS et al. (1981) verwendeten kohlenhydratarmen Diät, die Welpensterblichkeit erhöht war. Die Welpen hatten

geringere Geburtsgewichte und eine höhere Rate der perinatalen Sterblichkeit. Eine Erhöhung des Proteins in der Ration der Hündinnen über den Gehalt der von ROMSOS et al. (1981) verwendeten Diäten führte zu einem verbesserten Geburtsgewicht der Welpen und verminderte die perinatale Sterblichkeit. Im Vergleich zur kohlenhydrathaltigen Kontrolldiät verschwanden die bei der kohlenhydratfreien Ernährung beobachteten negativen Effekte auf die Reproduktionsleistung auch bei einer hohen Proteinaufnahme der Tiere nie vollständig. BLAZA et al. (1985) zeigten für eine kohlenhydratfreie Diät mit hohem Proteinanteil und einem über den Empfehlungen liegenden Aminosäuregehalt keine Gewichtsreduktion gravider Hündinnen und eine unveränderte Reproduktionsleistung. KRONFELD (1977) stellte für Rennhunde bei einer kohlenhydratfreien Diät mit hohem Proteingehalt eine verbesserte Leistung fest.

Beim Schwein beschrieben BEE et al. (2006) ein unverändertes Gewicht nach 3 Wochen LC-Diät. LEHESKA et al. (2002) stellten eine Gewichtsabnahme von Schweinen bei einer Fütterung einer LC-Diät mit hohem Proteingehalt fest. Auswirkungen auf die Reproduktion bei Schweinen untersuchten METZLER-ZEBELI et al. (2012) und METGES et al. (2012), wobei auch bei hohem Proteingehalt einer LC-Diät die Reproduktionsleistung reduziert war.

In Studien beim Hund, beim Huhn, bei der Ratte und der Maus konnte bei der Verwendung von kohlenhydratfreien oder LC-Diäten, v.a. bei proteinarmen Diäten, eine messbare Ketose erzeugt werden (ALLRED, 1969; HAMMEL et al., 1977; ROMSOS et al., 1981; TAYLOR et al., 1983; KIENZLE et al., 1985; KENNEDY et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007; RUSKIN et al., 2009; GARBOW et al., 2011). BIELOHUBY et al. (2011b) stellten fest, dass bei der Ratte die Erzeugung einer Ketose bei der Verwendung einer LC-Diät mit hohem Fettgehalt abhängig vom Proteingehalt der Diät war und sie zuverlässig nur bei sehr niedrigem Proteingehalt der Diät erzeugt werden konnte. Die Autoren beschrieben, dass ein moderater Proteingehalt genügend glukoplastische Aminosäuren für die Glukoneogenese enthielt und somit die Entstehung einer Ketose verhindert werden konnte. Auch RENNER und ELCOMBE (1967) fanden bei Versuchen mit Hühnern heraus, dass bei Erhöhung des Proteins einer LC-Diät die Ketose geringer ausgeprägt war.

Bei einer Proteinunterversorgung von Ratten beschrieben CREWS et al. (1969) einen negativen Effekt auf das Wachstum und KIRSCH et al. (1986) stellten eine reduzierte Futteraufnahme fest. Für den Menschen wurde gezeigt, dass eine reduzierte Nahrungsaufnahme auch als LC-Effekt und/oder als Effekt einer Ketose auftrat (RIOS, 2001; MCCLERNON et al., 2007; JOHNSTONE et al., 2008).

Die Zunahme von Körperfett und ein vermindertes LBM (lean body mass; fettfreie Körpermasse) bei LC-Diäten beschrieben BIELOHUBY et al. (2011a) bei der Ratte und JORNAYVAZ et al. (2010) bei der Maus. NAISMITH und CURSITER (1972) haben bei Ratten unter einer LC-Diät mit niedrigem Proteingehalt weniger Körperprotein und mehr Körperfett festgestellt als bei LC-Diäten mit höherem Proteingehalt. Andere

Studien an Ratten zeigten eine Abnahme von Körperfett und eine Zunahme von Körperprotein bei einer Erhöhung des Proteingehalts einer LC-Diät (HARTSOOK et al., 1973; SCHMID et al., 1984; MCCARGAR et al., 1989).

Beim Menschen wurde festgestellt, dass bei einer Störung der GH/IGF1 -Achse (growth hormone / insulin-like growth factor 1; Wachstumshormon / insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 -Achse) Auswirkungen auf das Wachstum, den Fett-Stoffwechsel, den Glukose-Stoffwechsel und die Knochenmineralisierung vorhanden waren (STEWART und ROTWEIN, 1996; ROSS, 2000).

Bei Mäusen konnte von LUQUE und KINEMAN (2006) eine reduzierte GH-Freisetzung bei einer Standard-Hochfett-Diät gezeigt werden.

CAPPON et al. (1993) stellten beim Menschen fest, dass Diäten mit hohem Fettgehalt Somatostatin stimulierten, was wiederum zu einer verminderten GH-Freisetzung führte. BIELOHUBY et al. (2011a) untersuchten LC-Diäten mit hohem Fettgehalt bei Ratten. Diese reduzierten, unabhängig von der Höhe des Gehalts an Protein und Fett, die Expression der GH-Rezeptoren in der Leber und führten zu einer partiellen GH-Resistenz der Leber. Die zentrale Regulation des GH war beeinträchtigt, was in einer Wechselwirkung mit der Akkumulation von viszeralem Fett und einem gestörten Knochenwachstum der Tiere stand. Da eine zur Kontrolldiät im Proteingehalt identische LC-Diät eine reduzierte GH-Rezeptor und IGF-1 Expression in der Leber zeigte, war für diese LC-Diät ein proteinunabhängiger LC-Effekt auf die GH/IGF1-Achse vorhanden. Im Vergleich von LC-Diäten mit zur Kontrolldiät unterschiedlich reduziertem Proteingehalt zeigte sich eine deutlichere Beeinträchtigung der GH/IGF1-Achse für die LC-Diät mit dem geringsten Proteingehalt. Auch MEJIA-NARANJO et al. (2003) stellten einen Einfluss der Höhe des Proteingehalts einer Diät auf die GH/IGF1-Achse bei Ratten fest. Beim Menschen wurde gezeigt, dass eine hohe Proteinaufnahme bzw. die Aufnahme an bestimmten Aminosäuren die GH-Freisetzung stimulierte (PENMAN et al., 1981; VAN VUGHT et al., 2008). FAN et al. (2009) beschrieben für Mäuse eine Leberverfettung beim Fehlen von GH-Rezeptoren. In einer Studie von BIELOHUBY et al. (2011a) zeigten Ratten mit beeinträchtigter GH/IGF1-Achse eine Leberverfettung. Für LC-Diäten wurde der Fettgehalt der Leber bei vielen Tierarten als erhöht beschrieben: beim Hund, bei der Ratte und bei der Maus (HYND und ROTTER, 1930; RESNICK, 1978; AXEN und AXEN, 2006; JORNAYVAZ et al., 2010; BIELOHUBY et al., 2011a; GARBOW et al., 2011). Ein erhöhtes Lebergewicht bei LC-Diäten beschrieben HYND und ROTTER (1930) für Ratten und Mäuse. Eine Hochregulation von Genen der Fettoxidation stellten PISSIOS et al. (2013) für Ratten und KENNEDY et al. (2007) für Mäuse unter einer LC-Diät fest. Erhöhte Leberwerte (ALT, AST oder GPT) wurden bei einer LC-Diät bei der Ratte (GOLDBERG, 1971; BIELOHUBY, 2011a) und der Maus (JORNAYVAZ et al., 2010; GARBOW et al., 2011) gemessen. Erhöhte freie Fettsäuren im Blut wurden für kohlenhydratfreie Diäten beim Hund (HAMMEL et al., 1977; ROMSOS et al., 1981) und beim Huhn (ALLRED, 1969) beschrieben, sowie für LC-Diäten beim Nerz (FINK et al., 2002) und bei der Ratte (BIELOHUBY et al., 2011a). Erhöhte Triglyceridspiegel im Blut stellten KONIJN et al. (1970), WILLIAMS et al. (2007) und JORNAYVAZ et al. (2010) bei

Ratten und Mäusen unter einer LC-Diät fest. Erhöhte Triglyceridspiegel im Serum von Ratten unter einer LC-Diät beschrieben BIELOHUBY et al. (2011a) als abhängig vom Fettgehalt. Der Triglycerid-Gehalt im Serum stieg mit steigendem Fettgehalt der LC-Diäten an.

Der für LC-Diäten beschriebene Effekt einer Fettakkumulation in der Leber wurde von WEBSTER (1942), KOSTERLITZ (1947) und KIRSCH et al. (1968) auch für eine Proteinmangelernährung bei Ratten beschrieben.

PISSIOS et al. (2013) stellten bei Ratten fest, dass die Ausbildung einer Fettakkumulation der Leber bei einer ketogenen LC-Diät durch eine Zugabe von Cholin reduziert werden konnte.

Für LC- oder kohlenhydratfreie Diäten wurde in Studien festgestellt, dass der Glykogengehalt der Leber bei der Ratte (HYND und ROTTER, 1930) und bei dem Huhn (RENNER und ELCOMBE, 1967) erniedrigt war. In der Studie von RENNER und ELCOMBE (1967) wurde ein unveränderter Glykogengehalt der Muskulatur der Hühner festgestellt. Beim Schwein war der Glykogengehalt der Muskulatur bei LC-Diäten mit hohem Proteingehalt erniedrigt (BEE et al., 2006). BIELOHUBY et al. (2011b) stellten eine verminderte Glukoneogenese bei Ratten unter einer LC-Diät mit hohem Fettgehalt, im Zusammenhang mit einer Fettakkumulation in der Leber, fest. Für LC-Diäten mit hohem Proteingehalt beschrieben EISENSTEIN et al. (1974) eine erhöhte Glukoneogenese bei der Ratte.

KONIJN et al. (1970) und BELO et al. (1976) beschrieben für Hunde und Ratten eine reduzierte Glukosetoleranz bei kohlenhydratfreien Diäten. KIENZLE et al. (1985) stellten fest, dass bei Hündinnen unter einer kohlenhydratfreien Diät der Plasmaglukosegehalt in den letzten 2-3 Wochen vor der Geburt vermindert war. Bei der von den Autoren verwendeten kohlenhydratfreien Diät mit einem hohen Proteingehalt wurde eine geringe Senkung des Plasmaglukosegehalts beobachtet. Bei der kohlenhydratfreien Diät mit einem geringen Proteingehalt hingegen wurde eine starke Senkung des Plasmaglukosegehalts beobachtet. Die Hündinnen entwickelten bei beiden kohlenhydratfreien Diäten eine verringerte Glukosetoleranz während der Gravidität und der Laktation.

Erhöhte Werte für Glukose und Insulin im Blut und die Ausbildung einer Insulinresistenz wurden bei der Ratte und der Maus unter LC- oder kohlenhydratfreien Diäten u.a. von HYND und ROTTER (1930), AXEN und AXEN (2005), KLAUS (2005) und JORNAYVAZ et al. (2010) beschrieben.

3. Effekte der Fütterung von Fett auf die Absorption von Kalzium

3.1. Physiologie der intestinalen Kalziumresorption

Viele Studien an Ratten zeigten eine aktive Resorption von Kalzium im Darm. Die Resorptionsrate war in einer Studie von KRAWITT und SCHEDL (1986) im Jejunum am höchsten. Über die Höhe der Rate im Ileum wurde kontrovers diskutiert (KARBACH und RUMMEL, 1987a). Die Kontaktzeit der Ingesta (mit dem darin enthaltenen Kalzium) mit der Mukosa des Darms war im Versuch von HALBRITTER (1971) für die Höhe der enteralen Resorption entscheidend. Im proximalen Dünndarm wurde Kalzium zum Großteil als ionisiertes Kalzium in Form eines aktiven Kationentransports resorbiert. Bei wachsenden und graviden Tieren war die Rate am höchsten (SCHACHTER et al., 1960). KARBACH und RUMMEL (1987b) beobachteten, dass auch im Dickdarm der Ratte Kalzium resorbiert wurde. Bei RIEMANN et al. (2007), LÖFFLER et al. (2013) und ANONYMUS (2013) wurde die intestinale Kalziumabsorption beim Menschen wie folgt beschrieben: 1) Bei einem hohem intraluminalen Kalziumgehalt als passive Diffusion auf parazellulärem Weg entlang eines elektrochemischen Gradienten durch Interzellularspalten (v.a. im Jejunum und Ileum) und 2) bei einem niedrigen intraluminalen Kalziumgehalt als aktive transzelluläre Resorption über Kalzium-Kanäle an der apikalen Enterozytenmembran und energieabhängig, z.B. durch eine Kalzium-ATPase, an der basolateralen Membran (stimuliert durch Vitamin D, v.a. im Duodenum). EWE (1974) zeigte beim Menschen die höchste Resorptionskapazität für das Duodenum und die quantitativ größte Resorptionsmenge für das Jejunum. MESSMANN (2011) beschrieb beim Menschen das Duodenum als Hauptort der Kalziumresorption, eine geringere Resorption findet laut Autor im Jejunum und Ileum statt.

3.2. Physiologie der Fettresorption

Bei ANONYMUS (2013) wurde die Fettresorption des Menschen als rasche und vollständige Resorption von kurz- und mittelkettigen Fettsäuren von den Enterozyten direkt ins Portalblut und für langkettige Fettsäuren der Transport in Chylomikronen über das Lymphgefäßsystem in den Blutkreislauf beschrieben. DOYLE (2004) stellte für den Menschen eine schlechtere Resorptionsfähigkeit der Fettsäuren mit größerer Kettenlänge (härteres Fett) fest und auch die Struktur der Fettmoleküle war für die Resorptionsfähigkeit entscheidend. Die Resorption war bei gesättigten, langkettigen Fettsäuren am schlechtesten. Rindertalg als hochgesättigtes Fett zeigte in Versuchen bei Schweinen, Hunden Katzen und Ratten eine schlechte Verdaulichkeit (LLOYD und

CRAMPTON, 1957; PEACHEY et al., 1999; MITCHAOTHAI et al., 2008; MACRI et al., 2011).

3.3. Einfluss des Fettgehalts und der Fettart auf die Absorption von Kalzium und die Mineralisierung der Knochen

3.3.1. Studien beim Menschen

Die ersten Versuchsergebnisse zum Einfluss von Fett auf die Absorption von Kalzium wurden Anfang des 20. Jahrhunderts beim Menschen beschrieben. Bereits STEINITZ (1903) stellte fest, dass bei Kindern ein hoher Gehalt an Rahm in der Nahrung die Absorption von Kalzium reduzierte. ROTHBERG (1907) untersuchte eine bei Kindern auftretende negative Kalziumbilanz bei fettreicher Nahrung. Die Autoren CRONHEIM und MÜLLER (1908) zeigten, dass bei Kindern mit moderater Fettaufnahme ein Teil des Kalziums durch das Fett gebunden wurde. BOSWORTH et al. (1918) fanden heraus, dass die Menge an ionisiertem Kalzium im Darm die Höhe der Seifenbildung bestimmte. Die Menge an Kalziumseifen, die dann tatsächlich ausgeschieden wurde, war abhängig von der Löslichkeit der gebildeten Seife. Auch TELFER (1921) stellte dies fest. Bei einem hohen Gehalt an Fettsäuren im Darm war Kalzium vermehrt als Kalziumseife im Stuhl zu finden. Die Höhe der Kalziumseifen im Stuhl war abhängig von der Höhe der freien Fettsäuren im Darm.

STEGGERDA und MITCHELL (1951) untersuchten den Einfluss von hohen Milchfettaufnahmen auf die Verdaulichkeit von Kalzium bei erwachsenen Männern. Die Autoren konnten keinen Effekt auf die Kalziumabsorption feststellen. AGNEW und HOLDSWORTH (1971) untersuchten den Einfluss von Palmöl und mittelkettigen Triglyzeriden auf die Absorption von Kalziumchlorid beim Menschen. Palmöl, nicht jedoch die mittelkettigen Triglyzeride, verringerten die Kalziumabsorption. LAVAL-JEANTET und LAVAL-JEANTET (1976) fanden heraus, dass es bei kurz- und mittelkettigen Fettsäuren, essentiellen Fettsäuren und Ölsäure zu einer Verbesserung der Kalziumabsorption kam. Bei langkettigen, gesättigten Fettsäuren und Erukasäure kam es zu einer Reduzierung der Kalziumabsorption und -retention. VAN DOKKUM et al. (1983) stellten fest, dass weder bei einer Fettaufnahme von bis zu 42% der Energie, noch bei einer Zulage von bis zu 16% der Energie als Linolsäure (bei insgesamt 42% der Energie als Fett) die Kalziumbilanz beeinträchtigt wurde. Einen Überblick zu Studien über den Einfluss von essentiellen Fettsäuren auf die Kalziumbilanz veröffentlichten KRUGER und HORROBIN (1997). Essentielle Fettsäuren hatten einen positiven Effekt auf die Kalziumresorption im Darm, welcher laut Autoren zum Teil durch eine Verstärkung der Vitamin D₃-Wirkung bedingt war. Die Autoren zitierten verschiedene Studien, in denen essentielle Fettsäuren die Kalziumretention und die Einlagerung von Kalzium in die Knochen, die Knochenstärke und die Synthese von Knochen-Kollagen verbesserten.

Eine als therapeutische Diät genutzte fettreiche KD zeigte in Studien mit Kindern

negative Einflüsse auf das Wachstum und die Knochengesundheit. VINING et al. (2002) und LIU et al. (2003) stellten ein reduziertes Wachstum der Kinder unter einer KD fest. NEAL et al. (2008) zeigten, dass epilepsiekranken Kinder unter einer therapeutischen KD ein verringertes Höhenwachstum (height z-score), bereits 6 Monate nach Therapiebeginn, aufwiesen. BERGQVIST et al. (2008) berichteten bei epilepsiekranken Kindern unter einer KD von einer deutlich reduzierten Knochenmineralisierung.

3.3.2. Studien beim Hund

LIU und MCCAY (1953) untersuchten den Einfluss der Höhe des Fettgehalts in der Ration von Hunden. Bei erwachsenen Hunden zeigte sich beim Vergleich eines Fettgehalts von 5% und 40% in der Ration (Fettzugabe als Rindertalg oder Maisöl) eine Tendenz zu einer negativen Kalziumbilanz bei der höheren Fettaufnahme. Bei einer von 3% auf 20% erhöhten Fettkonzentration (Zusatz von weißem Fett) in der Ration zeigte sich bei jungen Hunden kein erhöhter Bedarf an Kalzium (JENKINS und PHILLIPS, 1960).

HALLEBEEK und HAZEWINKEL (1997) untersuchten bei wachsenden Hunden die Kalzium- und Fettverdaulichkeit bei einer Diät mit hohem Fettgehalt. Es wurde dieser Diät im Vergleich zur Kontrolldiät Rindertalg zugesetzt und der Gehalt an Weizenstärke wurde reduziert. Die Tiere der Hochfett-Diät nahmen mehr Energie, mehr Kalzium und mehr Fett auf. Sie schieden mehr Fett und mehr Kalzium fäkal aus. Die scheinbare und wahre Verdaulichkeit von Kalzium war nicht signifikant beeinflusst. Die berechnete Bildung von Kalziumseifen für die Hochfett-Diät ergab 1,8% der Kalziumaufnahme, was bei einer hohen Kalziumaufnahme laut Autoren zu vernachlässigen war.

Eine weitere Studie bei Hunden, durchgeführt von LYMAN und beschrieben von GIVENS (1917), zeigte, dass eine schlechte Verdaulichkeit von Fetten die Kalziumausscheidung über die Fäzes erhöhte und eine negative Kalziumbilanz hervorrief, auch bei sehr reichlicher Kalziumzufuhr. Bei der Verfütterung von Palmitinsäure war die fäkale Ausscheidung von Kalziumseifen aufgrund der schlechten Verdaulichkeit erhöht.

Viele weitere Autoren beschrieben eine Bindung von Kalzium an Fette und eine daraus entstehende Bildung von schlecht resorbierbaren Kalziumseifen, durch welche wiederum die fäkale Fettausscheidung erhöht wurde (CHENG et al., 1949; APPLETON et al., 1992; MEYER und ZENTEK 2005).

DOBENECKER et al. (2010) untersuchten die Auswirkungen einer hohen Kalziumaufnahme bei wachsenden Hunden. Es zeigte sich, dass dadurch u.a. die Fettverdaulichkeit reduziert war. Bei einer Zugabe von Knochenschrot stellten MEYER und MUNDT (1983) bereits fest, dass sich die Fettverdaulichkeit reduzierte (bei fettreichen Diäten war dieser Effekt verstärkt). Auch in dieser Studie wurde eine Bildung von Kalziumseifen vermutet. Hohe Kalziumgaben reduzierten auch im Versuch von FRANK (2008) die Verdaulichkeit von Fett. Hunde dieses Versuches waren unter einem Alter von sechs Monaten nicht in der Lage, eine veränderte Kalziumzufuhr in der

Nahrung durch eine Veränderung der Kalziumabsorption aus dem Darmtrakt auszugleichen. In mehreren Studien wurde festgestellt, dass der Absorptionskoeffizient für Kalzium sich bei höherer Kalziumgabe nicht veränderte (GOEDEGEBUURE und HAZEWINKEL, 1986; SCHOENMAKERS et al., 2000; DOBENECKER, 2002; LAUTEN et al., 2002). In einer Studie von DOBENECKER et al. (2014) stellte sich heraus, dass sich der Hund bezüglich der Erforschung des Zusammenhangs von Kalziumaufnahme und Skelettentwicklung nicht als Modell für den Menschen eignete. Da erwachsene Hunde, im Vergleich zum Menschen, die Kalziumverdaulichkeit nicht der Höhe der Kalziumaufnahme anpassen konnten, war bei geringer Kalziumaufnahme keine Verbesserung der Kalziumverdaulichkeit festzustellen und es kam bei den Hunden mit geringer Kalziumaufnahme zu einer Erhöhung der Marker für die Knochenresorption.

3.3.3. Studien beim Schwein

Bei wachsenden Schweinen wurde der Einfluss verschiedener Fettarten auf die Bildung von Seifen im Darm untersucht. KADZERE und MOLNAR (1989) stellten fest, dass die Ausscheidung von Kotseifen signifikant von der Fettart abhängig war. Die Seifenbildung nahm mit Erhöhung des Anteils an langkettigen, gesättigten Fettsäuren zu. Ein Teil der Seifenbildung fand im Duodenum und Jejunum statt, der überwiegende Teil jedoch im Rektum.

3.3.4. Studien beim Huhn

ATTEH et al. (1983) testeten bei wachsenden Hühnern Diäten mit einem Fettgehalt von 0-9%. Sie konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Fettgehalt der Ration und dem Kalziumgehalt der Knochen der Tiere darstellen. Je mehr Fett in der Diät enthalten war, desto niedriger war der Kalziumgehalt der Knochen. Eine zusätzliche Gabe von Kalzium übers Futter verbesserte die negativen Auswirkungen des Fettes auf die Kalziumretention und die Knochenmineralisierung nicht. In dieser Studie testeten die Autoren auch die Auswirkungen von Maisöl als Fettquelle. Sie stellten fest, dass der Mineralstoffgehalt der Knochen und die Kalziumretention vermindert waren. In einer weiteren Studie testeten ATTEH und LEESON (1983) Diäten mit 8% Linolsäure, Ölsäure, Palmitinsäure oder Stearinsäure an wachsenden Hühnern. Palmitinsäure und Stearinsäure erzeugten eine vermehrte Bildung von Seifen im Kot, reduzierten gleichzeitig die Kalziumretention und senkten den Kalziumgehalt und den Aschegehalt der Knochen. Eine höhere Zugabe von Kalzium verbesserte diese negativen Auswirkungen nicht. Bei allen Tieren sank mit der Zugabe der Fettsäuren der Plasmagehalt an Kalzium signifikant. Eine weitere Studie von ATTEH und LEESON (1984) zeigte an wachsenden Hühnern bei allen Diäten mit 8% Oleat oder Palmitat oder eine Mischung beider (50/50) eine Seifenbildung im Darm. Bei Palmitatzugabe konnten zusätzlich eine verminderte Mineralstoffdichte und ein verminderter Kalziumgehalt der Knochen festgestellt werden. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Art des Fetts und der Kalziumdichte der Knochen abgeleitet werden. Wurde den Tieren

mehr Kalzium übers Futter zugegeben, reduzierte sich mit zusätzlicher Erhöhung des Fettgehalts im Futter die Kalziumretention und der Kalziumgehalt der Knochen. WOHL et al. (1998) fütterten ausgewachsenen Hähnen über 20 Wochen eine Diät mit einem Anteil von 10% (der TS) gesättigten Fettsäuren (zu 95,1% Tripalmitat). Es wurden ein reduzierter Mineralstoffgehalt und eine geringere Knochenstärke des spongiösen Knochens festgestellt.

3.3.5. Studien bei Ratten

Bei Ratten stellten verschiedene Autoren einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Fettgehalts und negativen Auswirkungen auf die Kalziumresorption fest (FRENCH, 1942; CHENG et al., 1949). KANE et al. (1949) beschrieben, dass mit steigendem Alter der Ratten und mit Erhöhung des Fettes in der Ration die Kalziumausscheidung mit den Fäzes anstieg. Ähnliche Ergebnisse fanden auch KAUP et al. (1990). Bei einer Diät mit hohem Fettgehalt (20% Butterfett) zeigten nicht die juvenilen, sondern die adulten Ratten eine verminderte Kalziumabsorption. Dies spiegelte sich auch im Auffinden von Kalziumseifen im Kot der adulten Tiere wider.

TADAYYON und LUTWAK (1969) zeigten an wachsenden Ratten, dass bei der Zugabe von Triglyzeriden zu einer fettfreien Diät die Menge und der Typ des Fettes eine große Rolle spielten. So verursachte in dieser Studie ein Gehalt von 25% Tripalmin oder Tristearin oder ein Gehalt von 20% Palmitat eine verringerte Kalziumabsorption und -retention. Keine Veränderung zeigte eine Zugabe von 5% Tristearin oder Triolein. CALVERLEY und KENNEDY (1949) gaben wachsenden Ratten eine 5%-ige Fettzugabe (Fett mit verschiedenen Schmelzpunkten) zu einer ausreichend mineralisierten Diät mit ausgewogenem Kalzium/Phosphor-Verhältnis. Es stieg die mit dem Kot ausgeschiedene Kalziummenge an, die Mineralisierung der Knochen war mit der Fettzugabe jedoch nicht beeinträchtigt. Die Kalziumausscheidung war höher bei langkettigen, gesättigten, schlecht absorbierbaren Fettsäuren (die Autoren vermuteten die Bildung von relativ unlöslichen Kalziumseifen) - wobei die Phosphorausscheidung nicht erhöht war. Bei kurzkettigen, ungesättigten und schnell absorbierbaren Fettsäuren war die Kalziumausscheidung weniger stark erhöht. Gleichzeitig war die Phosphorausscheidung erhöht, was laut Autoren darauf schließen lässt, dass es bei diesen Fettsäuren nicht zur Bildung von Kalziumseifen kam. Wenn sehr viel Kalzium über den Kot ausgeschieden wurde, war die renale Ausscheidung von Kalzium geringer und die renale Ausscheidung von Phosphor höher.

In einer Studie von GACS und BARLTROP (1977) wurde männlichen, wachsenden Ratten eine Gabe von verschiedenen Fettseifen mit der gleichen Menge Kalzium ins Duodenum, distal einer operativ gesetzten Ligatur, eingegeben und daraufhin die Kalziumabsorption gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Absorption von Kalzium negativ mit der Kettenlänge der Fettsäuren (1% für Stearinsäure bis 60% für Hexansäure) korrelierte. Je ungesättigter die Fettsäure war, desto besser war die Absorption. Die Höhe der Kalziumseifen im Kot stellte einen Index für die Bildung von

Kalziumseifen im Darm dar. Die Höhe der Bildung von Kalziumseifen und die Verringerung der Absorption von Kalzium korrelierten positiv.

GACS und BARLTROP (1977) stellten in ihrer Studie auch fest, dass sich bei einer Kalziumchloridzugabe keine Kalziumseifen bildeten und die Kalziumabsorption nicht verringert war (beim Zusatz von Tristearat, Trioleat und Tridekanoat). Bereits BOYD et al. (1932) stellten bei Ratten fest, dass durch eine Zugabe von Fett und Kalziumchlorid die Azidität der Ingesta zunahm und es dadurch zu einer Verbesserung der Kalziumabsorption und einer geringeren fäkalen Ausscheidung von Kalziumseifen kam.

KELLY et al. (2003) zeigten eine signifikante Erhöhung der Kalziumabsorption bei wachsenden Ratten unter einer Diät reich an Omega-3 Fettsäuren (Mischung aus Menhadenöl und Färberdistelöl), substituiert mit konjugierter Linolsäure. Sie verglichen diese Diät mit einer isoenergetischen Diät reich an Omega-3 Fettsäuren, ohne Substitution von konjugierter Linolsäure und mit zwei isoenergetischen Diäten reich an Omega-6 Fettsäuren (Sojaöl), mit und ohne Substitution von konjugierter Linolsäure. Die Autoren konnten keinen Einfluss aller untersuchten Diäten auf die Knochenmineralisierung feststellen. HOU et al. (1990) untersuchten den Einfluss einer Diät mit hohem Fettgehalt auf die Knochenmineralisierung bei Ratten. Sie stellten eine reduzierte Dicke der Kortikalis und eine geringere strukturelle Festigkeit des Oberschenkelhalses fest. LI et al. (1990) bestätigten schlechtere mechanische Eigenschaften der Tibiae und SALEM et al. (1992) und ZERNICKE et al. (1995) der Lendenwirbel von Ratten, die mit Hochfett-Diäten gefüttert wurden. LAC et al. (2008) stellten eine geringere Mineralisierung und eine geringere Dichte der Knochen bei Ratten unter Hochfett-Diäten fest. BIELOHUBY et al. (2010) fütterten wachsenden Ratten zwei verschiedene LC-Diäten mit hohem Fettgehalt, wobei bei beiden Diäten das Längenwachstum, die Mineralstoffdichte und die mechanischen Eigenschaften der Knochen reduziert war. Die Autoren stellten als Ursache eine gestörte Knochenbildung fest.

III. PUBLIKATION 1

Die folgende Publikation

'Effects of low carbohydrate diets on energy and nitrogen balance and body composition in rats depend on dietary protein-to-energy ratio'

wurde am 27. November 2013 von der Zeitschrift „Nutrition“ zur Veröffentlichung angenommen.

Article available online December 4th, 2013.

DOI: 10.1016/j.nut.2013.11.009.

Nutrition, 30 (7): 863-868.

Effects of low carbohydrate diets on energy and nitrogen balance and body composition in rats depend on dietary protein-to-energy ratio

Lena Frommelt ^a, Maximilian Bielohuby Ph.D. ^b, Dominik Menhofer ^b,
Barbara J. M. Stoehr ^b, Martin Bidlingmaier M.D. ^b, Ellen Kienzle Prof. ^{a,*}

^a Animal Nutrition, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

^b Endocrine Research Unit, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

Word count: 5113; Number of Figures: 1; Number of Tables: 7

key words:

low-carbohydrate high-fat diets; ketosis; nitrogen balance; body composition; rats

***Corresponding author: Prof. Ellen Kienzle**

mailing address: Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim

e-mail: kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

telephone: +49 (0) 89 / 2180 – 78701; fax: +49 (0) 89 / 2180 – 78702

Copyright © 2014, Elsevier Inc. All rights reserved.

Abstract

Objectives:

Truly ketogenic rodent diets are low in carbohydrates but also low in protein. The aim of this study was to differentiate effects of ketosis, low carbohydrate (LC) and/or low-protein intake on energy and nitrogen metabolism.

Methods:

We studied the nitrogen balance of rats fed LC diets with varying protein contents: LC diets consisted of 75/10, 65/20 and 55/30 percent of fat to protein (dry matter), respectively, and were iso-energetically pair-fed to a control (chow) diet to 12-wk-old male Wistar rats (n = 6 per diet).

Previous studies demonstrated only LC75/10 was truly ketogenic. Food, fecal, and urine samples, as well as carcasses were collected and analyzed for heat of combustion and nitrogen (Kjeldahl method). Blood samples were analyzed for plasma protein, albumin, and triacylglycerol.

Results:

All LC groups displayed less body weight gain, and the degree of reduction was inversely related to digestible crude protein intake (daily weight gain compared to chow: LC75/10: - 50%; LC55/30: - 20%). Nitrogen excretion by urine was related to digestible protein intake (chow: 0.23 ± 0.02 g nitrogen/d; LC75/10: 0.05 ± 0.01 g nitrogen/d). Renal energy excretion was closely associated with intake of digestible crude protein ($r = 0.697$) and renal nitrogen excretion ($r = 0.769$). Energy-to-nitrogen ratio in urine was nearly doubled with LC75/10 compared with all other groups. Total body protein was highest with chow and lowest with LC75/10. Rats fed with LC75/10 displayed features of protein deficiency (reduced growth and nitrogen balance, hypoproteinemia, depletion of body protein, and increased body and liver fat), whereas the effects with the non-ketogenic diets LC65/20 and LC55/30 were less pronounced.

Conclusion:

These results suggest that truly ketogenic LC diets in growing rats are LC diets that are also deficient in protein for growth.

Introduction

Ketosis induced by low carbohydrate (LC) diets can have beneficial effects on neurologic disorders such as epilepsy in children by modulating adenosine

triphosphate-dependent potassium channels in neurons ⁽¹⁾. It has been shown that ketogenic diets can not only be used for epilepsy treatment, but their neuroprotective role also may be beneficial for other neurologic diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis ⁽²⁾. Ketogenic diets can also enhance mitochondrial function and recently have been considered a clinical treatment option in the field of oncology. Additionally, ketogenic LC diets are used for weight loss in overweight individuals ^(3,4).

To evaluate benefits or adverse effects of ketogenic diets in animal experiments it is important to know and to differentiate the effects of ketosis per se and the effects of each of the nutrients contained in the experimental diets, e.g., fat, carbohydrates, or protein. It is important to know how to design a ketogenic LC diet for rats because this diet, in addition to being high in fat content, is low in both carbohydrate and protein content, both of which help to induce a state of ketosis in the rats. Therefore, LC diets with varying protein and fat content have been tested for their ability to induce ketosis in growing rats ⁽⁵⁾. It has been demonstrated that only LC diets with an extremely high fat content, but rather low protein were truly ketogenic in rats, presumably because LC diets with moderate to high protein content provided sufficient glucoplastic amino acids for gluconeogenesis to prevent ketosis.

It is difficult to differentiate between effects of the low protein intake or even a mild protein deficiency and effects of ketosis when using LC diets with very low protein content. This problem appears especially in experiments with growing rats because the requirement for protein is higher during times of growth rather than during maintenance. In this study, we tested LC diets with different protein contents in growing rats and a special LC diet with matched protein content to the control diet (LC55/30, to ensure that rats on this LC diet had the same protein intake as in the control diet). The aim of this study was to determine the effects that result from protein malnutrition and effects that result from ketosis. This findings help to receive more detailed information how to design and how to evaluate effects of ketogenic LC diets in rats.

The effect of low protein intake in LC diets may be enhanced by the need for amino acids for gluconeogenesis. It has been demonstrated that increasing the protein content in LC diets alleviates negative effects on growth and reproduction in various species ^(6,7). In the present study, we analyzed parameters such as nitrogen balance, renal energy excretion, and body composition to differentiate between the effects of low protein intake, LC intake, and ketosis in rats consuming the same LC diets with varying protein and fat content as previously studied to investigate their effect on induction of ketosis ⁽⁵⁾.

Materials and methods

Diets and animal husbandry

Four experimental diets were investigated. Composition of the diets is provided in *Table 1*. Semipurified diets were purchased from Kliba Nafag (Kliba Nafag, a business unit of PROVIMI KLIBA SA, Kaiseraugst, Switzerland). The control diet (chow) contained moderate amounts of carbohydrates and fat. Protein in the chow diet was according to requirements for growing rats⁽⁸⁾. Overall, the dietary composition of the chow diet was typical for standard rodent diets and followed the nutrient composition of the reference diet of the American Institute of Nutrition⁽⁹⁾.

Three LC diets with increasing percentages of fat (55 %, 65 %, and 75 % in dry matter (DM)) and decreasing percentages of protein (30 %, 20 %, and 10 % in DM, respectively), hereafter referred to as LC55/30, LC65/20, and LC75/10 were investigated. LC55/30 was matched to the chow diet with respect to the protein-to-metabolizable energy (ME) ratio (ME predicted by Atwater factors). The only protein source was sodium casein in all diets. The only fat source was beef tallow for all LC diets. Fat in the chow diet originated to 50 % from beef tallow and 50 % from soy bean oil. In the chow diet, the only carbohydrate source was starch.

For minerals, trace elements and vitamins, the ratio (based on a nutrient-to-energy ratio) was matched in the LC diets to the same ratio as in the chow diet, using ME estimated by Atwater factors as recommended for semipurified diets⁽¹⁰⁾. To ensure that lysine was not growth-limiting in the LC75/10 diet, a small amount was added (in g/kg DM: chow: 16; LC75/10: 8; LC65/20: 17; LC55/30: 25). The content of nutrients in DM is provided in *Table 1*.

Twenty-four male intact Wistar Unilever rats (Harlan Laboratories, six animals per trial, 12 wk old at start of feeding experimental diets) were used. All animals had free access to tap water and standard natural laboratory diet (Ssniff, Soest, Germany) for the first 10 d following delivery, to allow acclimatization to the new environment. Rats were housed in an open system in individual Makrolon type III cages at 21 ± 1.5 °C (relative humidity 55 ± 15 %, 100% fresh air) and maintained on a 12-h artificial light and 12-h dark cycle throughout the study. Before digestion trials, rats were adapted for at least 7 d to their respective diet. Food allowance was free choice for the chow diet. All other groups were pair-fed on an iso-energetic basis to the chow diet, with the estimated ME as described previously as a basis. The resulting DM intake is shown in *Table 2*. Food intake was measured daily. During the digestion trials, litter was removed from the cages and rats were kept on stable metal grids (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany). Feces were collected and weighed in the morning and evening for 5 to 7 d consecutively. Feces were stored immediately at -23 °C until analysis.

After 4 wk on the respective diets, rats were given access to food for 1 h after lights out and then fasted for 6 h (to standardize gastrointestinal filling in the three groups) before being sacrificed under an ultra-short isoflurane anesthesia. Rats were dissected and livers were excised, carefully freed from adherent tissues, and immediately frozen on dry ice until further analysis. The gut was emptied and then processed with the remaining body parts. Carcasses were dissected in small pieces and dried by lyophilization. The dried material was ground and frozen until analysis. All procedures were approved by the Upper Bavarian Government's ethical committee for animal experiments and followed the national and European Union laws for animal protection.

Analyses

Combustion heat of food (gross energy, GE), feces, urine, and carcasses was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA-Calorimeter C4000; IKA-Analysentechnik Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany). GE was determined three times in each sample of food, feces, and carcass and six times in urine. Coefficient of variation within analysis was calculated and if it exceeded 0.4 %, measurements were repeated. Crude nutrients were determined by the Weende method ⁽¹¹⁾. Starch was analyzed polarimetrically and sugar by the Luff-Schoorl method at the LUFA (Agrolab group/LUFA ITL, Kiel, Germany). LC diets and carcasses were pretreated with petrol ether to remove part of the fat before analysis of crude fat (diets and carcass) and minerals (only diets). Before analysis of the remaining petrol ether extract (crude fat), an acid digestion was carried out. For mineral analyses, a wet digestion was carried out as described previously ⁽¹²⁾. Calcium, sodium, and potassium were analyzed by flame photometry, phosphorous photometrically ⁽¹³⁾ and trace elements by atomic absorption spectrometry (AS 800 Autosampler, PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, USA). The results of this analysis are shown in *Table 1*.

Calculations

Apparent digestibility by the total fecal collection method was calculated as:

$$\text{Apparent digestibility} = ((\text{intake} - \text{fecal excretion}) / \text{intake}) \times 100$$

ME was estimated for pair feeding from the nutrient content on the label as:

$$\text{ME} = 16.7 \times \text{crude protein} + 37.7 \times \text{crude fat} + 16.7 \times \text{nitrogen free extract}$$

Digestible energy (DE) as experimentally determined was calculated as:

$$\text{DE} = \text{GE} \times \text{apparent digestibility of energy} / 100$$

The uniformity of nutrient digestibility was tested as previously described in principle⁽¹⁴⁾. Nutrient intake was plotted against apparently digested nutrient. If digestibility was reasonably uniform a significant positive correlation was calculated. The negative intercept represents endogenous losses and the slope of the regression equation multiplied by 100 represents the true digestibility.

Statistical analysis

Data are presented as mean values and SD. Non-parametric Spearman correlations, linear regressions, and statistical analysis were performed using the SigmaStat-Software (SigmaStat 3.0, 2003, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) or Microsoft Excel. Linear regressions were performed when statistics indicated that the data were distributed normally. For the statistical comparison between many groups one-way analysis of variance was performed. Means were compared by Holm-Sidak method (if normality test was passed and groups had the same size), Tukey test (if normality test was passed to compare groups with different sizes) or Dunn`s method (if normality test failed). P-values < 0.05 were considered significant.

Results

Intake of DE, energy, and protein

Mean intake of DE was similar but not exactly the same (*Table 3*) because on some days individual rats did not consume all the food offered, according to the pair-feeding plan. DE intake varied between 0.27 and 0.33 MJ/d during balance trials. Intake of digestible crude protein (dcp) varied between 0.73 g/d in group LC75/10, 1.69 g/d in group LC65/20, and 2.94 g/d in the chow and LC55/30 groups during balance trials. The intake of DM, DE and dcp throughout the entire experiment (*Tables 2 and 3*) mirrored the intake during balance trials.

Weight gain

Daily weight gain was not related to DE intake (*Table 3*). There was less body weight gain in all LC groups compared with the chow group. The degree of less body weight gain in the LC diets was inversely related to dcp intake (*Table 3*).

However, the same intake of dcp in the diet LC55/30 resulted in a lower growth rate during the entire experiment compared with the chow diet.

Nitrogen and energy metabolism

Nitrogen excretion by urine was related to digestible protein intake. It was highest in the chow and LC55/30 groups and extremely low in the LC75/10 group (*Table 4*). There were no significant differences in nitrogen retention expressed as a percentage of intake between the experimental groups (*Table 4*). Renal energy excretion was highest in the chow group and lowest in the LC75/10 group with the other two groups being in the middle (*Table 5*). If the ratio of energy in urine per g of nitrogen in urine was calculated, it was nearly doubled in the LC75/10 group compared with all other diet groups (*Table 5*).

Blood parameters

Total plasma protein was significantly lower in the LC75/10 group compared with all other groups (*Table 6*). There was no difference in albumin content in g/L (*Table 6*). Expressed as a percentage of total plasma protein, albumin was highest in the LC75/10 group, significant to the chow and LC55/30 groups (*Table 6*). There also was a slight increase in the relative percentage of albumin in the LC65/20 group, only significant to the LC55/30 group (*Table 6*). Plasma triacylglycerols were significantly higher in the groups LC75/10 and LC65/20 than in the chow and LC55/30 groups (*Table 6*).

Body analysis

The protein content of the whole body in percent DM at the end of the experiment decreased in groups LC75/10 and LC65/20. By contrast it increased in the chow and LC55/30 groups (*Table 7*). The amount of total body protein in g/animal was highest in the chow group and lowest in the LC75/10 group (*Fig. 1*). Fat content was lowest in the LC55/30 group and highest in the LC65/20 group (*Table 7*). Total body energy (heat of combustion) was significantly higher in the LC75/10 and LC65/20 groups than in the LC55/30 and chow groups (*Table 7*). Liver fat content was significantly higher in the LC75/10 group compared with the chow and other LC groups (*Table 7*).

Discussion

The aim of the present study was to differentiate between the effects of an LC diet per se and the effects of low protein intake with adequate energy intake in LC diets. Therefore, we used LC diets with decreasing protein and increasing fat content. The percentage of DE from protein decreased from 21 % to 15 % and 6 % in LC diets compared with 23 % in the chow diet. Six percent of DE from protein with adequate energy intake qualified for a protein-energy malnutrition as described previously ⁽¹⁵⁾.

The requirements for growing rats ⁽⁸⁾ recommend a minimal amount of 6 to 7.4 mg highly dcp per kJ GE for normal weight gain in growing rats. In the diets used in this study, the amounts were: chow, 10.4 mg/kJ GE; LC75/10, 2.9 mg/kJ GE; LC65/20, 6.1 mg/kJ GE; and LC55/30, 9.1 mg/kJ GE. The recommended amount of highly dcp with supplemented amino acids for growing rats is 166 g/kg diet ⁽⁸⁾. The diets used in this study contain chow, 209 mg/kg; LC75/10, 96 mg/kg; LC65/20, 198 mg/kg; and LC55/30, 280 mg/kg.

There are three variables to consider when discussing the dietary effects of the present study: LC diet, insufficient protein intake, and ketosis. The latter only occurred in the LC75/10 group as demonstrated in an earlier study ⁽⁵⁾.

DE intake was slightly lower in the LC75/10 and LC65/20 diets despite pair feeding because individual rats in these groups did not always consume all food offered. Reduced appetite is a well-known feature of protein-energy malnutrition in rats ⁽¹⁵⁾ but it could also be attributed to LC intake, ketosis, or a combination of the two ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Reduced growth as a consequence of protein deficiency has been discussed previously ⁽¹⁹⁾. The same is true for the growth-reducing effect of LC diets. This was previously described for chickens ⁽⁶⁾. In this study, growth reduction in LC diets was alleviated by high protein content but was not completely resolved. In a study of bitches on LC diets with moderate protein content, many puppies were lost ⁽⁷⁾. Puppies had low birth weights and low liver glycogen stores. LC, high-protein diets did not lead to increased loss of puppies, but birth weight and liver glycogen were lower than in controls. In the present study effects of LC diets were alleviated but not resolved by high protein content. Rats in the LC55/30 group gained more weight than rats in the other two LC groups. Reduced growth or performance on LC, high-protein diets are unlikely to be an effect of protein deficiency. It rather suggests a protein-independent LC diet effect that was previously ⁽²⁰⁾ attributed to growth hormone resistance.

Nitrogen balance was close to zero in the LC75/10 diet even though the rats were slowly growing. This is reflected in the protein and fat content of the body at the end of the study. The effect of LC on protein balance decreased with increasing protein content. There was no difference between the groups fed with LC55/30 and the chow group. The effect of LC diets on total body protein was alleviated by higher protein content but did not completely disappear when protein content was increased. Presumably, there is an association with reduced growth. The marked difference between the high-protein LC LC55/30 diet and the low protein LC diets points to a contribution of protein deficiency to this effect, especially to the LC75/10 group.

Lower values of total plasma protein could be interpreted as indicators of protein deficiency. The values were lower in the LC75/10 group; they were, however, within the reference range for rats ^(21, 22). The high percentage of albumin in this group in context to slightly lower plasma protein content suggests a lower level of other plasma proteins such as globulines. This finding invites speculation on protein or more likely

(glucoplastic) amino acid deficiencies such as alanine deficiency, which might impair antibody production ⁽²³⁾.

Another feature of protein-energy malnutrition is fat accumulation in the liver ^(15, 24-26), which was demonstrated for the LC75/10 group but not for the other LC groups in this study. Increased hepatic fatty acid oxidation in ketogenic diets has been shown in mice ⁽²⁷⁾. It has been demonstrated that hepatic triacylglycerol content significantly increases after 3 wk on a low-carbohydrate-high-fat (LCHF) ketogenic diet (versus a chow diet) ⁽²⁸⁾. In one study, choline was added to a ketogenic diet similar to the LC75/10 diet in protein and fat content. The addition of choline succeeded in reducing liver steatosis ⁽²⁹⁾. The choline content in the LC75/10 diet was very similar to that in the choline-supplemented diet ⁽²⁹⁾. This suggests that higher choline intake requires some cofactor to reduce liver steatosis in LC diets.

In the study ⁽²⁰⁾, LCHF diets in rats impaired central regulation of GH release and reduced hepatic insulin-like growth factor-I gene expression. This explains accumulation of visceral fat in rats eating LCHF diets. In this study, LC75/10 and LC65/20 groups showed significantly increased body fat content. The high fat content as well as the low protein content (in young, growing rats) and the LC content of LCHF diets mediate the growth hormone resistance ⁽²⁰⁾. Rats on the LCHF diets also showed increased triacylglycerol in serum ⁽²⁰⁾. The results of our study confirmed this finding. Plasma triacylglycerols were significantly increased in the LC75/10 and LC65/20 groups. In both studies, blood triacylglycerols rose with increasing amounts of fat in the diets.

Despite the high body fat content of the two groups with the highest fat content (LC75/10 and LC65/20), a remarkable feature of the LC55/30 group was the rather low body fat content. The point needs to be stressed in this context that LC55/30 was not a high-protein diet but rather matched the chow diet. Therefore, effects of high-protein diets such as increased satiety ⁽³⁰⁾ or increased heat increment ⁽³¹⁾ are unlikely to be responsible for this finding. The total DE intake over experimental time was the same in the LC55/30 group as in the chow group, thus excluding an effect of satiety. Similarly, in a parallel study there was no effect of an LC55/30 diet on heat production ⁽⁵⁾. In this study, however, rats did not exhibit lower body fat content when fed the LC55/30 diet. The reason for the effect in our study remains unclear.

In a parallel study, with the same diets, there was no decrease of body fat content in the LC55/30 group ⁽⁵⁾. Also in our study, the group with the next highest protein level - LC65/20 - did not show a tendency to lower body fat content compared with the other groups with less protein. This suggests that protein level does not have a dose-response effect on body fat content.

The scope of the present study, however, focused on the differentiation of effects of LC diets and protein deficiency or protein-energy malnutrition. The data on nitrogen balance clearly show that the diets LC75/10 and LC65/20 supply insufficient protein for normal growth. In a parallel study, it was demonstrated that only the LC75/10 diet was

truly ketogenic⁽⁵⁾. This is in agreement with our finding on renal energy excretion per g of nitrogen, which was nearly doubled in the LC75/10 group compared with all other groups, suggesting the excretion of non-nitrogen compounds with a high-energy content, presumably ketone bodies.

For the ketogenic diet LC75/10, the data of the present investigation (i.e. low renal nitrogen excretion, low nitrogen retention) suggest a protein deficiency. This suggests that it is not possible to have a truly ketogenic diet that is not protein deficient for growing rats. In fattening pigs and chickens, it is a well-known phenomenon that the low protein content of the diet can be compensated by an increased content of limiting amino acids, mainly lysine and methionine⁽³²⁾. In the present investigation, the source of protein (casein) was already of extremely high quality. In addition, the lysine content per g protein was highest in the LC75/10 diet due to the addition of a small amount of lysine. If lysine was not limiting, it is likely that the limiting amino acid was glucoplastic. Methionine, threonine or arginine are possible candidates. In our study, the methionine requirements for growth⁽⁸⁾ are not met in diets LC75/10 and LC65/20. A previous study added methionine to a ketogenic diet for rats that was comparable in protein and fat content to our LC75/10 diet. This alleviated the effects on growth without compromising ketosis⁽²⁹⁾.

In summary, a LC ketogenic diet for growing rats is inevitably a protein-deficient diet. This can possibly be alleviated by the addition of limiting glucoplastic amino acids. Presumably the same is true for all species with a high potential for gluconeogenesis from amino acids.

Conclusion

The results of the present study confirm that the effects of LC diets on all parameters measured depend on the protein content of LC diets. They were much more marked in low-protein LC diets. There is, however, a residual effect of LC diets on growth and metabolism that is not the result of protein deficiency. The only truly ketogenic diet - LC 75/10 - was protein-deficient for growth. It is questionable whether it is possible to design semipurified ketogenic diets that are not protein-deficient for growing rats. To our knowledge, it remains unknown whether this is also true for human nutrition.

References

- 1 Ma W, Berg J, Yellen G. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. *J Neurosci* 2007;27: 3618-25.
- 2 Stafstrom CE, Rho JM. The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Front Pharmacol* 2012;3: 59.
- 3 Kasper H, Thiel H, Ehl M. Response of body weight to a low carbohydrate, high fat diet in normal and obese subjects. *Am J Clin Nutr* 1973;26: 197-204.
- 4 Yancy WS, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia. *Ann Intern Med* 2004;140: 769-77.
- 5 Bielohuby M, Menhofer D, Kirchner H, Stoehr BJ, Muller TD, Stock P, et al. Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300: E65-76.
- 6 Renner R. Factors affecting the utilization of "carbohydrate-free" diets by the chick. I. Level of protein. *J Nutr* 1964;84: 322-6.
- 7 Kienzle E, Meyer H, Lohrie H. Influence of carbohydrate-free rations with various protein/energy relationships on fetal development, viability of newborn puppies and milk consumption. *Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung (Adv Animal Physiol Animal Nutr)* 1985;16: 78–99.
- 8 National Research Council. Nutrient requirements of laboratory animals. National Academy of Sciences. Washington D.C.: National Research Council; 1995.
- 9 Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal Nutr* 1993;123: 1939-51.
- 10 Bielohuby M, Bodendorf K, Brandstetter H, Bidlingmaier M, Kienzle E. Predicting metabolisable energy in commercial rat diets: physiological fuel values may be misleading. *Br J Nutr.* 2010;103: 1525-33.
- 11 Naumann C, Bassler R. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 3rd ed. Darmstadt: VDLUFA-Verlag; 1993.
- 12 Kienzle E, Kopsch G, Koelle P, Clauss M. Chemical composition of turtles and tortoises. *J Nutr* 2006;136: 2053s-4s.
- 13 Gericke S, Kurmies B. Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius J Anal Chem* 1952;137: 15-22.
- 14 Lucas HL. Relations between digestibility and composition of feeds and foods: Raleigh: North Carolina State College; 1961.
- 15 Kirsch RE, Brock JF, Saunders SJ. Experimental protein-calorie malnutrition. *Am J Clin Nutr* 1968;21: 820-6.
- 16 Johnstone AM, Horgan GW, Murison SD, Bremner DM, Lobley GE. Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *Am J Clin Nutr* 2008;87: 44-55.

- 17 Ríos VG. Complications of treatment of epilepsy by a ketogenic diet. *Rev Neurol* 2001;33: 909-15.
- 18 McClernon FJ, Yancy WS, Eberstein JA, Atkins RC, Westman EC. The effects of a low-carbohydrate ketogenic diet and a low-fat diet on mood, hunger, and other self-reported symptoms. *Obesity* 2007;15: 182-7.
- 19 Crews, EL III, Fuge KW, Oscai LB, Holloszy JO, Shank RE. Weight, food intake, and body composition: effects of exercise and of protein deficiency. *Am J Physiol* 1969;216: 359-63.
- 20 Bielohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJ, Stock P, Menhofer D, Ebensing S, et al. Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology* 2011;152: 1948-60.
- 21 Zur B. Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Dissertation. Düsseldorf: Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität; 2005.
- 22 Sharp PE, Villano JS. The laboratory rat. New York: Taylor & Francis Group; 2012.
- 23 Li P, Yin YL, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr* 2007;98: 237-52.
- 24 Webster GT. Cirrhosis of the liver among rats receiving diets poor in protein and rich in fat. *J Clin Invest* 1942;21: 385-92.
- 25 Kosterlitz HW. The effects of changes in dietary protein on the composition and structure of the liver cell. *J Physiol* 1947;106: 194-210.
- 26 Williams JN, Hurlbaeus AJ. Response of the liver to prolonged protein depletion V. neutral glycerides and cholesterol; production of fatty livers by certain amino acids fed in a protein-free ration. *J. Nutr* 1965;85: 73-81.
- 27 Kennedy AR, Pissios P, Out H, Roberson R, Xue B, Asakura K, et al. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 292: E1724–39.
- 28 Garbow JR, Doherty JM, Schugar RC, Travers S, Weber ML, Wentz AE, et al. Hepatic steatosis, inflammation, and ER stress in mice maintained long term on a very low-carbohydrate ketogenic diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300: G956-67.
- 29 Pissios P, Hong S, Kennedy AR, Prasad D, Liu F-F, Maratos-Flier E. Methionine and choline regulate the metabolic phenotype of a ketogenic diet. *Mol Metab* 2013;2: 306-13.
- 30 Hill AJ, Blundell JE. Macronutrients and satiety: the effects of a high-protein or high-carbohydrate meal on subjective motivation to eat and food preferences. *Nutr Behav* 1986;3: 133-44.
- 31 Westerterp KR, Wilson SA, Rolland V. Diet induced thermogenesis measured over 24 h in a respiration chamber: effect of diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23: 287-92.
- 32 Kirchgessner M. Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis: DLG-Verlag; 2004.

Table 1
Feed composition in dry matter

Diet		Chow	LC 75/10	LC 65/20	LC 55/30	
Energy (MJ/kg)	GE	20.1	33.6	32.1	30.9	
	DE ¹	18.4	28.8	27.4	26.2	
	ME ²	17.5	28.4	26.5	25.0	
Weende analyses (%)	Fat	5.2	76.1	66.0	56.9	
	Protein	20.9	9.6	19.7	28.0	
	Fiber	4.8	6	6.3	6.7	
	Ash	3	5.6	5.2	4.9	
Carbohydrates (%)	Starch	23.8				
	Sugar	37.3				
Minerals (g/kg)	Ca	5.4	9.6	9.1	8.5	
	P	2.7	5.8	5.3	5.2	
	Na	2.1	4.3	3.8	3.6	
	K	4.1	7.4	6.5	6.2	
Trace elements (mg/kg)	Fe	107.7	162.8	163.9	187.4	
	Zn	60.7	94.6	97	91	
	Cu	7.8	22.5	13	10.8	
	I ³	0.8	1.4	1.4	1.3	
	Mn ³	16.7	30.8	30.2	28.8	
	Se ³	0.3	0.6	0.5	0.5	
Vitamins ³	(IE/kg)	Vit. A	4300	8000	7600	6800
		Vit. D	1075	2000	1900	1700
		Vit. E	113	200	190	170
		(mg/kg)	Vit. K	4.6	8.6	8.2
	Vit. B ₁		6.5	12	11.4	10.2
	Vit. B ₂		6.9	12.8	12.2	10.9
	Vit. B ₆		7.5	14	13.3	11.9
	Vit. B ₁₂		0.05	0.1	0.1	0.09
	Niacin		35.5	66.1	62.8	56.2
	Pantothenic acid		17.3	32.2	30.6	27.4
	Folic acid		2.6	4.8	4.5	4
	Biotin		0.2	0.4	0.4	0.3
	Choline		1215	1975	2000	2020

DE, digestible energy; GE, gross energy; LC, low carbohydrate; ME, metabolizable energy

¹⁾ Experimentally determined.

²⁾ DE-5.2 kJ per g digestible protein (digestible protein was experimentally determined: (protein content of feed (g/kg) x apparent digestibility of protein (%) / 100) x 5.2 / 1000).

³⁾ As labeled by manufacturer.

Table 2

Body weight and feed intake during balance trial and collection period*

Diet	n	BW (g)	DM intake (g/kg BW/d)
Chow	6	393.3 ± 15.4 ^a	41.4 ± 1.6 ^a
LC75/10	6	363.4 ± 12.8 ^b	26.3 ± 1.2 ^b
LC65/20	6	379.2 ± 15.5 ^{ab}	26.9 ± 1.0 ^b
LC55/30	6	395.6 ± 11.1 ^{ac}	32.2 ± 1.6 ^c

BW, body weight; DM, dry matter; LC, low carbohydrate

*Means not sharing a superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3

Intake of DE¹⁾ and dcp and daily weight gain during balance trials and entire feeding period²⁾

Diet	n	Intake during balance trials		Intake during entire feeding period			Daily weight gain (g/d)	
		DE (MJ/d)	Dcp (g/d)	DE (MJ/d)	DE (MJ/lifetime)	Dcp (g/d)	During balance trials	During entire feeding period
Chow	6	0.30 ± 0.02 ^a	2.94 ± 0.20 ^a	0.30 ± 0.02 ^a	8.96 ± 0.03	3.37 ± 0.11 ^a	1.10 ± 0.52 ^{ab}	1.76 ± 0.58 ^a
LC75/10	6	0.27 ± 0.01 ^b	0.73 ± 0.03 ^b	0.27 ± 0.01 ^b	7.81 ± 0.11	0.74 ± 0.02 ^b	0.46 ± 1.04 ^a	0.79 ± 0.35 ^b
LC65/20	6	0.28 ± 0.00 ^b	1.69 ± 0.05 ^b	0.28 ± 0.00 ^b	6.62 ± 3.24	1.72 ± 0.05 ^c	0.44 ± 0.51 ^a	1.33 ± 0.22 ^a
LC55/30	6	0.33 ± 0.01 ^c	2.94 ± 0.18 ^a	0.33 ± 0.01 ^c	9.59 ± 0.10	2.95 ± 0.13 ^d	1.64 ± 0.74 ^b	1.36 ± 0.38 ^a

Dcp, digestible crude protein; DE, digestible energy

¹⁾ Experimentally determined DE.

²⁾ Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Table 4

Nitrogen balance*

Diet	n	Nitrogen intake (g/d)	Nitrogen excretion feces (g/d)	Nitrogen excretion urine (g/d)	Retained nitrogen (g/d)	Retained nitrogen (in % nitrogen intake)
Chow	6	0.54 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.02 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	43.22 ± 4.14
LC75/10	6	0.15 ± 0.00 ^b	0.03 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	47.43 ± 7.09
LC65/20	6	0.32 ± 0.00 ^c	0.05 ± 0.01 ^b	0.14 ± 0.02 ^c	0.14 ± 0.02 ^c	42.50 ± 6.55
LC55/30	6	0.57 ± 0.02 ^d	0.10 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.02 ^a	45.41 ± 2.88

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05)

Table 5

Renal excretion of energy and energy-to-nitrogen ratio in urine (g/d)*

Diet	n	GE urine (kJ/d)	GE urine/dcp (kJ/g)	GE urine/nitrogen excretion urine (kJ/g)
Chow	6	4.17 ± 0.64 ^a	1.42 ± 0.24 ^a	17.75 ± 2.23 ^a
LC75/10	6	1.39 ± 0.50 ^b	1.90 ± 0.71 ^a	30.10 ± 12.24 ^b
LC65/20	5	2.36 ± 0.42 ^b	1.40 ± 0.23 ^a	17.29 ± 2.29 ^a
LC55/30	4	2.95 ± 0.52 ^a	1.01 ± 0.20 ^b	13.72 ± 2.60 ^a

dcp, digestible crude protein; GE, gross energy

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Table 6

Blood parameters*

Diet	n	Total plasma protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Albumin (%)	Plasma triacylglycerol (mg/dL)
Chow	6	5.8 ± 0.3 ^a	3.8 ± 0.2	66.5 ± 1.3 ^{ac}	91 ± 34 ^a
LC75/10	6	5.3 ± 0.2 ^b	3.8 ± 0.3	71.4 ± 2.2 ^b	168 ± 44 ^b
LC65/20	6	5.6 ± 0.1 ^a	3.8 ± 0.2	68.5 ± 2.2 ^{ab}	162 ± 33 ^b
LC55/30	6	5.7 ± 0.2 ^a	3.7 ± 0.4	64.1 ± 5.3 ^c	93 ± 12 ^a

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Table 7

Body composition (in DM) and liver analysis (in DM)*

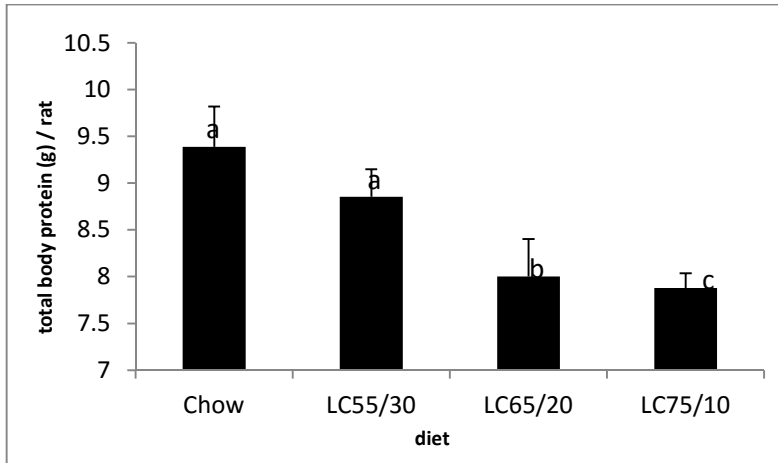
Diet	n	Content in carcass			Content in liver
		GE (MJ/kg)	Fat (%)	Protein (%)	Fat (%)
Chow	6	23.79 ± 0.43 ^a	33.25 ± 2.61 ^a	53.67 ± 2.79 ^a	19.15 ± 3.66 ^a
LC75/10	6	25.05 ± 0.45 ^b	37.90 ± 1.55 ^b	48.38 ± 1.51 ^b	26.06 ± 6.03 ^b
LC65/20	6	24.94 ± 1.02 ^b	39.09 ± 3.41 ^b	49.13 ± 3.12 ^b	16.70 ± 3.05 ^a
LC55/30	6	23.42 ± 0.73 ^a	28.92 ± 3.81 ^c	57.57 ± 3.77 ^c	14.75 ± 1.65 ^a

DM, dry matter; GE, gross energy

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Fig. 1

Protein content body (g/rat). Diet (x); protein content body (y; g/rat); means not sharing a symbol (^{a,b,c}) are significantly different ($P < 0.05$).



Erratum: protein content body (y; g/rat *100)

IV. PUBLIKATION 2

Die folgende Publikation

'Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats'

wurde am 12. November 2013 von der Zeitschrift „Nutrition“ zur Veröffentlichung angenommen.

Article available online December 2th, 2013.

DOI: 10.1016/j.nut.2013.11.017.

Nutrition, 30 (7): 869-875.

Effects of low-carbohydrate, high-fat diets on apparent digestibility of minerals and trace elements in rats

Lena Frommelt¹, Maximilian Bielohuby², Barbara J. M. Stoehr²,

Dominik Menhofer², Martin Bidlingmaier², Ellen Kienzle^{1,*}

¹ *Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany*

² *Endocrine Research Unit, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany*

Word count: 5183; Number of Figures: 2; Number of Tables: 5

key words: low-carbohydrate, high-fat diets; apparent digestibility; minerals; trace elements; rats

***Corresponding author: Prof. Ellen Kienzle**

mailing address: Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik, Schönleutnerstr. 8, 85764 Oberschleißheim

e-mail: kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

telephone: +49 (0) 89 / 2180 – 78701

fax: +49 (0) 89 / 2180 – 78702

Copyright © 2014, Elsevier Inc. All rights reserved.

Abstract

Objective:

Ketogenic low-carbohydrate, high-fat (LCHF) diets reduce growth and bone mineral density in children with epilepsy and in rats. Part of this effect might be due to a reduced availability of calcium in high-fat diets. The aim of this study was to determine mineral digestibility by total collection method in LCHF diets compared with a chow diet and a standard high-fat diet (HFD, high in fat and carbohydrates).

Methods:

Twelve-wk-old male Wistar rats were pair-fed isoenergetic amounts of either six different LCHF diets based on tallow and casein (crude fat 75% - 50%, crude protein 10% - 35%), with chow or with a HFD diet. Mineral-to-energy ratio was matched in all diets. Circulating parathyroid hormone was measured by immunoassay.

Results:

The apparent digestibility of calcium was reduced in all HFDs (high-fat diets, LCHF diets and the HFD diet) by at least 30% compared with the chow diet ($P < 0.001$). Fecal calcium excretion correlated positively with fecal fat excretion, presumably because of formation of calcium soaps. Apparent digestibility of phosphorous was higher in all HFDs. This resulted in a decrease of the ratio of apparently digested calcium to apparently digested phosphorous in all HFDs below a ratio of 1:1. Plasma parathyroid hormone was not affected by any diet.

Conclusion:

The alteration of apparent calcium and phosphorus digestibility may affect the impact of HFDs on bone metabolism.

Introduction

Low-carbohydrate, high-fat (LCHF) diets are used for various purposes, predominantly as weight-reducing diets in overweight individuals^[1,2] and are popularly known as "Atkins"-style diets^[3]. LCHF diets may be ketogenic, and are therefore used as part of treatment for reducing seizures in children with epilepsy^[4-6]. Children eating such diets show reduced growth^[7,8] and lower bone mineral density (BMD)^[9,10]. In previous experiments, it has been shown that rats fed LCHF diets displayed reduced longitudinal growth and lower BMD as a result of impaired bone formation^[11]. Other studies demonstrated similar effects of high-fat diets (HFDs) containing sucrose^[12] or inducing obesity^[13]. It is established that fat can reduce the absorption of calcium^[14-16].

This result repeatedly has been confirmed in several species: Humans ^[17], rats ^[18], swine ^[19], and steers ^[20] and is presumed to result from the formation of calcium soaps, and thus is an effect specific for calcium.

In the present study, we aimed to investigate whether LCHF diets also affect the absorption of major minerals, especially calcium and phosphorous. Additionally, we looked at fecal excretion of trace elements. Knowledge of mineral absorption when consuming LCHF diets is of utmost importance on the one hand from a methodological point of view (e.g., composition of experimental diets in feeding trials), and on the other hand, may provide the basis for further studies that could investigate potential benefits of supplementing minerals to LCHF diets.

To differentiate between specific effects of HFDs lacking carbohydrates (LCHF diets) and HFDs including carbohydrates, a standard high-fat diet (HFD, high in fat and carbohydrates) was included in this study. LCHF diets are not necessarily ketogenic ^[21]. The potential to induce ketosis depends on very high fat, but rather low amounts of protein. To differentiate between the effects of the high fat intake per se and potential effects of ketosis, six different LCHF diets varying in their amounts of fat and protein (closely staggered in 5% steps) were investigated. According to a parallel study ^[21], only one of these diets was truly ketogenic.

Material and methods

Diets and animal husbandry

Eight diets were investigated. The macronutrient composition of diets is shown in *Table 1*. Semipurified diets were provided by Kliba Nafag (Kliba Nafag, business unit of PROVIMI KLIBA SA, Kaiseraugst, Switzerland). The control diet (chow) contained moderate amounts of carbohydrates (content of N-free extracts is shown in *Table 1*) and moderate amounts of fat. Protein in the chow diet was according to previously determined requirements ^[22]. Six LCHF diets with increasing percentages of protein from 10% to 35% in dry matter (DM) and decreasing percentages of fat from 75% to 50% in DM (LCHF 75/10 to LCHF 50/35) were compared with a HFD diet (37% fat in DM). The only protein source was sodium casein in all diets. The only carbohydrate source (chow and HFD diet) was starch. For technical reasons (i.e., conformation of fat) the only fat source was beef tallow for all HFDs. Fat in the chow diet, which was not custom made for the experiment, originated to 50% beef tallow and to 50% from soy bean oil.

For minerals, the nutrient-to-energy ratio was matched in all experimental diets to the same ratio as in the chow diet, using metabolizable energy (ME) estimated by Atwater factors (for the projected nutrient content) as recommended previously for purified

diets ^[23]. The same was done for trace elements and vitamins. When analyzed, however, there was a slight deviation for trace element-to-energy ratio in the HFD diet.

The trace element requirements ^[22] were met or exceeded in all diets. The content of micronutrients in DM is given in *Table 1*.

Forty-eight male intact Wistar Unilever rats (Harlan, 6 animals per trial, 12 wk at start of feeding experimental diet) were used. All animals had free access to water and standard natural laboratory diet (Ssniff, Soest, Germany) for the first 10 d following delivery, to allow acclimatization to the new environment. After acclimatization, the rats were weighed and distributed according to weight to the feeding groups. Rats were housed in an open system in individual Makrolon type III cages at 22 ± 2 °C (relative humidity 55 ± 10 %, 100% fresh air) and maintained on a 12-h artificial light and 12-h dark cycle throughout the study.

Before the digestion trials, rats were adapted for at least 7 d (to a maximum of 3 wk) to their respective diet. Food allowance was free choice for the chow diet. All other groups were offered the same amount of ME (estimated as described later). The resulting DM and energy intake is given in *Table 2*. Slight differences are due to variations between estimated and determined ME. Food intake was measured daily. During the digestion trials, litter was removed from the cages and rats were kept on stable metal grids (Tecniplast, Deutschland GmbH, Hohenpeissenberg, Germany). Feces were collected and weighed in the morning and evening for 5 to 7 d consecutively. Feces were stored immediately at -23 °C until analysis. Urine was also collected from the floor below the grid. After 4 wk on the respective diets, rats were given access to food for 1 h after lights out and then fasted for 6 h (to standardize gastrointestinal filling in the three groups) before sacrifice under isoflurane anesthesia. Truncal blood samples were taken and allowed to clot for 25 min. Blood samples were then centrifuged (3000 g for 10 min) and the obtained serum samples were stored at -80°C until analysis. All procedures were approved by the Upper Bavarian government's ethical committee for animal experiments.

Analyses

Combustion heat of food (gross energy, GE) and feces was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA-Calorimeter C4000; IKA-Analysentechnik Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen, Germany). GE was determined three times in each sample of food and feces. Coefficient of variation within analysis was calculated and if it exceeded 0.4%, measurements were repeated. Crude nutrients were determined by the Weende method ^[24]. Starch was analyzed polarimetrically and sugar by Luff-Schoorl by LUF A Kiel (Agrolab group/LUF A ITL, Kiel, Germany). HFDs were pretreated with petrol ether to remove part of the fat before analysis of crude fat and minerals. Before analysis of the remaining petrol ether extract (crude fat), an acid digestion was carried

out. For mineral analyses, a wet digestion was carried out as described previously ^[25]. Calcium, sodium, and potassium were analyzed by flame photometry, phosphorus photometrically ^[26] and trace elements by atomic absorption spectrometry (AS 800 Autosampler, PerkinElmer Instruments, Waltham, MA, USA). In the groups chow, LCHF 75/10, LCHF 65/20, and LCHF 55/30 urine pH was measured with an electrical pH-meter immediately after collection. Serum parathyroid hormone (rat intact PTH, Immotopics International, San Clemente, California, USA) was measured with commercially available kits as per manufacturer's instructions.

Calculations

Nitrogen free extract (NfE) was calculated as follows:

$$\text{NfE} = \text{DM} - \text{crude ash} - \text{crude protein} - \text{crude fat} - \text{crude fiber (all nutrients in \% wet weight)}$$

Apparent digestibility by the total fecal collection method was calculated as follows:

$$\text{Apparent digestibility} = ((\text{intake} - \text{fecal excretion}) / \text{intake}) \times 100$$

ME was estimated for pair feeding from the nutrient content on the label as follows:

$$\text{ME} = 16.7 * \text{crude protein} + 37.7 * \text{crude fat} + 16.7 * \text{NfE}$$

Digestible energy (DE) as experimentally determined was calculated as follows:

$$\text{DE} = \text{GE} * \text{apparent digestibility of energy} / 100$$

ME based on experimentally determined DE was estimated by subtracting 5.2 kJ/g digestible crude protein in the feed from DE in the feed for renal energy losses.

The uniformity of nutrient digestibility was tested as previously described ^[27]. Nutrient intake was plotted against apparently digested nutrient. If digestibility is reasonably uniform a significant positive correlation was calculated. The negative intercept represents endogenous losses and the slope of the regression equation multiplied by 100 with the true digestibility. In the case of a low digestibility this test was modified as follows: The intake was plotted against fecal excretion of the nutrient. Then the intercept represents endogenous losses and the slope of the regression equation the percentage coefficient of undigested nutrient. True digestibility is calculated by multiplying the slope of the regression equation by 100 and then subtracting it from 100 ^[28].

Statistical analysis

Data are presented as mean and SD. Linear regressions were performed for normally distributed variables and Spearman correlations were performed when data were not normally distributed. Linear regressions and statistical analysis were performed using the SigmaStat-Software (SigmaStat 3.0, 2003, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA) or Microsoft Excel. For the statistical comparison between many groups, one-way analysis of variance was carried out. Means were compared by Holm-Sidak method (if normality test was passed and groups had the same size), Tukey test (if normality test was passed to compare groups with different sizes) or Dunn's method (if normality test failed). P-values <0.05 were considered significant.

Results

Body weight (BW) at the end of the digestion trial was lowest in rats fed with the LCHF 75/10 diet (*Table 2*). The same was true for weight gain (*Table 2*). DM and ME intake is also presented in *Table 2*.

All HFDs had a lower apparent DM digestibility than the chow diet. The lowest values were observed for the diet with the highest fat content (LCHF 75/10). Apparent fat digestibility ranged between 83.1 % and 89.7 % (*Table 2*). When plotting the intake of crude fat (x ; g/d) against the apparently digested crude fat (y ; g/d), a very strict correlation was found ($y = 0.896x - 0.095$; $r = 0.996$; $n = 48$; $P < 0.001$; standard error of the estimate (SEE) = 0.113). The regression coefficient indicated a true digestibility of nearly 90 %. Apparent crude protein digestibility was lowest with the LCHF 75/10 diet, which also had the lowest protein content. Protein intake (x ; g/d) was strictly correlated with apparently digested protein (y ; g/d) ($y = 0.8638x - 0.0501$; $r = 0.9899$; $n = 48$; $P < 0.001$; SEE = 0.096). The regression coefficient suggested a true protein digestibility of 88 %. Apparent energy digestibility was highest in the chow diet and significantly lower in the LCHF diets and the HFD diet (*Table 2*). Differences between the various HFDs were much smaller, although statistically significant in some cases (*Table 2*).

The apparent digestibility of calcium was significantly reduced in all HFDs compared with the chow diet (*Table 3*). Fecal calcium excretion (*Table 3*) correlated with calcium intake ($r = 0.68$) (*Fig. 1*) but also with fecal fat excretion ($r = 0.68$) (*Fig. 2*). When a multiple correlation was calculated between calcium intake and fecal fat excretion as the independent and fecal calcium excretion as the dependant variable, the coefficient of correlation amounted to 0.92 ($n = 48$). The regression equation was: Fecal calcium excretion (g/d) = $0.0041 + 0.688 \cdot \text{calcium intake} + 0.028 \cdot \text{fecal fat excretion}$ (SE = 0.0057). For both independent variables P was < 0.001, and there was no significant correlation between them. Renal excretion of calcium was rather low (*Table 3*), ranging between 0.75 and 2.4 mg/kg BW daily. There was no systematic effect of the type of

diet. Calcium balance was positive in all groups. The chow group was significantly higher than all other groups (*Table 2*).

Apparent digestibility of phosphorous was higher in all HFDs, especially in the LCHF diets (*Table 3*). Fecal phosphorus excretion was lower in the HFDs (*Table 3*). The decrease in apparently digested calcium and parallel increase in apparently digested phosphorous resulted in a decrease of the ratio of apparently digested calcium to apparently digested phosphorous in HFDs below a ratio of 1:1 (chow: 1.5 ± 0.2 ; HFD: 0.7 ± 0.1 ; LCHF diets between 0.1 ± 0.1 and 0.4 ± 0.1). Renal excretion of phosphorous increased in HFDs (i.e., with increased apparently digested phosphorous). Urine pH was neutral in the chow group (7.2 ± 0.3) and increasing acid with a rising percentage of fat in the LCHF diets (55/30: 6.2 ± 0.0 ; 65/20: 6.0 ± 0.1 ; 75/10: 5.9 ± 0.1).

Apparent digestibility of sodium and potassium was not significantly affected by the different diets and ranged from 80 % to 90 %. When all HFDs were treated as one group and compared with the chow group, the apparent digestibility of sodium (chow: $88.8 \pm 3.1\%$; HFDs: $83.6 \pm 4.0\%$) and potassium (chow: $90.7 \pm 3.5\%$; HFDs: $85.8 \pm 4.2\%$) in the HFDs was significantly lower than in the chow diet.

Fecal excretion of trace elements mainly reflected intake. Therefore, apparent digestibility is not presented but rather daily intake and fecal excretion of trace elements in mg/kg BW (*Table 4*). There was no systematic effect of LCHF diets. In the HFD diet, the lower excretion reflected the lower intake for all three elements.

There was no significant effect of diet on the serum PTH values of the rats at the end of the trial at the age of 16 wk (*Table 5*).

Discussion

In the present study, apparent digestibility of calcium was considerably reduced in LCHF and HFD diets, suggesting a lower availability of calcium in these HFDs. This is in agreement with literature data ^[15,29].

In the present study, there was a strict correlation between fecal fat and fecal calcium excretion, which is presumably due to the formation of calcium soaps (i.e., water-insoluble calcium salts of fatty acids). In a previous study, calcium absorption was less impaired ^[11]. As previously described ^[23], the apparent digestibility of fat was higher in the diet used in these experiments ^[11] when compared with the present study, presumably because of a higher degree of unsaturation of the fat in the previous study than in the present investigation. This could have a double effect on calcium absorption as 1) there is less fecal fat excretion because of higher digestibility and 2) soaps of unsaturated fatty acids do not impair calcium absorption to the same extent as soaps of saturated fatty acids ^[18].

In the present study, the apparently digested calcium in the diets expressed as mg/MJ ME was decreased in all HFDs. It amounted to 98 mg/MJ in the chow diet. This value is in agreement with National Research Council recommendations^[22] where a diet for growing rats with an ME content of 16 to 17 kJ ME/g is listed with a calcium content of 5 g/kg diet (requirements are expressed on an as-fed basis for diets containing 10% moisture). This would be a calcium/ME ratio of about 300 mg calcium/MJ ME. The apparent calcium digestibility in the chow diet amounted to 31.9 %. The content of apparently digestible calcium of a chow diet according to previous recommendations would then be 96 mg apparently digestible calcium/MJ ME^[22]. In all HFDs the ratio of apparently digested calcium to ME was below this value (78 mg/MJ in the HFD diet and 13-63 mg/MJ in LCHF diets). In other words, these diets were marginal in apparently digestible calcium. Calcium balance was positive in all groups, as expected in growing animals. The lower calcium balance in all HFDs is likely a result of the lower calcium digestibility.

Fecal calcium excretion is an important determinant for fecal phosphorus excretion and thus apparent phosphorous digestibility^[30]. Presumably, this effect is based on the production of insoluble calcium-phosphorous complexes. The calcium ions bound in calcium soaps are unlikely to bind to phosphate ions, and therefore they are unlikely to interact with phosphate absorption. This would explain a better availability of phosphorous in the HFDs, which in turn would explain higher renal phosphorous excretion.

In animals eating a diet with a marginal content of available calcium and a high content of available phosphorus, one would expect an increase of plasma PTH. This, however, did not occur in the present study as well as in a previous study with other LCHF diets, although in contrast to the present investigation the diets of the previous study had a lower mineral-to-energy ratio than the controls^[11]. The reason is unclear. It may be that at the age of 16 wk at the end of the experiment in nearly adult rats a stronger dysbalance between calcium and phosphorus and/or lower calcium intakes would be needed to affect circulating PTH. It is also possible that other effects such as growth hormone resistance^[31] may interfere with PTH.

The different apparent digestibility of calcium and phosphorous may even contribute to the increasingly acidifying effects of the LCHF diets with increasing fat and decreasing protein content. Ketosis would explain metabolic acidosis and thus acid urine. Only diet LCHF 75/10 was truly ketogenic^[21], therefore ketosis can only explain acid urine in this diet but not in the other two LCHF diets. Calcium is considered to be an “alkaline” and phosphorus an “acid” diet component^[32].

A decreased absorption of the “alkaline” calcium and an increased absorption of the “acid” phosphate might well explain the acidifying effect.

Apparent digestibility of sodium and potassium was lower in the HFDs. Because of the low digestibility of beef tallow, the DM digestibility of all HFDs was also lower than the

DM digestibility of the chow diet. This resulted in larger amounts of fresh feces and fecal water excretion. In dogs and cats, it was demonstrated that the amount of fresh feces is an important determinant of fecal sodium excretion and that the fecal water excretion is an important determinant of fecal potassium excretion^[33, 34]. In the present study, the amount of fresh feces was correlated with fecal sodium excretion ($y = 3.4912x - 9.5952$; $r = 0.6425$) and the fecal water excretion was correlated with fecal potassium excretion ($y = 9.4742x - 6.1673$; $r = 0.4464$). Therefore, it is not likely that the reduction of apparent digestibility of sodium and potassium in the HFDs in the present study is a specific effect of fat but rather an effect of lower DM digestibility. Such an effect should be considered in all diets that increase fecal bulk.

In the present study, there were no indications that the composition of the diets had any effect on availability of trace elements. Fecal excretion was very similar to intake, a common finding in trace-element balance studies^[35].

With the exception of the LCHF 75/10 and LCHF 70/15 diets there was no effect of diet on apparent protein digestibility. This is probably an effect of low protein intake. The true protein digestibility was not affected. Provided endogenous fecal nitrogen losses are not affected by protein intake they are higher in relation to protein intake in low-protein diets than in high-protein diets. Therefore, the percentage of apparently digested protein is higher in high-protein than in low-protein diets with the same true protein digestibility. There were other indications of suboptimal protein supply in the LCHF 75/10 diet, such as a significantly lower weight gain, because protein intake of this group was below previous recommendations^[22].

Apparent fat digestibility in the present study was below 90 % for all diets. This is considerably lower than the apparent digestibility of fat in a recent study with similar LCHF diets^[23]. The reason for the lower fat digestibility is probably the type of dietary fat used in our study, which was beef tallow. Tallow is a highly saturated fat that has been demonstrated to have comparatively low digestibility in various species such as pigs and puppies^[36,37], cats^[38], and rats^[39].

The apparent digestibility (and even the true digestibility of the crude fat from tallow) in the present study was considerably lower than the apparent digestibility assumed by the Atwater factor of 35.58 kJ ME/g. Tallow has a heat of combustion of 39.5 kJ/g^[40]. When 35.58 kJ ME/g fat are calculated, the apparent digestibility of the fat is assumed to amount to 95 %. In the present study the true digestibility was only 89.6 %. Consequently using Atwater factors for diets with a major percentage of tallow led to an overestimate of the DE and ME content. This explains in part small differences in energy intake in pair-fed rats in the present study, where Atwater factors were used to calculate ME content before the data on digestibility were available.

Conclusion

The decrease in calcium availability and corresponding increase of phosphorous availability seen in the present study in HFDs may be considered as a confounding factor in studies investigating calcium and phosphorous metabolism in experimental feeding studies, even if HFDs are matched for calcium-to-energy ratio and phosphorous-to-energy ratio.

References

- [1] Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Weight loss with a low-carbohydrate, mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 2008;359:229-41.
- [2] Yancy WS, Olsen MK, Guyton JR, Bakst RP, Westman EC. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia. *Ann Intern Med* 2004;140:769-77.
- [3] Atkins RC. Dr. Atkins' new diet revolution. New York, NY: Avon Books; 1992.
- [4] Hong AM, Turner Z, Hamdy RF, Kossoff EH. Infantile spasms treated with the ketogenic diet: prospective single-center experience in 104 consecutive infants. *Epilepsia* 2010;51:1403-7.
- [5] Kossoff EH, Pyzik PL, McGrogan JR, Vining EP, Freeman JM. Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. *Pediatrics* 2002;109:780-3.
- [6] Porta N, Vallée L, Boutry E, Fontaine M, Dessein A-F, Joriot S, et al. Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after receiving the ketogenic and modified Atkins diet. *Seizure* 2009;18:359-64.
- [7] Liu Y-MC, Williams S, Basualdo-Hammond C, Stephens D, Curtis R. A prospective study: growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. *J Acad Nutr Diet* 2003;103:707-12.
- [8] Vining EPG, Pyzik P, McGrogan J, Hladky H, Anand A, Kriegler S, et al. Growth of children on the ketogenic diet. *Dev Med Child Neurol* 2002;44:796-802.
- [9] Bergqvist AC, Schall JI, Stallings VA, Zemel BS. Progressive bone mineral content loss in children with intractable epilepsy treated with the ketogenic diet. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1678-84.
- [10] Lac G, Cavalie H, Ebal E, Michaux O. Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. *Lipids Health Dis* 2008;7:16.
- [11] Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoefflich A, et al. Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *J Bone Miner Res* 2010;25:275-84.

- [12] Zernicke RF, Salem GJ, Barnard RJ, Schramm E. Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. *Bone* 1995;16:25-31.
- [13] Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short to term and extended high to fat diet-induced obesity. *Metabolism* 2011;60:243-9.
- [14] Kies C. Effect of dietary fat and fiber on calcium bioavailability. In: Kies C, editor. *Nutritional Bioavailability of Calcium*. Washington, DC: American Chemical Society Publications; 1985. p. 175-87.
- [15] Rothberg, O. *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*. Bd 66. p. 69. S. Karger. Leipzig. 1907.
- [16] Kochmann M, Petzsch E. *Biochem Z*. Bd. 32; 10. Springer Verlag. Berlin. 1911.
- [17] Agnew JE, Holdsworth CD. Effect of fat on calcium absorption from a mixed meal in normal subjects, patients with malabsorptive disease, and patients with a partial gastrectomy. *Gut* 1971;12:973-7.
- [18] Gacs G, Barltrop D. Significance of Ca-soap formation for calcium-absorption in rat. *Gut* 1977;18:64-8.
- [19] Kadzere C, Molnar S. Untersuchungen zu Interaktionen zwischen Fetten und Calciumcarbonat bzw. Dicalciumphosphatzusatz bei Verabreichung lipidreicher Rationen an wachsende Schweine. *Lipid/Fett* 1989;91:135-48.
- [20] Zinn RA, Shen Y. Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J Anim Sci* 1996;74:2303-9.
- [21] Bielohuby M, Menhofer D, Kirchner H, Stoehr BJ, Muller TD, Stock P, et al. Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300:E65-76.
- [22] National Research Council. *Nutrient requirements of laboratory animals*. Washington, DC: National Academy of Sciences, National Research Council; 1995.
- [23] Bielohuby M, Bodendorf K, Brandstetter H, Bidlingmaier M, Kienzle E. Predicting metabolisable energy in commercial rat diets: physiological fuel values may be misleading. *Br J Nutr* 2010;103:1525-33.

- [24] Naumann, C., Bassler, R., Seibold, R., Forschungsanstalten, V.D.L.U.-u. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. VDLUFA-Verl; 1988.
- [25] Kienzle E, Kopsch G, Koelle P, Clauss M. Chemical composition of turtles and tortoises. *J Nutrition* 2006;136:2053s-4s.
- [26] Gericke S, Kurmies B. Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius J Anal Chem* 1952;137:15-22.
- [27] Lucas HL. Relations between digestibility and composition of feeds and foods. Raleigh, NC: North Carolina State College; 1961.
- [28] de-Oliveira LD, Takakura FS, Kienzle E, Brunetto MA, Teshima E, Pereira GT, et al. Fibre analysis and fibre digestibility in pet foods – a comparison of total dietary fibre, neutral and acid detergent fibre and crude fibre. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2012;96:895-906.
- [29] French CE. The interrelation of calcium and fat utilization in the growing albino rat. *J Nutrition* 1942;23:375-84.
- [30] Heaney RP, Nordin BE. Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *J Am Coll Nutr* 2002;21(3):239-44.
- [31] Biellohuby M, Sawitzky M, Stoehr BJ, Stock P, Menhofer D, Ebensing S, et al. Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology* 2011;152:1948-60.
- [32] Heitz U, Horne MM. Pocket guide to fluid, electrolyte, and acid-base balance. St. Louis, MO, USA: Elsevier Health Sciences; 2012.
- [33] Kienzle E, Dobenecker B, Wichert B, Schuster S. Effect of fecal water and dry matter excretion on fecal mineral excretion in dogs studied in a fiber model. *J Nutr* 2006;136(Suppl):2001S-3S.
- [34] Prola L, Dobenecker B, Mussa PP, Kienzle E. Influence of cellulose fibre length on faecal quality, mineral excretion and nutrient digestibility in cat. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2010;94:362-7.
- [35] Kienzle E. Spurenelementbedarf des Hundes (Trace element requirements of dogs). *Übersichten zur Tierernährung* 1988;16:153-212 (in German).
- [36] Lloyd LE, Crampton EW. The relation between certain characteristics of fats and oils and their apparent digestibility by young pigs, young guinea pigs and pups. *J Anim Sci* 1957;16:377-82.

- [37] Mitchaothai J, Everts H, Yuangklang C, Wittayakun S, Vasupen K, Wongsuthavas S, et al. Digestion and deposition of individual fatty acids in growing-finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2008;92:502-10.
- [38] Peachey SE, Dawson JM, Harper EJ. The effect of aging on nutrient digestibility in cats fed beef tallow-, sunflower oil- or olive oil- enriched diets. *Growth Dev Aging* 1999;63: 49–58.
- [39] Macri EV, Gonzales Chaves MM, Rodriguez PN, Mandalunis P, Zeni S, Lifshitz F, et al. High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats. *Eur J Nutr* 2011;51:399-406.
- [40] Kienzle E, Schrag I, Butterwick R, Opitz B. Calculation of gross energy in pet foods: new data on heat combustion and fibre analysis in a selection of foods for dogs and cats. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2001;85:148-57.

Table 1

Composition of diets (in dry matter)

Diet		Chow	LCHF 75/10	LCHF 70/15	LCHF 65/20	LCHF 60/25	LCHF 55/30	LCHF 50/35	HFD
Energy (MJ/kg)	GE	20.1	33.6	32.6	32.1	31.7	30.9	30.2	26.5
	DE ¹	18.4	28.8	27.8	27.4	26.7	26.2	25.5	22.2
	ME ²	17.5	28.4	27.1	26.5	25.6	25.0	24	21.2
Weende analyses (%)	Fat	5.2	76.1	69.0	66.0	60.9	56.9	50.7	36.7
	Protein	20.9	9.6	14.7	19.7	25.1	28.0	33.7	24.1
	Fiber	4.8	6	6.2	6.3	6.5	6.7	6.3	5.6
	Ash	3	5.6	5.9	5.2	5.1	4.9	4.6	4.6
	NfE	58.1	2.6	4.1	2.8	2.3	3.4	4.5	26.2
Minerals (g/kg)	Ca	5.4	9.6	9.5	9.1	8.9	8.5	8.3	8.7
	P	2.7	5.8	6.2	5.3	5.4	5.2	4.9	4
	Na	2.1	4.3	4.7	3.8	3.7	3.6	3.7	2.7
	K	4.1	7.4	7	6.5	6.1	6.2	5.4	7.6
Trace elements (mg/kg)	Fe	107.7	162.8	184	163.9	159.8	187.4	118.6	76.7
	Zn	60.7	94.6	98.2	97	90.6	91	115.4	47.5
	Cu	7.8	22.5	16.7	13	20.9	10.8	13.5	5.9
	I ³	0.8	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3	0.6
	Mn ³	16.7	30.8	30.9	30.2	29.5	28.8	27.7	13.6
	Se ³	0.3	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.2

Fortsetzung: **Table 1**

Diet		Chow	LCHF 75/10	LCHF 70/15	LCHF 65/20	LCHF 60/25	LCHF 55/30	LCHF 50/35	HFD	
Vitamins ³	(IE/kg)	Vit A	4300	8000	8000	7600	7200	6800	6600	10400
		Vit D	1075	2000	2000	1900	1800	1700	1650	1040
		Vit E	113	200	200	190	180	170	165	360
	(mg/kg)	Vit K	4.6	8.6	8.6	8.2	7.7	7.3	7.1	5.6
		Vit B ₁	6.5	12	12	11.4	10.8	10.2	9.9	26
		Vit B ₂	6.9	12.8	12.8	12.2	11.5	10.9	10.6	15.6
		Vit B ₆	7.5	14	14	13.3	12.6	11.9	11.6	11.7
		Vit B ₁₂	0.05	0.1	0.1	0.1	0.09	0.09	0.08	0.07
		Niacin	35.5	66.1	66.1	62.8	59.5	56.2	54.5	50.8
		Pantothenic acid	17.3	32.2	32.2	30.6	29	27.4	26.6	39.5
		Folic acid	2.6	4.8	4.8	4.5	4.3	4	3.9	3.1
		Biotin	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2
		Choline	1215	1975	1987	2000	1880	2020	2033	1360

DE, digestible energy; GE, gross energy; HFD, high-fat diet; LCHF, low-carbohydrate, high-fat; ME, metabolizable energy; NfE, nitrogen free extract

¹ Experimentally determined.

² DE: 5.2 kJ/g digestible protein. Digestible protein was experimentally determined: protein content of feed (g/kg)* apparent digestibility of protein (%) / 100 * 5.2 / 1000.

³ As labeled by manufacturer

Table 2

Body weight, DM intake and apparent digestibility of DM, crude fat, crude protein and gross energy in %

Diet	BW end of digestion trial (g)		Weight gain during whole experiment (g/d)		DM intake (g/d)		Mean energy intake (ME/d)		Apparent digestibility (%)							
									DM		Crude fat		Crude protein		GE	
	Mean*	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Chow	398.2 ^{acdc}	15.8	1.76 ^a	0.58	16.3 ^a	0.9	0.29 ^{ac}	0.02	91.0 ^a	0.2	89.4 ^{ab}	2.8	86.4 ^{ae}	2.9	91.9 ^a	0.3
LCHF 75/10	367.4 ^b	10.5	0.79 ^b	0.35	9.5 ^b	0.1	0.30 ^a	0.00	79.8 ^b	1.2	89.7 ^{ad}	1.5	79.9 ^{bd}	2.0	84.8 ^{bc}	1.2
LCHF 70/15	404.0 ^{ade}	18.7	1.72 ^a	0.11	11.6 ^c	0.4	0.35 ^{bd}	0.01	80.7 ^{bcd}	0.9	89.2 ^{abc}	0.9	81.7 ^{bcd}	1.9	85.2 ^b	0.8
LCHF 65/20	384.0 ^{ace}	16.9	1.33 ^a	0.22	10.2 ^d	0.1	0.30 ^c	0.00	80.2 ^{bc}	0.8	89.4 ^{ab}	0.4	84.6 ^{acde}	2.5	84.8 ^{bc}	0.6
LCHF 60/25	387.9 ^{ce}	11.9	1.34 ^a	0.34	10.5 ^d	0.1	0.30 ^c	0.00	80.0 ^{bc}	0.5	88.1 ^{bcd}	0.5	85.0 ^{acde}	3.9	84.3 ^{cd}	0.4
LCHF 55/30	403.7 ^{de}	11.7	1.37 ^a	0.38	12.7 ^e	0.4	0.35 ^{bd}	0.01	80.8 ^{cd}	1.0	87.7 ^{cd}	0.9	82.6 ^d	3.6	84.3 ^{cd}	0.9
LCHF 50/35	407.8 ^d	9.1	1.37 ^a	0.55	13.3 ^f	0.5	0.36 ^d	0.01	81.6 ^d	0.9	86.6 ^d	0.9	85.3 ^{acde}	3.2	84.4 ^{bcd}	0.8
HFD	388.9 ^e	7.0	1.35 ^a	0.16	11.3 ^c	0.0	0.27 ^e	0.00	83.0 ^e	0.7	83.1 ^e	0.8	86.1 ^e	3.0	83.9 ^d	0.6

BW, body weight; DM, dry matter; GE, gross energy; HFD, high-fat diet; LCHF, low-carbohydrate, high-fat; ME, metabolizable energy

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Table 3

Calcium and phosphorous: intake, fecal excretion, apparent absorption, excretion via urine and balance

Diet	Ca intake (mg/d)		Fecal Ca excretion (mg/d)		Apparent Ca absorption (%)		Ca excretion via urine (mg/d)		Ca balance (mg/d)		P intake (mg/d)		Fecal P excretion (mg/d)		Apparent P absorption (%)		P excretion via urine (mg/d)		P balance (mg/d)	
	Mean*	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Chow	87.6 ^a	4.8	59.6 ^a	2.9	31.9 ^a	3.1	0.46 ^{ab}	0.09	27.5 ^a	2.3	44.5 ^a	2.42	25.7 ^a	1.7	42.1 ^a	5.0	9.6 ^a	1.3	9.26 ^a	2.3
LCHF 75/10	91.7 ^b	1.2	81.9 ^{bf}	5.8	10.7 ^{bc}	6.2	0.35 ^a	0.08	9.4 ^{bdef}	5.7	55.7 ^b	0.72	12.6 ^b	1.8	77.4 ^b	3.2	20.7 ^{bcd}	3.3	22.4 ^b	3.7
LCHF 70/15	110.6 ^c	3.9	91.2 ^{cef}	5.1	17.5 ^b	3.6	0.35 ^a	0.06	19.1 ^{acfg}	4.2	71.8 ^c	2.51	14.6 ^{bc}	4.0	79.5 ^b	6.3	20.5 ^{bcd}	2.1	36.7 ^c	5.7
LCHF 65/20	92.7 ^b	1.2	79.8 ^{bf}	4.1	14.0 ^b	4.1	0.38 ^a	0.09	12.6 ^{cdfg}	3.8	54.1 ^b	0.71	12.4 ^b	3.9	77.1 ^b	6.9	21.3 ^{bc}	2.2	20.4 ^{bd}	5.1
LCHF 60/25	93.2 ^b	1.2	83.9 ^{bcf}	12.9	15.6 ^b	3.5	0.41 ^a	0.05	8.9 ^{def}	12.4	56.8 ^b	0.74	16.8 ^{cd}	2.4	70.4 ^c	4.0	22.1 ^b	2.5	17.9 ^d	2.9
LCHF 55/30	108.2 ^c	3.8	103.9 ^{de}	5.3	3.8 ^c	5.9	0.54 ^b	0.14	3.7 ^{ef}	3.8	66.4 ^d	2.31	19.0 ^d	2.8	71.3 ^c	4.6	18.8 ^{cd}	3.2	28.8 ^e	2.9
LCHF 50/35	110.3 ^c	3.8	97.5 ^c	7.2	11.8 ^{bc}	5.3	0.75 ^c	0.17	12.1 ^{fg}	12.4	65.6 ^d	2.28	19.1 ^d	1.8	70.9 ^c	3.0	17.7 ^d	2.3	28.6 ^e	3.1
HFD	98.4 ^d	0.0	79.7 ^f	3.6	19.1 ^b	19.1	0.46 ^{ab}	0.12	18.3 ^g	6.5	31.9 ^e	0.00	18.5 ^d	1.4	58.7 ^d	3.1	19.0 ^{cd}	3.1	-5.56 ^f	3.7

Ca, Calcium; HFD, high-fat diet; LCHF, low-carbohydrate, high-fat; P, phosphorous

*Means not sharing a superscript letter are significantly different (P < 0.05).

Table 4

Trace elements: daily intake (mg/kg BW) and daily fecal excretion (mg/kg BW)

Diet	Fe				Cu				Zn			
	Intake		Fecal excretion		Intake		Fecal excretion		Intake		Fecal excretion	
	Mean*	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Chow	4.46 ^{ac}	0.17	3.72 ^a	0.30	0.32 ^a	0.01	0.32 ^a	0.04	2.52 ^a	0.10	2.21 ^a	0.20
LCHF 75/10	4.28 ^{ae}	0.19	5.29 ^b	0.58	0.59 ^b	0.03	0.36 ^{ac}	0.03	2.49 ^a	0.11	1.99 ^{ae}	0.17
LCHF 70/15	5.41 ^b	0.36	4.95 ^{bc}	0.26	0.49 ^c	0.03	0.47 ^b	0.10	2.89 ^{bc}	0.19	2.24 ^{ab}	0.15
LCHF 65/20	4.40 ^{ac}	0.17	4.68 ^c	0.25	0.35 ^a	0.02	0.42 ^c	0.07	2.61 ^a	0.10	2.09 ^a	0.17
LCHF 60/25	4.71 ^c	0.83	4.83 ^{bc}	0.82	0.62 ^b	0.11	0.41 ^c	0.10	2.67 ^{ab}	0.47	2.48 ^b	0.47
LCHF 55/30	6.03 ^d	0.31	4.79 ^{bc}	0.33	0.35 ^a	0.02	0.41 ^c	0.04	2.93 ^c	0.15	2.93 ^c	0.15
LCHF 50/35	3.95 ^e	0.21	4.62 ^c	0.46	0.45 ^c	0.02	0.43 ^c	0.05	3.85 ^d	0.21	3.24 ^d	0.09
HFD	2.23 ^f	0.03	2.43 ^d	0.12	0.17 ^d	0.00	0.19 ^d	0.02	1.38 ^e	0.02	1.78 ^e	0.12

BW, body weight; HFD, high-fat diet; LCHF, low-carbohydrate, high-fat

*Means not sharing a superscript letter are significantly different ($P < 0.05$).

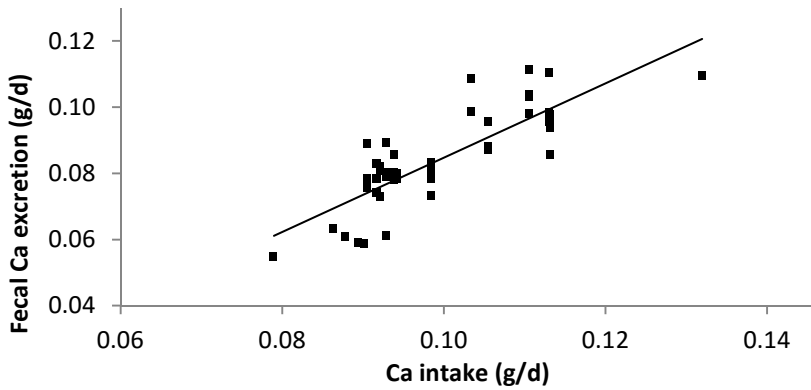
Table 5

Serum parathyroid hormone after 4 wk on diets (pg/mL)

Diet	Mean	SD	n
Chow	466	193	7
LCHF 75/10	327	135	8
LCHF 65/20	501	205	5
LCHF 55/30	428	237	6
LCHF 50/35	454	266	5
HFD	376	182	6

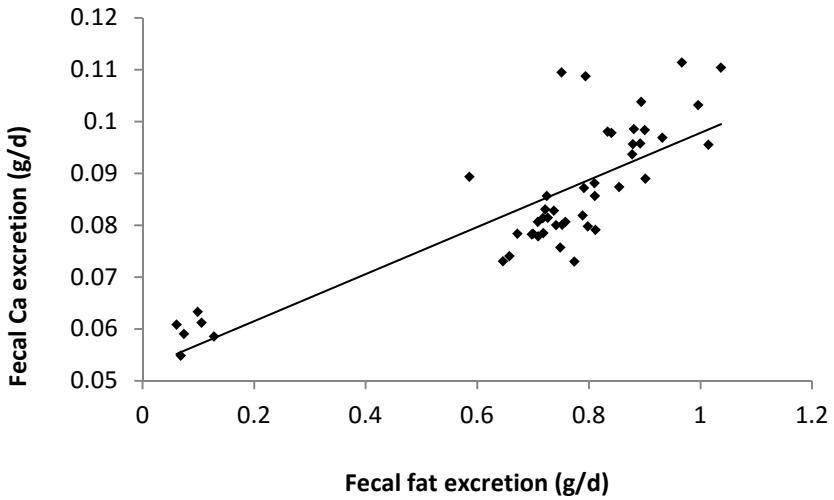
HFD, high-fat diet; LCHF, low-carbohydrate, high-fat

Fig. 1



Relationship between calcium intake and fecal calcium excretion (Ca, calcium); Ca intake (x; g/d); fecal Ca excretion (y; g/d); $y = 1.1225x - 0.0275$; $r = 0.6796$; $n = 48$; $P < 0.001$; $SEE = 0.008$.

Fig. 2



Relationship between fecal fat excretion and fecal calcium excretion (Ca, calcium); Fecal fat excretion (x ; g/d); fecal Ca excretion (y ; g/d); $y = 0.0454 x + 0.0524$; $r = 0.6842$; $n = 48$; $P = <0.001$; $SEE = 0.008$.

V. DISKUSSION

1. Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Arbeit war die *sV* (scheinbare Verdaulichkeit) von Rohfett geringer als 90% (*Publikation 2, Table 2*) und somit niedriger als in einer vorherigen Studie mit ähnlichen LCHF-Diäten (low-carbohydrate, high-fat; kohlenhydratarme Hochfett-Diäten) (BIELOHUBY et al., 2010). Die schlechtere Verdaulichkeit von Fett kann auf die Verwendung von Rindertalg bei den LC(HF)-Diäten in den vorliegenden Studien zurückzuführen sein, welcher in vielen Studien bei verschiedenen Tierarten eine schlechte Verdaulichkeit aufwies (LLYOD und CRAMPTON, 1957; PEACHEY et al., 1999; MITCHAOATHAI et al., 2008; MACRI et al., 2011). In Abb. 1 ist für den Versuch zur *Publikation 2* das Verhältnis der Aufnahme an Rohfett und dem scheinbar verdauten Rohfett dargestellt ($y = 0,896 x - 0,095$; $r^2 = 0,996$; $n = 48$; $p < 0,001$). Der Regressionskoeffizient zeigt eine *wV* (wahre Verdaulichkeit) für Rohfett von 89,6% an.

Die *sV* und die *wV* von Rohfett waren in vorliegendem Versuch (*Publikation 2*) erheblich geringer als die durch den Atwater-Faktor von 35,58 kJ ME/g (ME, metabolizable energy; umsetzbare Energie) unterstellte *sV*. Der in den LC(HF)-Diäten verwendete Rindertalg hat einen Brennwert von 39,5 kJ/g (KIENZLE et al., 2001). Kalkuliert mit dem Atwater-Faktor von 35,58 kJ ME/g Fett wurde für Fett eine *sV* von 95% unterstellt. Die in vorliegendem Versuch (*Publikation 2*) festgestellten *sV* und *wV* hingegen lagen beide unter 90%.

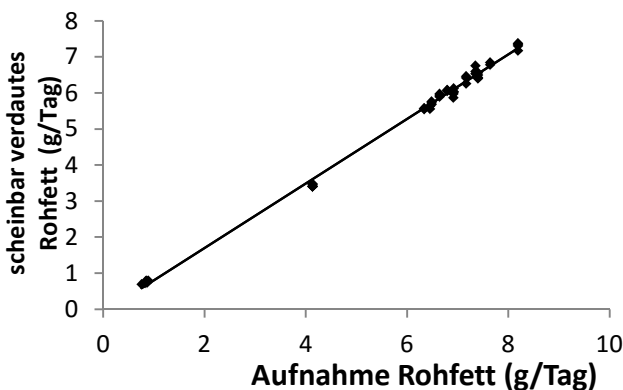


Abb. 1: Beziehung zwischen dem aufgenommenen Rohfett (x ; g/Tag) und dem scheinbar verdauten Rohfett (y ; g/Tag)

Da für die Versuche zu den vorliegenden Publikationen der ME-Gehalt der Diäten vor Versuchsbeginn anhand der Atwater-Faktoren für das pairfeeding kalkuliert wurde, ergab sich eine Überschätzung des Energiegehalts der Diäten mit hohem Fettgehalt. In der vorliegenden *Publikation 2 (Table 2)* wurden geringe Abweichungen in der Energieaufnahme (ME) der Tiere gezeigt.

Hinzu kam, dass nicht alle Ratten der Diäten mit hohem Fettgehalt das ihnen vorgelegte Futter komplett fraßen. Die Aufnahme an DE (digestible energy; verdauliche Energie) und Protein war bei den verschiedenen Diät-Gruppen daher, trotz des iso-energetischen pairfeedings, ähnlich hoch aber nicht identisch. Die geringste DE-Aufnahme zeigten die Tiere der Gruppen LC(HF) 75/10 und LC(HF) 65/20 (*Publikation 1, Table 3*). KIRSCH et al. (1968) beschrieben für Ratten eine geringere Futtermittelaufnahme bei der Verwendung von Diäten mit einem geringen Proteingehalt. Ein reduzierter Appetit wurde für den Menschen in der Literatur aber auch als LC-Effekt und/oder Effekt einer Ketose dargestellt (RIOS, 2001; MCCLERNON et al., 2007; JOHNSTONE et al., 2008).

Die tägliche Zunahme der Tiere war nicht abhängig von der DE-Aufnahme. Die geringen Abweichungen in der Energieaufnahme waren nicht limitierend für das Wachstum der Ratten, sondern u.a. die Höhe der Proteinaufnahme, so dass es nicht durch Differenzen in der Energieaufnahme zu systematischen Effekten auf die tägliche Zunahme der Tiere kam.

Tab. 1 zeigt die Kalziumaufnahme der Tiere des Versuchs zur *Publikation 2*. Die Kalziumaufnahme war zwischen den Gruppen ähnlich hoch aber nicht identisch. Begründet lag dies in einer etwas höheren ME-Aufnahme der Tiere bei Diäten mit hohem Fettgehalt (*Publikation 2, Table 2*). Zum anderen war dies durch die Tatsache begründet, dass nicht alle Ratten der LC(HF)-Diäten mit hohem Fettgehalt das ihnen vorgelegte Futter komplett fraßen.

Diät	Kalziumaufnahme (g/Tier/Tag)
Chow	0,61 ± 0,03 ^a
LC75/10	0,64 ± 0,01 ^b
LC70/15	0,77 ± 0,03 ^c
LC65/20	0,65 ± 0,01 ^b
LC60/25	0,65 ± 0,01 ^b
LC55/30	0,76 ± 0,03 ^c
LC50/35	0,77 ± 0,03 ^c
HFD	0,49 ± 0,00 ^d

Tab. 1: Kalziumaufnahme (TS, Trockensubstanz) in g/Tier/Tag;

Mittelwerte, die nicht mit demselben Buchstaben überschrieben sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$).

In vorliegender Arbeit kam es trotz der nicht ganz identischen Kalziumaufnahme zwischen den Gruppen bei einer geringeren Kalziumaufnahme nicht zu einer schlechteren sV von Kalzium. Es lagen keine systematischen Differenzen der Kalziumaufnahme in Abhängigkeit vom Fettgehalt vor. Die in vorliegender *Veröffentlichung 2* dargestellte *Fig. 1* zeigt keine systematischen Mengeneffekte der Kalziumaufnahme auf die sV von Kalzium, da die fäkale Ausscheidung positiv mit der Kalziumaufnahme korrelierte. Die in vorliegender *Veröffentlichung 2* dargestellte *Fig. 2* hingegen zeigt einen Effekt des Fetts auf die sV von Kalzium, da die fäkale Ausscheidung von Kalzium positiv mit der fäkalen Fettexkretion korrelierte.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1. Wachstum, Energie- und Stickstoff-Stoffwechsel

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, LC-Effekte von Effekten der entstehenden Ketose, des niedrigen Proteingehalts und des hohen Fettgehalts unter LC(HF)-Diäten bei Ratten zu differenzieren. Es wurden Diäten mit sinkendem Proteingehalt und gleichzeitig steigendem Fettgehalt verwendet, wobei der Gehalt an Protein (als % der DE) bei der Chow-Diät 23% betrug und bei den Versuchsdiäten auf bis zu 6% sank. Bei einer Diät mit nur 6% der DE als Protein muss laut einer Studie von KIRSCH et al. (1968) von einer Proteinmangelernährung bei Ratten ausgegangen werden, selbst wenn Kohlenhydrate in der Diät vorhanden sind und deshalb kein Protein für die Gluconeogenese verwendet wird.

In Empfehlungen für wachsende Ratten ist ein Minimum von 6 mg hochverdaulichem Protein pro kJ GE angegeben (NRC, 1995). Dieser Wert wurde für die Diät mit dem niedrigsten Proteingehalt (LC(HF) 75/10: 2,9 mg/kJ GE) nicht erreicht. Es muss also bei LC-Diäten mit sehr hohem Fettgehalt und gleichzeitig sehr niedrigem Proteingehalt bei einer normalen Energieaufnahme der Tiere von einer Protein/Energie-Mangelernährung ausgegangen werden.

Die Ratten mit einer geringen Aufnahme an verdaulichem Protein zeigten in vorliegenden Studien eine reduzierte Gewichtszunahme (*Publikation 1, Table 3 und Publikation 2, Table 2*). Die Gewichtszunahme war am niedrigsten bei der Diät mit dem geringsten Proteingehalt und dem höchsten Fettgehalt (LC(HF) 75/10). CREWS et al. (1969) stellten bei Ratten ein geringeres Wachstum bei einer Proteinmangelernährung fest. In den vorliegenden Studien zeigten die Tiere der Gruppe LC(HF) 55/30, die mit einem zur Chow-Diät identischen Proteingehalt gefüttert wurden, ein geringeres Wachstum als die Tiere der Chow-Gruppe und somit war für diese Gruppe ein LC-Effekt auf das Wachstum vorhanden.

Viele Autoren beschrieben ein vermindertes Wachstum als Effekt einer geringen Kohlenhydrataufnahme (ALLRED, 1969; MCCARGAR et al, 1989; BIELOHUBY et al, 2010).

RENNER (1964) stellte bei Hühnern fest, dass der negative LC-Effekt auf das Wachstum durch eine Erhöhung des Proteingehalts in der Ration verbessert, aber nicht ganz ausgeglichen werden konnte.

KIENZLE et al. (1985) stellten fest, dass bei einer LC-Diät (mit moderatem Proteingehalt) bei Hündinnen eine negative Auswirkung auf die Reproduktionsleistung bestand. Die Hündinnen zeigten einen höheren Verlust an Welpen, und die Welpen hatten geringere Geburtsgewichte und geringere Vorräte an Leber-Glykogen. Bei einer Erhöhung des Proteingehalts zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine ausgeglichene Zahl an Welpen pro Wurf, eine identische Vitalität der Welpen und ein entsprechender Leber-Glykogengehalt. Das absolute Wurfgewicht, das absolute Geburtsgewicht der Welpen und die perinatale Sterblichkeit konnte durch die Erhöhung von Protein verbessert werden, waren aber nie ganz so hoch wie in der Kontrollgruppe.

Vorliegende Arbeit bestätigt dieses Prinzip. Die negativen LC-Effekte auf das Wachstum wurden durch eine höhere Proteinaufnahme verbessert, aber nicht aufgehoben. Das Wachstum der Tiere war bei höherer Proteinaufnahme besser als bei geringerer Proteinaufnahme.

Für die Diät mit dem geringsten Proteingehalt war die Stickstoff-Bilanz beinahe Null (*Publikation 1, Table 4*). Trotzdem zeigten die Tiere noch eine Gewichtszunahme (*Publikation 1, Table 3*). Sie hatten am Ende des Versuchs den geringsten Proteingehalt des Körpers (*Publikation 1, Table 7*). Je mehr Protein eine Diät enthielt, desto geringer war der Effekt auf die Stickstoff-Bilanz. Bei der Gruppe mit identischem Proteingehalt zur Chow-Diät (LC(HF) 55/30) zeigte sich kein Unterschied in der Stickstoff-Bilanz, allerdings war der LC-Effekt auf den relativen Gehalt an Körperprotein noch vorhanden (*Publikation 1, Table 3 und 7*). Die Proteinunterversorgung der Ratten mit geringer Proteinaufnahme spiegelte sich auch in niedrigen Werten des Gesamtproteins im Plasma wider (*Publikation 1, Table 6*). Alle Werte lagen allerdings im Normbereich für Ratten (ZUR, 2005; SHARP und VILLANO, 2012). Der Albumin-Spiegel (in g/L) zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings zeigte sich für den Gehalt an Albumin in % des Gesamtproteins eine signifikante Erhöhung bei den Tieren mit der geringsten Proteinaufnahme (*Publikation 1, Table 6*). Das Zusammenspiel des erniedrigten Gesamtproteins und des erhöhten Albumin-Gehalts im Plasma könnte auf einem niedrigen Gehalt an bestimmten Plasmaproteinen (wie z.B. Globulinen) beruhen. Dies wiederum könnte durch einen Mangel an glukoplastischen Aminosäuren bedingt sein. So beschrieben LI et al. (2007) eine beeinträchtigte Antikörperproduktion durch einen Alaninmangel bei Ratten.

In einer Parallelstudie stellten BIELOHUBY et al. (2011b) fest, dass nur die Diät LC(HF) 75/10 zuverlässig eine Ketose bei den Ratten auslöste. Dies konnte in der vorliegenden

Studie bestätigt werden, da bei dieser Gruppe die renale Ausscheidung an Energie pro g Stickstoff doppelt so hoch war wie in den anderen Gruppen, was sehr wohl durch Ketonkörper bedingt sein könnte (*Publikation 1, Table 5*).

Für diese Gruppe zeigte sich anhand der Stickstoff-Bilanz eine unzureichende Proteinaufnahme für ein normales Wachstum und anhand der niedrigen renalen Stickstoff-Ausscheidung, welche abhängig von der Höhe der Aufnahme an verdaulichem Protein und bei der Diät mit dem geringsten Proteingehalt sehr gering war, eine Proteinmangelernährung.

Daraus lässt sich schließen, dass eine LCHF-Diät für Ratten mit einer sicheren Erzeugung einer Ketose (aufgrund der sehr geringen Proteinaufnahme) fast zwingend eine Proteinmangel-Diät ist. Solch ein Proteinmangel wurde in Versuchen mit Schweinen und Hühnern durch die Zugabe von limitierenden Aminosäuren, wie Lysin oder Methionin, ausgeglichen (KIRCHGESSNER, 2004). Für die Diäten vorliegender Studien wurde Casein als qualitativ sehr hochwertiges Protein verwendet und der Lysin-Gehalt in % des Proteingehalts war in der Diät LC(HF) 75/10 am höchsten (es wurde Lysin zugegeben). Die Aufnahme an Lysin (TS, Trockensubstanz) in g pro kg BW (body weight; Körpermasse) und Tag war bei dieser Gruppe trotzdem am geringsten. Auch eine glukoplastische Aminosäure, wie Methionin, könnte ein limitierender Faktor sein. PISSIOS et al. (2013) erhöhten die Methionin-Zugabe einer KD bei Ratten und erzielten einen Ausgleich der negativen Auswirkungen auf das Wachstum, ohne dabei die Entstehung der Ketose aufzuheben.

2.2. Körperzusammensetzung und Blutwerte

Die Tiere der Gruppe mit dem geringsten Proteingehalt und dem höchsten Fettgehalt der Diät zeigten in der vorliegenden Studie einen signifikant erhöhten Fettgehalt der Leber (*Publikation 1, Table 7*).

Eine Fettakkumulation in der Leber wurde in verschiedenen Studien bei einer Proteinunterversorgung festgestellt (WEBSTER, 1942; KOSTERLITZ, 1947; WILLIAMS und HURLEBAUS, 1965; KIRSCH et al., 1968). KENNEDY et al. (2007) beschrieben einen Anstieg der Fettoxidation in der Leber bei Mäusen unter einer kohlenhydratfreien Proteinmangeldiät. GARBOW et al. (2011) stellten einen Anstieg des Triglyzerid-Gehalts der Leber bei Mäusen unter einer ketogenen LCHF-Diät bereits 3 Wochen nach Beginn des Versuchs fest.

PISSIOS et al. (2013) erhöhten den Cholin-Gehalt einer KD für Ratten. Dies konnte die Fettakkumulation in der Leber der Tiere reduzieren. In den Diäten der vorliegenden Studie war Cholin allerdings in der Höhe der Diäten von PISSIOS et al. (2013) supplementiert, was offensichtlich nicht ausreichte, um die Akkumulation von Fett in den Lebern der Tiere, die mit Diäten mit hohem Fettgehalt und geringem Proteingehalt

gefüttert wurden, zu reduzieren.

BIELOHUBY et al. (2011a) stellten bei wachsenden Ratten unter einer LCHF-Diät fest, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen einer partiellen Wachstumshormonresistenz (Beeinträchtigung der zentralen Regulation des Wachstumshormons und der Genexpression für IGF-1 in der Leber) und einem erhöhten Fettgehalt des Körpers mit gleichzeitig geringerem Proteingehalt des Körpers kam. Die Tiere des Versuchs von BIELOHUBY et al. (2011a) zeigten eine Akkumulation von viszeralem Fett, weniger Körperprotein und erhöhte Triglycerid-Spiegel im Blut.

In der vorliegenden Studie zeigten die Tiere der Gruppen LC(HF) 75/10 und LC(HF) 65/20 einen signifikant erhöhten Fettgehalt des Körpers und einen erhöhten Triglycerid-Spiegel im Blut (*Publikation 1, Table 6 und 7*). Die Höhe des Proteingehalts der Körper war niedriger, je höher der Fettgehalt und je geringer der Proteingehalt der Diät war (*Publikation 1, Table 7*).

Die Tiere der Gruppe LC(HF) 55/30 (LC(HF)-Diät mit identischem Proteingehalt zur Chow-Diät) wiesen, trotz identischer Proteinaufnahme, einen reduzierten Fettgehalt des Körpers auf. Den höchsten Fettgehalt des Körpers wiesen die Tiere der Gruppe LC(HF) 65/20 (LC(HF)-Diät mit dem zweitniedrigsten Proteingehalt) auf. Die Höhe des Fettgehalts der Körper der Ratten der Gruppe LC(HF) 75/10 (LC(HF)-Diät mit dem niedrigsten Proteingehalt) lag zwischen den Gruppen LC(HF) 65/20 und LC(HF) 55/30 (*Publikation 1, Table 7*). Die Höhe des Fettgehalts des Körpers der Ratten zeigte im Versuch der vorliegenden Arbeit somit keinen linearen Zusammenhang zur Höhe der Proteinaufnahme der Tiere (Abb. 2).

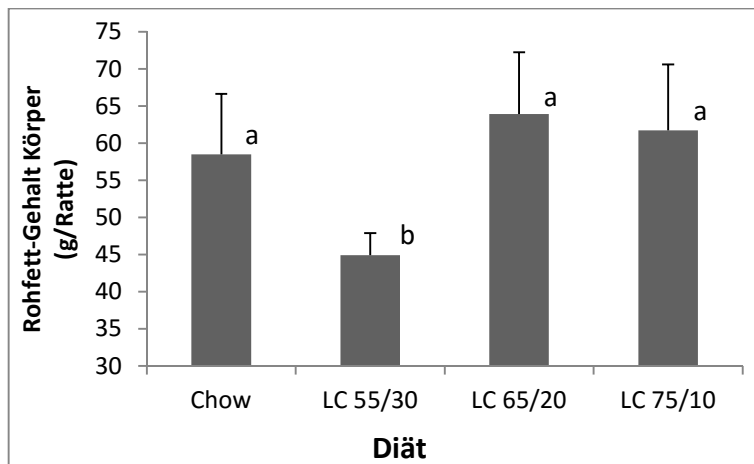


Abb.2: Rohfett-Gehalt des Körpers (g/Ratte);

Gruppen, die nicht mit demselben Buchstaben (a,b,c) gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant ($p < 0,001$).

Für den Befund des signifikant geringeren Fettgehalts des Körpers der Ratten der Gruppe LC(HF) 55/30 könnten Effekte wie eine erhöhte Sättigung (HILL und BLUNDELL, 1968) oder eine erhöhte Wärmeproduktion (WESTERTERP et al., 1999) der Tiere eine Rolle gespielt haben. Die DE-Aufnahme war im Versuch zu vorliegender Arbeit bei der Gruppe LC(HF) 55/30 höher als in der Chow-Gruppe (*Publikation 1, Table 3*). BIELOHUBY et al. (2011b) konnten in einer vorherigen Studie mit einer zu vorliegender Arbeit identisch konzipierten Diät (LC(HF) 55/30) keine erhöhte Wärmeproduktion der Ratten dieser Gruppe feststellen. Die Autoren zeigten außerdem auch keine Reduzierung des Fettgehalts des Körpers der Ratten dieser Gruppe, deshalb wurde in vorliegender Arbeit der Befund des reduzierten Fettgehalts der Gruppe LC(HF) 55/30 nicht weiter interpretiert.

2.3. Verdaulichkeit der Nährstoffe und Mineralstoffe

In der vorliegenden Studie war die sV von Fett für alle Diäten geringer als 90% (*Publikation 2, Table 2*). BIELOHUBY et al. (2010) stellten bei anderen LCHF-Diäten eine höhere Verdaulichkeit von Fett fest. Grund für die schlechtere Verdaulichkeit der Diäten der vorliegenden Studie könnte die nahezu ausschließliche Verwendung von Rindertalg als Fettquelle sein. Dies ist ein hochgesättigtes Fett, das in vielen Studien eine schlechte Verdaulichkeit zeigte (LLYOD und CRAMPTON, 1957; PEACHEY et al., 1999; MITCHAOTHAI et al., 2008; MACRI et al., 2011).

Die sV von Kalzium war im Vergleich zur Chow-Diät bei allen Diäten mit hohem Fettgehalt signifikant reduziert (*Publikation 2, Table 3*). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die fäkale Kalziumausscheidung korrelierte signifikant positiv mit der Kalziumaufnahme und der fäkalen Fettsäureausscheidung (*Publikation 2, Fig.1 und 2*). Dieser Zusammenhang könnte auf die Bildung von Kalziumseifen zurückzuführen sein, da für den in vorliegenden Studien verwendeten Rindertalg als Fettquelle eine schlechte Verdaulichkeit bzw. ein höherer Grad der Sättigung vorliegt. Somit wurde mehr Fett über die Fäzes ausgeschieden und es wurden vermehrt Fettseifen (und somit Kalziumseifen) gebildet. GACS und BARLTROP (1977) stellten fest, dass Seifen ungesättigter Fette die Kalziumabsorption in geringerem Maße senken als Seifen gesättigter Fette. In einer vorherigen Studie mit anderer Fettquelle war die Kalziumabsorption nicht so stark beeinflusst (BIELOHUBY et al., 2010). Die renale Kalziumausscheidung war in der vorliegenden Studie insgesamt gering (*Publikation 2, Table 3*).

Um herauszufinden, ob die Höhe des scheinbar verdaulichen Kalziums in allen Diät-Gruppen ausreichend war, wurde das Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium zur Energie berechnet. Es ergab sich für die Chow-Diät ein Verhältnis von 98 mg scheinbar verdaulichem Kalzium pro MJ ME, für die Diät HFD 78 mg scheinbar verdaulichem Kalzium pro MJ ME und für die LCHF-Diäten 13-63 mg scheinbar verdaulichem Kalzium pro MJ ME.

Bei Nutzung der Empfehlungen für wachsende Ratten (NRC, 1995) zur Berechnung des Verhältnisses von Kalzium zur Energie im Futter würde sich ein Verhältnis von etwa 300 mg Kalzium pro MJ ME ergeben. Da die sV von Kalzium für die Chow-Diät in der vorliegenden Arbeit 31,9% betrug, wäre das Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium zur Energie für eine Chow-Diät 96 mg scheinbar verdauliches Kalzium pro MJ ME (gemäß der zuvor verwendeten Empfehlungen für wachsende Ratten (NRC, 1995)). Dies bedeutet, dass die Höhe des scheinbar verdaulichen Kalziums bei allen Diäten mit hohem Fettgehalt marginal war.

Die Kalziumbilanz war in der Chow-Diät signifikant höher als in den Diäten mit hohem Fettgehalt, jedoch zeigten alle Diäten eine positive Kalziumbilanz (*Publikation 2, Table 3*). Die schlechtere Kalziumbilanz könnte auf eine schlechtere Kalziumverdaulichkeit der Diäten mit hohem Fettgehalt zurückzuführen sein. Die sV von Phosphor war in allen Versuchsdiäten im Vergleich zur Chow-Diät erhöht. Die fäkale Phosphorausscheidung war in allen Versuchsdiäten im Vergleich zur Chow-Diät geringer und die renale Ausscheidung von Phosphor höher (*Publikation 2, Table 3*). In Abb. 3 ist dargestellt, dass sich für alle in der *Publikation 2* untersuchten Diäten mit hohem Fettgehalt ein Verhältnis kleiner 1:1 zwischen scheinbar verdaulichem Kalzium und scheinbar verdaulichem Phosphor ergab (Chow-Diät: 1,5; HFD: 0,7; LC(HF)-Diäten: 0,1-0,4).

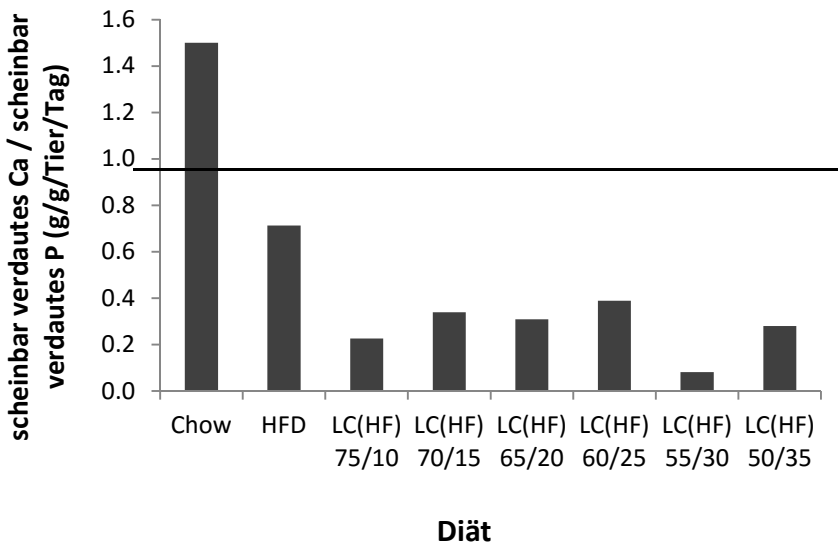


Abb. 3: Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium (Ca) zu scheinbar verdaulichem Phosphor (P) in g/g/Tier/Tag

Die fäkale Ausscheidung von Kalzium erwies sich in einer Studie von HEANEY und NORDIN (2002) als ein wichtiger Bestimmungsfaktor für die fäkale Phosphorausscheidung und beeinflusste die sV von Phosphor.

Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Bildung von unlöslichen Kalzium-Phosphor-Komplexen, da die in Kalziumseifen gebundenen Kalziumionen (es sind bei Diäten mit einem hohen Gehalt an ungesättigten Fetten mehr Kalziumseifen vorhanden) keine Phosphorionen mehr binden können und somit mehr Phosphor absorbiert werden kann. In diesem Fall würde dann mehr Phosphor renal ausgeschieden, was in vorliegender Studie festgestellt werden konnte (*Publikation 2, Table 3*).

Durch eine schlechte Verfügbarkeit von Kalzium und gleichzeitig bessere Verfügbarkeit von Phosphor könnte man einen Anstieg des PTHs (Parathormons) der Tiere annehmen. Die Höhe des PTHs im Serum zeigte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine signifikanten Unterschiede (*Publikation 2, Table 5*). Auch in einer Studie von BIELOHUBY et al. (2010) mit anderen LCHF-Diäten, die sogar eine geringere Mineralstoffdichte aufwiesen, trat dieser Effekt nicht auf. Die Ratten des Versuchs zur *Publikation 2* waren bei PTH-Bestimmung am Ende des Versuchs fast ausgewachsen (16 Wochen alt). Es ist deshalb möglich, dass bei den fast erwachsenen Tieren eine noch größere Dysbalance zwischen Kalzium und Phosphor vorliegen müsste, um den PTH-Spiegel zu beeinflussen.

Die sV der TS war in allen Versuchsdiäten im Vergleich zur Chow-Diät reduziert (*Publikation 2, Table 2*). Je höher der Fettgehalt der Diät war, desto schlechter war die sV TS.

Die sV von Natrium und Kalium war signifikant niedriger, wenn alle Versuchsdiäten als Gruppe mit der Chow-Diät verglichen wurden. Durch die schlechtere sV TS ergab sich eine größere Menge Kot-TS und eine erhöhte fäkale Wasserausscheidung. KIENZLE et al. (2006) und PROLA et al. (2010) zeigten bei Hunden und Katzen, dass die Menge an Kot ein wichtiger Faktor für die fäkale Natriumausscheidung, sowie die Menge der fäkalen Wasserausscheidung ein wichtiger Faktor für die fäkale Kaliumausscheidung darstellen kann. Dieser Zusammenhang konnte in vorliegender Arbeit bestätigt werden, wobei der engste Zusammenhang für beide Elemente zur fäkalen TS-Ausscheidung bestand.

Abb.4 zeigt den Zusammenhang zwischen der Menge der Kot-TS (x ; g/kg BW/Tag) und der fäkalen Natriumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag): $y = 4.5993x - 8.5927$; $r^2 = 0.5081$.

Die Menge der Kot-TS (x ; g/kg BW/Tag) korrelierte auch mit der fäkalen Kaliumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag): $y = 5.312x - 3.9635$; $r^2 = 0.2882$.

Die Menge der Kot-US (x ; g/kg BW/Tag) korrelierte mit der fäkalen Natriumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag): $y = 3.4912x - 9.5952$; $r^2 = 0.6425$.

Die Menge an Kot-Wasser (x ; g/kg BW/Tag) korrelierte mit der fäkalen Natriumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag): $y = 6.2908x + 4.1124$; $r^2 = 0.4628$ und mit der

fäkalen Exkretion von Kalium (y ; mg/kg BW/Tag): $y = 9.4742x + 6.1673$; $r^2 = 0.4464$.

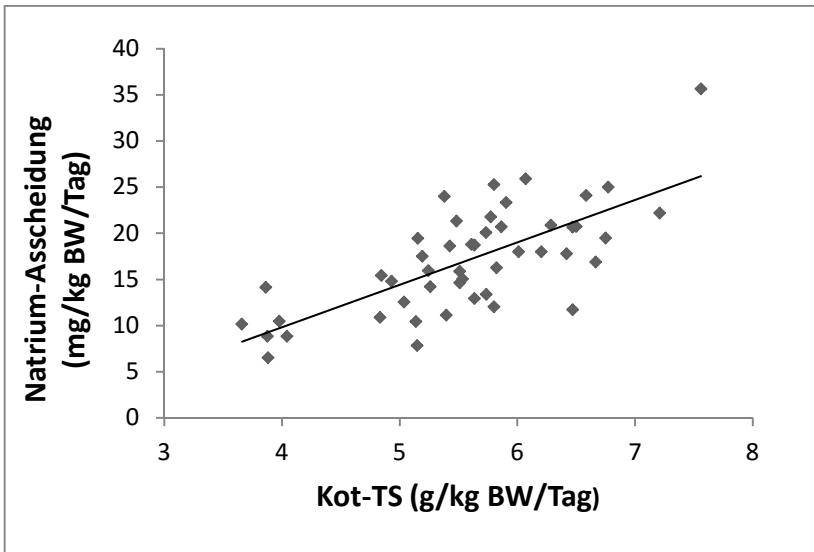


Abb. 4: Beziehung zwischen der Menge an Kot-TS (x ; g/kg BW/Tag) und der fäkalen Natriumausscheidung (y ; mg/kg BW/Tag)

2.4. Kernpunkte

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Ausprägung der LC-Effekte auf alle gemessenen Parameter abhängig vom Proteingehalt der Diäten war. Bei Diäten mit sehr geringem Proteingehalt waren sie deutlicher ausgeprägt als bei Diäten mit höherem Proteingehalt. Allerdings blieb auch bei hoher Proteinzugabe ein LC-Effekt auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Tiere bestehen. In Verbindung mit einer Studie von BIELOHUBY et al. (2011b) konnte festgestellt werden, dass eine LCHF-Diät, die sicher eine Ketose bei Ratten auslöste, eine Proteinmangeldiät für das Wachstum der Tiere war. Es dürfte somit sehr schwierig sein, eine ketogene Diät für Ratten zu konzipieren, bei der Protein für das Wachstum ausreichend zur Verfügung steht und gleichzeitig die erwünschte Ketose nicht aufgehoben wird. Für zukünftige Studien mit ketogenen LCHF-Diäten bei Ratten ist zu überlegen, ob durch eine Zulage von Aminosäuren (wie im Versuch von PISSIOS et al. (2013) z.B. für Methionin gezeigt) der Proteinmangel der Diäten ausgeglichen werden kann, ohne dabei die Ketose aufzuheben.

Eine wichtige Feststellung der vorliegenden Arbeit war eine deutliche Diskrepanz einer schlechteren Kalziumverfügbarkeit und gleichzeitig besseren Phosphorverfügbarkeit durch die Verwendung von ausschließlich ungesättigtem, schlecht verdaulichem Rindertalg als Fettquelle bei Hochfettdiäten. Für zukünftige Versuche mit Diäten mit hohem Fettgehalt bei Ratten ist die Auswahl einer alternativen Fettquelle zu Rindertalg, also mit besserer Verdaulichkeit und ohne Bildung von Kalziumseifen, zu empfehlen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss einer kohlenhydratarmen Fütterung auf den Stickstoff-Stoffwechsel und die Kalziumverfügbarkeit bei Ratten

Kohlenhydratarne Diäten werden in der Humanmedizin zur Gewichtsreduktion bei Adipositas eingesetzt. Als ketogene Diät (KD) wird eine kohlenhydratarne Diät mit hohem Fettgehalt (low-carbohydrate, high-fat; LCHF-Diät) bei verschiedenen Erkrankungen, wie der Epilepsie bei Kindern oder einem Pyruvatdehydrogenase-Mangel, eingesetzt. LCHF-Diäten, die sicher eine Ketose erzeugen, haben zusätzlich zum hohen Fettgehalt und geringen Kohlenhydratgehalt einen sehr niedrigen Proteingehalt. Als eine der Nebenwirkungen dieser ketogenen LCHF-Diäten wurde ein negativer Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und eine Wachstumsverzögerung bei Kindern mit Epilepsie und bei Ratten beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es, die bei Ratten durch LCHF-Diäten auftretenden Effekte des niedrigen Kohlenhydratgehalts, der Ketose, des niedrigen Proteingehalts und des hohen Fettgehalts auf den Energie- und Stickstoff-Stoffwechsel und die Körperzusammensetzung sowie einige Blutwerte zu differenzieren. Zusätzlich wurden Unterschiede in der Verdaulichkeit und Bilanz der Nährstoffe, Mineralstoffe und Spurenelemente bei LCHF-Diäten im Vergleich zu einer Chow-Diät und einer Standard-Diät mit hohem Fettgehalt (HFD, hoher Gehalt an Fett und Kohlenhydraten) untersucht.

Im ersten Versuch (Publikation 1) wurden 3 LC-Diäten mit unterschiedlich hohem Proteingehalt verwendet, wobei das Fett/Protein-Verhältnis der LC-Diäten (in % der TS) 75/10, 65/20 und 55/30 betrug (Diäten LC75/10, LC65/20, LC55/30). Für das Futter, die Fäzes, den Urin und die Körper und Lebern der Ratten wurden der Brennwert, der Stickstoff-Gehalt (Kjeldahl-Methode) und das Rohfett ermittelt. In den Blutproben wurde der Plasmaprotein-, Albumin- und Triglyzerid-Spiegel untersucht.

Im zweiten Versuch (Publikation 2) wurden 6 verschiedene LCHF-Diäten und eine HFD verwendet, wobei das Fett/Protein-Verhältnis der LCHF-Diäten 75/10, 70/15, 65/20, 60/25, 55/30 und 50/35 betrug (Diäten LCHF 75/10 – LCHF 50/35). Die Parathormon-Bestimmung (PTH) im Serum erfolgte mittels Immunoassay.

Für beide Versuche wurden bei allen LCHF-Diäten und der HFD die Gehalte an Mineralstoffen, Spurenelementen und Vitaminen in ein vergleichbares Verhältnis zur Energie gesetzt wie bei der Chow-Diät. Die Versuchsdiäten wurden isoenergetisch

(mithilfe der umsetzbaren Energie, ME) zur Chow-Diät gefüttert (pairfeeding). Alle LCHF-Diäten und die HFD enthielten als einzige Fettquelle Rindertalg und alle Versuchsdiäten enthielten als einzige Proteinquelle Natriumcasein. Die männlichen Wistar-Ratten waren zu Beginn des Versuchs 12 Wochen alt. Nach einer Adaption der Ratten an die zugeteilte Versuchsdiät wurde über mindestens 5 aufeinanderfolgende Tage die Futteraufnahme bestimmt und während dieser Zeit täglich Kot und Urin der Tiere gesammelt.

Der erste Versuch (Publikation 1) dieser Arbeit zeigte, dass die Gewichtszunahme der Ratten geringer war, je höher der Fettgehalt und je niedriger der Proteingehalt der LC-Diäten war. Der Grad der Reduktion war abhängig von der Höhe der Aufnahme an verdaulichem Rohprotein (die tägliche Gewichtszunahme war im Vergleich zur Chow-Diät bei Ratten der Gruppe LC75/10 um 50% und bei Ratten der Gruppe LC55/30 um 20% reduziert).

Die renale Exkretion von Stickstoff war abhängig von der Aufnahme an verdaulichem Protein (in g/Ratte/d: Chow: 0,23; LC75/10: 0,05; LC65/20: 0,14). Auch die renale Exkretion von Energie war abhängig von der Aufnahme an verdaulichem Protein und war zusätzlich abhängig von der renalen Stickstoff-Ausscheidung (in kJ/Ratte/d: Chow: 4,17; LC75/10: 1,39; LC65/20: 2,36). Im Urin war das Verhältnis von Energie zu Stickstoff bei der Gruppe LC75/10 fast doppelt so hoch wie bei allen anderen Gruppen (in kJ/g Stickstoff: LC75/10: 30,10; alle anderen Diäten: 13,72-17,75).

Der Proteingehalt des Körpers war bei Ratten der Chow-Gruppe am höchsten und signifikant am niedrigsten bei Ratten der Gruppe LC75/10 (in g/Ratte: Chow: 94; 75/10: 79). Die Ratten der Gruppe LC75/10 entwickelten Zeichen einer Proteinmangelernährung, wie ein reduziertes Wachstum, eine geringere Stickstoff-Bilanz, einen geringeren Proteingehalt des Körpers, einen erhöhten Fettgehalt des Körpers und der Leber und eine Hypoproteinämie. Diese Effekte wurden bei den Gruppen der nicht-ketogenen Diäten LC65/20 und LC55/30 nicht in diesem Maße beobachtet. Durch die dargestellten Ergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, dass eine ketogene LC-Diät für wachsende Ratten eine Proteinmangel-Diät ist, auch wenn Casein als sehr hochwertige Proteinquelle verwendet wird. Eine Erhöhung des Proteingehalts einer KD kann negative LC-Effekte, z.B. auf das Wachstum der Ratten zwar verbessern, allerdings kann so auch die Entstehung der Ketose bei den Ratten verhindert werden.

Im zweiten Versuch dieser Arbeit (Publikation 2) war die scheinbare Verdaulichkeit (sV) von Kalzium für alle Diäten mit hohem Fettgehalt (LCHF-Diäten und HFD) signifikant, um mindestens 30% im Vergleich zur Chow-Diät reduziert. Die fäkale Exkretion von Kalzium korrelierte positiv mit der fäkalen Ausscheidung von Fett ($r^2 = 0,68$; $p < 0,001$). Dieser Effekt basierte vermutlich auf der Bildung von Kalziumseifen.

Die sV von Phosphor war bei allen Diäten mit hohem Fettgehalt erhöht (Chow: 42,1%; Diäten mit hohem Fettgehalt: 58,7-79,5%).

Es ergab sich für alle Diäten mit hohem Fettgehalt ein geringeres Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium zu scheinbar verdaulichem Phosphor (Chow-Diät: 1,5; HFD: 0,7; LCHF-Diäten: 0,1-0,4). Die Höhe des PTH-Spiegels im Serum der Ratten war nicht von der Art der Diät abhängig.

Aufgrund der Ergebnisse konnte resümiert werden: Bei Diäten für Ratten mit hohem Fettgehalt muss bei der Verwendung von gesättigten, langkettigen Fettsäuren mit der Möglichkeit der Bildung von unlöslichen Kalziumseifen (wie bei Rindertalg) mit negativen Auswirkungen auf die Kalziumbilanz und das Verhältnis von scheinbar verdaulichem Kalzium zu scheinbar verdaulichem Phosphor gerechnet werden.

VII. SUMMARY

***Effect of low-carbohydrate diets
on nitrogen metabolism
and on the availability of calcium in rats***

In human medicine, low-carbohydrate (LC) diets are used for weight loss in obese humans. As a ketogenic diet (KD), low-carbohydrate, high-fat (LCHF) diets are used as a therapy for various indications such as epilepsy in children and pyruvate hydrogenase deficiency. To ensure a ketosis, LCHF diets must be very high in fat, very low in carbohydrate and also low in protein content. Studies have shown side effects of these ketogenic LCHF diets such as a negative influence on bone metabolism and reduction of growth in children with epilepsy and in rats.

The aim of this work was to differentiate effects of low-carbohydrate content, ketosis, low-protein content and high-fat content of LCHF diets on energy and nitrogen metabolism, body composition, and some blood values in rats. Additionally, differences in digestibility and balance of nutrients, minerals and trace elements of LCHF diets were investigated and compared to a chow diet and a standard high fat diet (HFD, high in fat and carbohydrates).

In the first trial (*publication 1*), 3 LC diets with different protein content were used, whereas the ratio of fat/protein of LC diets (in % DM, dry matter) was 75/10, 65/20, and 55/30 (diets LC75/10, LC65/20, LC55/30). For feed, feces, urine, bodies and livers of the rats, gross energy, nitrogen (Kjeldahl method) and crude fat were analyzed. Blood samples were tested for total plasma protein, albumin and triacylglycerol.

In the second trial (*publication 2*), 6 different LCHF diets and a HFD were examined and the ratio of fat/protein of LCHF diets was 75/10, 65/20, 60/25, 55/30, and 50/35 (diets LCHF 75/10 – LCHF 50/35). Serum PTH (parathyroid hormone) was measured by immunoassay.

For both trials, nutrient-to-energy ratio for minerals, trace elements and vitamins of all LCHF diets and the HFD diet were matched to the same ratio as in the chow diet. Diets were iso-energetically paired to the chow diet (pairfeeding based on metabolizable energy, ME). The only fat source of the LCHF diets and the HFD diet was tallow and the only protein source of all diets was sodium casein. Male Wistar rats aged 12 weeks at starting trials. After adaption of the rats to the respective diet, food intake was measured to a minimum of 5 consecutive days and during this time fecal and urine samples were collected daily.

The first trial of this work (*publication 1*) indicated a reduced body weight gain of rats in combination with higher fat content and lower protein content of the LC diets. The degree of reduction depended on the amount of digestible crude protein (daily weight gain was lowered to 50% in rats of the LC75/10 group and to 20% in rats of the LC55/30 group).

Renal nitrogen excretion was related to digestible protein intake (in g/rat/d: chow: 0,23; LC75/10: 0,05; LC65/20: 0,14). Renal energy excretion was also related to digestible protein intake and it was additionally associated with renal nitrogen excretion (in kJ/rat/d: chow: 4,17; LC75/10: 1,39; LC65/20: 2,36). Urine of rats of the LC75/10 group showed a nearly doubled ratio of energy-to-nitrogen compared to all other groups (in kJ/g nitrogen: LC75/10: 30,10; all other diets: 13,72-17,75).

Protein content of the bodies was highest in rats of the chow group and significantly lowest in rats of the LC75/10 group (in g/rat: chow: 94; 75/10: 79). Rats of the LC75/10 group showed signs of a protein malnutrition, such as reduced growth, reduced nitrogen balance, reduced body protein content, higher fat content of bodies and livers and hypoproteinemia. These effects were less marked in the groups of the non-ketogenic diets LC65/20 and LC55/30. Presented results led to the hypothesis, that a ketogenic LC diet for growing rats is a protein-deficient diet, even if high quality protein like casein is used as the protein source. If protein content of a ketogenic diet is increased, negative LC-effects (for example on growth of rats) indeed can be improved, but also development of the ketosis of rats can be inhibited.

In the second trial of this work (*publication 2*), apparent digestibility of calcium was reduced significantly, to a minimum of 30% in comparison to the chow diet, in all diets with a high fat content (LCHF diets and HFD). Fecal excretion of calcium was correlated positively with fecal fat excretion ($r^2 = 0,68$; $P < 0,001$). This effect might be based on the formation of calcium soaps.

Apparent digestibility of phosphorous was higher in all diets with a high fat content (chow: 42,1%; high-fat diets: 58,7-79,5%). A reduced ratio of apparently digested calcium to apparently digested phosphorous was shown for all diets with a high fat content (chow diet: 1,5; HFD: 0,7; LCHF diets: 0,1-0,4). Level of PTH in serum of rats was not affected by type of diet.

Due to this results it could be resumed: Using diets with a high fat content for rats in combination with highly saturated long-chain fatty acids with the possibility of the formation of calcium soaps (like tallow) as a fat source, one would expect negative effects on calcium balance and on the ratio of apparently digested calcium to apparently digested phosphorous.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Agnew, J.; Holdsworth, C., 1971: The effect of fat on calcium absorption from a mixed meal in normal subjects, patients with malabsorptive disease, and patients with a partial gastrectomy. *Gut*, 12(12):973-7.

Allred, J.B., 1969: Relationships between the concentration of liver metabolites and ketogenesis in chickens fed "carbohydrate-free" diets. *The Journal of nutrition*, 99(1):101-8.

Allred, J.B.; Roehrig, K.L., 1970: Hepatic gluconeogenesis and glycolysis in chickens fed "carbohydrate-free" diets. *Journal of Nutrition*, 100:615-22.

Anonymus, 2013: Endspurt Vorklinik. Physiologie 2. Die Skripten fürs Physikum. 2. Auflage. Thieme-Verlag: Stuttgart.

Appleton, G.; Owen, R.; Williamson, R., 1992: The effect of dietary calcium supplementation on intestinal lipid metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 42(3):383-7.

Atkins, R.C., 1972: *Dr. Atkins' Diet Revolution: The high calorie way to stay thin forever*. D. McKay Co: New York, NY, USA.

Atkins, R.C., 1998: *Dr. Atkins' New Diet Revolution*. Avon Books: New York, NY, USA.

Atteh, J.; Leeson, S., 1983: Effects of dietary fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chickens. *Poultry science*, 62(12):2412-9.

Atteh, J.; Leeson, S., 1984: Effects of dietary saturated or unsaturated fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chicks. *Poultry science*, 63(11):2252-60.

Atteh, J.; Leeson, S.; Julian, R., 1983: Effects of dietary levels and types of fat on performance and mineral metabolism of broiler chicks. *Poultry science*, 62(12):2403-11.

Axen, K.V.; Axen, K., 2006: Very low-carbohydrate versus isocaloric high-carbohydrate diet in dietary obese rats. *Obesity*, 14(8):1344-52.

Banting, W., 1863: *Letter on Corpulence, Addressed to the Public*. 2nd ed. Harisson and Sons: London, England.

Baumeister, F.A.; Klepper, J., 2012: *Ketogene Diät. Ernährung als Therapiestrategie bei*

Epilepsien und anderen Erkrankungen. Schattauer Verlag: Stuttgart.

Baumeister, F.A.; Liebhaber, G.M.; Riemann, E.; Gempel, K., 2003: Die ketogene Diät, Renaissance einer vergessenen Therapie: Grundlagen, Indikationen und Effektivität. *Kinder- und Jugendmedizin*, 3:76-86.

Bee, G.; Biolley, C.; Guex, G.; Herzog, W.; Lonergan, S.M.; Huff-Lonergan, E., 2006: Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *Journal of animal science*, 84(1):191-203.

Belo, P.S.; Romsos, D.R.; Leveille, G.A., 1976: Influence of diet on glucose tolerance, on the rate of glucose utilization and on gluconeogenic enzyme activities in the dog. *The Journal of nutrition*, 106(10):1465-74.

Bergqvist, A.C.; Schall, J.I.; Stallings, V.A.; Zemel, B.S., 2008: Progressive bone mineral content loss in children with intractable epilepsy treated with the ketogenic diet. *The American journal of clinical nutrition*, 88(6):1678-84.

Bielohuby, M.; Matsuura, M.; Herbach, N.; Kienzle, E.; Slawik M.; Hoeflich, A; Bidlingmaier, M., 2010: Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(2):275-84.

Bielohuby, M.; Menhofer, D.; Kirchner, H.; Stoehr, B.J.M.; Muller, T.D.; Stock, P.; Hempel, M.; Stemmer, K.; Pfluger, P.T.; Kienzle, E.; Christ, B.; Tschop, M.H.; Bidlingmaier, M., 2011b: Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1):E65-E76.

Bielohuby, M.; Sawitzky, M.; Stoehr, B.J.; Stock, P.; Menhofer, D.; Ebensing, S.; Bjerre, M.; Frystyk, J.; Binder, G.; Strasburger, C.; Wu, Z.; Christ, B.; Hoeflich, A.; Bidlingmaier, M., 2011a: Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats. *Endocrinology*, 152(5):1948-60.

Blaza, S.; Bolles, N.; Burger, I., editors, 1985: Is carbohydrate essential for lactation and pregnancy in dogs. *Proc., Waltham Symposium*, No. 7.

Blundell, J.E.; Green, S.; Burley, V., 1994: Carbohydrates and human appetite. *The American journal of clinical nutrition*, 59(3):728S-34S.

Bosworth, A.W.; Bowditch, H.I.; Giblin, L.A., 1918: Studies of infant feeding. x.: The digestion and absorption of fats. i. calcium in its relation to the absorption of fatty acids. *American Journal of Diseases of Children*, XV(6): p. 397-407.

Boyd, O.F.; Crum, C.L.; Lyman, J.F., 1932: The absorption of calcium soaps and the relation of dietary fat to calcium utilization in the white rat. *Journal of Biological Chemistry*, 95(1):29-41.

Bravata, D.M.; Sanders, L.; Huang, J.; Krumholz, H.M.; Olkin, I.; Gardner, C.D.; Bravata, D.M., 2003: Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 289(14):1837-50.

Calverley, C.E.; Kennedy, C., 1949: The effect of fat on calcium and phosphorus metabolism in normal growing rats under a normal dietary regime. *The Journal of nutrition*, 38(2):165-75.

Campbell, T.C., 2014: *The low-carb Fraud*. Auflage 1. Benbella Books: Dallas, USA.

Cappon, J.P.; Ipp, E.; Brasel, J.; Cooper, D., 1993: Acute effects of high fat and high glucose meals on the growth hormone response to exercise. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 76(6):1418-22.

Caton, S.J.; Yinglong, B.; Burget, L.; Spangler, L.J.; Tschöp, M.H.; Bidlingmaier M., 2009: Low-carbohydrate high-fat diets: Regulation of energy balance and body weight regain in rats. *Obesity*, 17(2):283-9.

Cheng A.L.; Morehouse, M.G.; Deuel H.J., 1949: The effect of the level of dietary calcium and magnesium on the digestibility of fatty acids, simple triglycerides, and some natural and hydrogenated fats. *The Journal of nutrition*, 37(2):237-50.

Crews, E.L. III.; Fuge, K.W.; Oscay, L.B.; Holloszy, J.O.; Shank, R.E., 1969: Weight, food intake, and body composition: effects of exercise and of protein deficiency. *American Journal of Physiology*, 216:359–63.

Cronheim, W.; Müller, E., 1908: Stoffwechselfersuche an gesunden und rachitischen Kindern mit besonderer Berücksichtigung des Mineralstoffwechsels. *Biochemische Zeitschrift*, 9. Jg., S. 76.

Dobenecker, B., 2002: Influence of calcium and phosphorus intake on the apparent digestibility of these minerals in growing dogs. *The Journal of nutrition*, 132(6):1665S-7S.

Dobenecker, B.; Frank, V.; Kienzle, E., 2010: High calcium intake differentially inhibits nutrient and energy digestibility in two different breeds of growing dogs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94(5):e109-e114.

Dobenecker, B.; Schmitt, S.; Mack, J.; Kienzle, E.; Alexander, L.; Morris, P., 2014: Regulation of intestinal calcium absorption appears to be different in dogs and man. *The FASEB Journal*, 28(1 Supplement):908.9.

Doyle, E., 2004: *Saturated Fat and Beef Fat as Related to Human Health*. FRI Briefings, Food Research Institute: University of Wisconsin-Madison, USA.

Eisenstein, A.B.; Strack, I.; Steiner, A., 1974: Increased hepatic gluconeogenesis without a rise of glucagon secretion in rats fed a high fat diet. *Diabetes*, 23(11):869-75.

Erlanson-Albertsson, C.; Mei, J., 2005: The effect of low carbohydrate on energy metabolism. *International Journal of Obesity*, 29:S26-S30.

Ewe K., 1974: Die intestinale Calcium-Resorption und ihre Störungen. *Klinische Wochenschrift*, 52(2):64-73.

Fan, Y.; Menon, R.K.; Cohen, P.; Hwang, D.; Clemens, T.; DiGirolamo, D.J.; Kopchick, J.J.; Le Roith, D.; Trucco, M.; Sperling, M.A., 2009: Liver-specific deletion of the growth hormone receptor reveals essential role of growth hormone signaling in hepatic lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 284(30):19937-44.

Fink, R.; Børsting, C.F.; Damgaard, B.M., 2002: Glucose homeostasis and regulation in lactating mink (*Mustela vison*): Effects of dietary protein, fat and carbohydrate supply. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 52(2):102-11.

Frank, V., 2008: Untersuchungen zur Energieverdaulichkeit und dem Energiebedarf wachsender Hunde in Abhängigkeit von Rasse und Calciumversorgung. Dissertation, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians Universität, München.

Freeman, J.M.; Vining, E.P.; Pillas, D.J.; Pyzik, P.L.; Casey, J.C., 1998: The efficacy of the ketogenic diet - 1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics*, 102(6):1358-63.

French CE., 1942: The interrelation of calcium and fat utilization in the growing albino rat. *Journal of Nutrition*, 23(4):375-84.

Gacs, G.; Barltrop, D., 1977: Significance of Ca-soap formation for calcium-absorption in rat. *Gut*, 18(1):64-8.

Garbow, J.R.; Doherty, J.M.; Schugar, R.C.; Travers, S.; Weber, M.L.; Wentz, A.E.; Ezenwajaku, N.; Cotter, D.G.; Brunt, E.M.; Crawford, P.A., 2011: Hepatic steatosis, inflammation, and ER stress in mice maintained long term on a very low-carbohydrate ketogenic diet. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*, 300(6):G956-67.

Givens, M.H., 1917: Studies in calcium and magnesium metabolism III. The effect of fat and fatty acid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 31(2): p. 441-444.

Goedegebuure, S.; Hazewinkel, H., 1986: Morphological findings in young dogs chronically fed a diet containing excess calcium. *Veterinary Pathology Online*, 23(5):594-605.

Goldberg, A., 1971: Carbohydrate metabolism in rats fed carbohydrate-free diets. *The Journal of nutrition*, 101(6):693-7.

Halbritter, R., 1971: Experimentelle Untersuchungen zur Lokalisation der enteralen Calciumresorption. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin einschließlich experimentelle Chirurgie*, 154(1):70-86.

Hallebeek J.; Hazewinkel H., 1997: Effect of isoenergetic substitution of dietary fat (beef tallow) for carbohydrates (wheat starch) on the calcium absorption in the dog. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 78(1-5):60-6.

Hammel, E.P.; Kronfeld, D.; Ganjam, V.; Dunlap, H., 1977: Metabolic responses to exhaustive exercise in racing sled dogs fed diets containing medium, low, or zero carbohydrate. *The American journal of clinical nutrition*, 30(3):409-18.

Hartsook, E.; Hershberger, T.; Nee, J., 1973: Effects of dietary protein content and ratio of fat to carbohydrate calories on energy metabolism and body composition of growing rats. *The Journal of nutrition*, 103(2):167-78.

Heaney R.P., Nordin B.E., 2002: Calcium effects on phosphorus absorption: implications for the prevention and co-therapy of osteoporosis. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(3):239-44.

Heimowitz, C., 2013: *The new Atkins meda easy*. 1st edition. Atkins Nutritionals: Touchdown, USA.

Heller, R.F.; Heller, R.F., 1993: *The carbohydrate addict's diet: The lifelong solution to Yo-Yo dieting*. New American Library: New York, NY, USA.

Hill, A.J.; Blundell, J.E., 1986: Macronutrients and satiety: the effects of a high-protein or high-carbohydrate meal on subjective motivation to eat and food preferences. *Nutrition and behavior (USA)*, 3: 133-44.

Hong, A.M.; Turner, Z.; Hamdy, R.F.; Kossoff, E.H., 2010: Infantile spasms treated with the ketogenic diet: Prospective single-center experience in 104 consecutive infants. *Epilepsia*, 51(8):1403-7.

Hou, J-H.; Zernicke, R.; Barnard, R., 1990: High fat-sucrose diet effects on femoral neck geometry and biomechanics. *Clinical Biomechanics*, 5(3):162-8.

Huttenlocher, P.R., 1976: Ketonemia and seizures: Metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatric research*, 10(5):536-40.

Hynd, A.; Rotter, D.L., 1930: Studies on the metabolism of animals on a carbohydrate-free diet: The distribution of glycogen and fat in the liver of animals fed on a carbohydrate-free diet. *Biochemical Journal*, 24(5): 1390.

Jenkins, K.; Phillips, P., 1960: The mineral requirements of the dog. 2. The relation of calcium, phosphorus and fat levels to minimal calcium and phosphorus requirements. *Journal of Nutrition*, 70:241-426.

Johnston, C.S.; Tjonn, S.L.; Swan, P.D.; White, A.; Hutchins, H.; Sears, B., 2006: Ketogenic low-carbohydrate diets have no metabolic advantage over nonketogenic low-carbohydrate diets. *The American journal of clinical nutrition*, 83(5):1055-61.

Johnstone, A.M.; Horgan, G.W.; Murison, S.D.; Bremner, D.M.; Lobley, G.E., 2008: Effects of a high-protein ketogenic diet on hunger, appetite, and weight loss in obese men feeding ad libitum. *The American journal of clinical nutrition*, 87(1):44-55.

Jornayvaz, F.R.; Jurczak, M.J.; Lee, H-Y.; Birkenfeld, A.L.; Frederick, D.W.; Zhang, D.; Zhang, X-M.; Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2010: A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299(5):E808-E15.

Kadzere, C.; Molnar, S., 1989: Untersuchungen zu Interaktionen zwischen Fetten und Calciumcarbonat bzw. Dicalciumphosphatzusatz bei Verabreichung lipidreicher Rationen an wachsende Schweine. *Lipid / Fett*, 91(4):135-48.

Kane G.; Lovelace, F.E.; McCay, C., 1949: Dietary fat and calcium wastage in old age. *Journal of gerontology*, 4(3):185-92.

Karbach U.; Rummel W., 1987a: Cellular and paracellular calcium transport in the rat ileum and the influence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 336(1):117-24.

Karbach U.; Rummel W., 1987b: Calcium transport across the colon ascendens and the influence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and dexamethasone. *European journal of clinical investigation*, 17(4):368-74.

Kaup, S.M.; Behling, A.R.; Choquette, L.; Greger, J.L., 1990: Calcium and magnesium utilization in rats: effect of dietary butterfat and calcium and of age. *The Journal of nutrition*, 120(3):266-73.

Kelly, O.; Cusack, S.; Jewell, C.; Cashman, K.D., 2003: The effect of polyunsaturated fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone metabolism and composition in young growing rats. *British Journal of Nutrition*, 90(4):743-50.

Kennedy, A.R.; Pissios, P.; Out, H.; Xue, B.; Asakura, K.; Furukawa, N.; Marino, F.E.; Liu, F.-F.; Kahn, B.B.; Libermann, T.A., 2007: A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292(6):E1724-E39.

Kessler, S.K.; Neal, E.G.; Camfield, C.S.; Kossoff, E.H., 2011: Dietary therapies for epilepsy: future research. *Epilepsy & Behavior*, 22:17-22.

Kienzle, E.; Dobenecker, B.; Wichert, B.; Schuster, S., 2006: Effect of fecal water and dry matter excretion on fecal mineral excretion in dogs studied in a fiber model. *The Journal of nutrition*, 136(7 Suppl):2001S-3S.

Kienzle, E.; Meyer, H.; Lohrie, H., 1985: Einfluß kohlenhydratfreier Rationen mit unterschiedlichen Protein/Energierelationen auf foetale Entwicklung und Vitalität von

Welpen sowie die Milchezusammensetzung von Hündinnen. Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung (Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition), Suppl. No. 16: 73-99.

Kienzle, E.; Schrag, I.; Butterwick, R.; Opitz, B., 2001: Calculation of gross energy in pet foods: new data on heat combustion and fibre analysis in a selection of foods for dogs and cats. Journal of animal physiology and animal nutrition, 85(5-6):148-57.

Kirchgeßner M., 2004: Tierernährung: Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis. DLG-Verlag: Frankfurt.

Kirsch, R.E.; Brock, J.F.; Saunders, S.J., 1968: Experimental protein-calorie malnutrition. The American journal of clinical nutrition, 21:820-6.

Klaus, S., 2005: Increasing the protein: carbohydrate ratio in a high-fat diet delays the development of adiposity and improves glucose homeostasis in mice. The Journal of nutrition, 135(8):1854-8.

Klepper, J.; Leiendecker, B., 2002: Ketogene Diät in der Behandlung therapieresistenter Epilepsien im Kindesalter. Neuropädiatrie in Klinik und Praxis, 29.

Klepper, J.; Scheffer, H.; Leiendecker, B.; Gertsen, E.; Binder, S.; Leferink, M.; Hertzberg, C.; Näke, A.; Voit, T.; Willemsen, M.A., 2005: Seizure control and acceptance of the ketogenic diet in GLUT1 deficiency syndrome: A 2- to 5-year follow-up of 15 children enrolled prospectively. Neuropediatrics, 36(05):302-8.

Konijn, A.; Muogbo, D.; Guggenheim, K., 1970: Metabolic effects of carbohydrate free diets. Israel journal of medical sciences, 6:498-505.

Kossoff, E.; Freeman, J.; Turner, Z.; Rubenstein, J., 2011: Ketogenic diets: Treatments for epilepsy and other disorders. demosHealth: New York, USA.

Kossoff, E.H.; Pyzik, P.L.; McGrogan, J.R.; Vining, E.P.; Freeman, J.M., 2002: Efficacy of the ketogenic diet for infantile spasms. Pediatric research, 51(4):460a-a.

Kosterlitz, H.W., 1947: The effects of changes in dietary protein on the composition and structure of the liver cell. The Journal of physiology, 106(2):194-210.

Krawitt, E. L.; Schedl, H. P., 1968: In vivo calcium transport by rat small intestine. The American journal of physiology, 214(2):232-236.

Kronfeld, D.; Hammel, E.; Ramberg, C.; Dunlap, H., 1977: Hematological and metabolic responses to training in racing sled dogs fed diets containing medium, low, or zero carbohydrate. The American journal of clinical nutrition, 30(3):419-30.

Kruger, M.C.; Horrobin, D.F., 1997: Calcium metabolism, osteoporosis and essential fatty acids: A review. Progress in lipid research, 36(2-3):131-51.

Lac, G.; Cavalie, H.; Ebal, E.; Michaux, O., 2008: Effects of a high fat diet on bone of

growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. *Lipids in health and disease*, 7:16.

Lauten, S.D.; Cox, N.R.; Brawner Jr., W.R.; Goodman, S.A.; Hathcock, J.T.; Montgomery, R.D.; Kincaid, S.A.; Morrison, N.E.; Spano, J.S.; Lepine, A.J., 2002: Influence of dietary calcium and phosphorus content in a fixed ratio on growth and development in Great Danes. *American journal of veterinary research*, 63(7):1036-47.

Laval-Jeantet, A.; Laval-Jeantet, M., 1976: [Lipid calcium interactions in experimental and human nutrition (author's transl.)]. *Pathologie-biologie*, 24(3):212-25.

Lefevre, F.; Aronson, N., 2000: Ketogenic diet for the treatment of refractory epilepsy in children: a systematic review of efficacy. *Pediatrics*, 105(4):e46-e.

Leheska, J.; Wulf, D.; Clapper, J.; Thaler, R.; Maddock, R., 2002: Effects of high-protein/low-carbohydrate swine diets during the final finishing phase on pork muscle quality. *Journal of animal science*, 80(1):137-42.

Li, K-C.; Zernicke, R.F.; Barnard, R.J.; Li, A.F., 1990: Effects of a high fat-sucrose diet on cortical bone morphology and biomechanics. *Calcified tissue international*, 47(5):308-13.

Li, P.; Yin, Y.L.; Li, D.; Kim, S.W.; Wu, G., 2007: Amino acids and immune function. *The British journal of nutrition*, 98(2):237-52.

Liu, C.H.; McCay, C., 1953: Studies of calcium metabolism in dogs. *Journal of gerontology*, 8(3):264-271.

Liu, Y-M.C.; Williams, S.; Basualdo-Hammond, C.; Stephens, D.; Curtis, R., 2003: A prospective study: Growth and nutritional status of children treated with the ketogenic diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(6):707-12.

Livingston, S.; Pruce, I.M.; Blumer, D., 1972: Comprehensive management of epilepsy in infancy, childhood and adolescence. Wiley Online Library: John Wiley & sons Inc.: Voorhees, New Jersey, USA.

Lloyd, L.E.; Crampton, E.W., 1957: The relation between certain characteristics of fats and oils and their apparent digestibility by young pigs, young guinea pigs and pups. *Journal of Animal Science*, 16(2):377-82.

Löffler, G.; Petrides, P.E.; Weiss, L.; Harper, H.A., 2013: *Physiologische Chemie: Lehrbuch der medizinischen Biochemie und Pathobiochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*. Springer: Berlin/Heidelberg.

Luque, R.M.; Kineman, R.D., 2006: Impact of obesity on the growth hormone axis: evidence for a direct inhibitory effect of hyperinsulinemia on pituitary function. *Endocrinology*, 147(6):2754-63.

Lutz, W., 1986: Die Lutz-Diät: kerngesund u. schlank endlich ohne zu hungern. Ariston-Verlag: Genf.

Ma, W.; Berg, J.; Yellen, G., 2007: Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening KATP channels. *The Journal of Neuroscience*, 27(14):3618-25.

Macri, E.V.; Gonzales Chaves, M.M.; Rodriguez, P.N.; Mandalunis, P.; Zeni, S.; Lifshitz, F.; Friedman, S.M., 2011: High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats. *European Journal of Nutrition*, 51:399–406.

McCargar, L.J.; Baracos, V.E.; Clandinin, M.T., 1989: Influence of dietary carbohydrate-to-fat ratio on whole body nitrogen retention and body composition in adult rats. *The Journal of nutrition*, 119(9):1240-5.

McClernon, F.J.; Yancy, W.S.; Eberstein, J.A.; Atkins, R.C.; Westman, E.C., 2007: The effects of a low-carbohydrate ketogenic diet and a low-fat diet on mood, hunger, and other self-reported symptoms. *Obesity*, 15(1):182-7.

Mejia-Naranjo, W.; Yakar, S.; Bernal, R.; LeRoith, D.; Sanchez-Gomez, M., 2003: Regulation of the splenic somatotrophic axis by dietary protein and insulin-like growth factor-I in the rat. *Growth hormone & IGF research*, 13(5):254-63.

Messmann, H., 2011: Klinische Gastroenterologie: Das Buch für Fort- und Weiterbildung plus DVD mit über 1.000 Befunden. Thieme-Verlag: Stuttgart.

Metges, C.C.; Lang, I.S.; Hennig, U.; Brüssow, K-P.; Kanitz, E.; Tuchscherer, M.; Schneider, F.; Weitzel, J.M.; Steinhoff-Ooster, A.; Sauerwein, H., 2012: Intrauterine growth retarded progeny of pregnant sows fed high protein: low carbohydrate diet is related to metabolic energy deficit. *PLoS (Public Library of Science) ONE*, 7(2):e31390.

Metzler-Zebeli, B.U.; Lang, I.S.; Görs, S.; Brüssow, K-P.; Hennig, U.; Nürnberg, G.; Rehfeldt, C.; Otten, W.; Metges, C.C., 2012: High-protein–low-carbohydrate diet during pregnancy alters maternal plasma amino acid concentration and placental amino acid extraction but not fetal plasma amino acids in pigs. *British Journal of Nutrition*, 108(12):2176-89.

Meyer, H.; Mundt, H., 1983: Untersuchungen zum Einsatz von Knochenschrot in Futtermitteln für Hunde. DTW Deutsche tierärztliche Wochenschrift.

Meyer, H.; Zentek, J., 2005: Ernährung des Hundes: Grundlagen-Fütterung-Diätetik; 20 Übersichten, 106 Tabellen. Thieme-Verlag: Stuttgart.

Mitchaothai, J.; Everts, H.; Yuangklang, C.; Wittayakun, S.; Vasupen, K.; Wongsuthavas, S.; Srenanul, P.; Hovenier, R.; Beynen, A.C., 2008: Digestion and deposition of individual fatty acids in growing-finishing pigs fed diets containing either beef tallow or sunflower oil. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 92(4):502-10.

Naismith, D.; Cursiter, M., editors, 1972: Is there a specific requirement for

carbohydrate in diet. Proceedings of the Nutrition Society, CAB International c/o publishing division: Wallingford, Oxon, England.

Neal, E.G.; Chaffe, H.M.; Edwards, N.; Lawson, M.S.; Schwartz, R.H.; Cross, J.H., 2008: Growth of children on classical and medium-chain triglyceride ketogenic diets. *Pediatrics*, 122(2):e334-e40.

Nordli, D.R.; De Vivo, D.C., 1997: The ketogenic diet revisited: Back to the future. *Epilepsia*, 38(7):743-9.

NRC, 1995: Nutrient requirements of laboratory animals. National Academy of Sciences, National Research Council: Washington D.C., USA.

NRC, 2006: Nutrient requirements of dogs and cats. Animal nutrition series, Nutrient Requirements of Domestic Animals, Committee on Animal Nutrition, Subcommittee on Dog and Cat Nutrition, National Research Council, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies, National Academies Press: Washington D.C., USA.

Owen, O.; Morgan, A.; Kemp, H.; Sullivan, J.; Herrera, M.; Cahill Jr., G., 1967: Brain metabolism during fasting. *Journal of Clinical Investigation*, 46(10):1589.

Paoli, A.; Rubini, A.; Volek, J.S.; Grimaldi, K.A., 2013: Beyond weight loss: a review of the therapeutic uses of very-low-carbohydrate (ketogenic) diets. *European journal of clinical nutrition*, 67(8):789-96.

Peachey, S.E.; Dawson, J.M.; Harper, E.J., 1999: The effect of aging on nutrient digestibility in cats fed beef tallow to, sunflower oil to or olive oil to enriched diets. *Growth, Development and Aging*, 63:49-58.

Penman, E.; Wass, J.; Medbak, S.; Morgan, L.; Lewis, J.; Besser, G.; Rees, L.H., 1981: Response of circulating immunoreactive somatostatin to nutritional stimuli in normal subjects. *Gastroenterology*, 81(4):692-9.

Petermann, M., 1931: Epilepsie bei Kindern. *Zeitschrift für Kinderheilkunde*, 51(4-5):506-18.

Pissios, P.; Hong, S.; Kennedy, A.R.; Prasad, D.; Liu, F.-F.; Maratos-Flier, E., 2013: Methionine and choline regulate the metabolic phenotype of a ketogenic diet. *Molecular Metabolism*, 2(3):306-13.

Porta, N.; Vallée, L.; Boutry, E.; Fontaine, M.; Dessein, A-F.; Joriot, S.; Cuisset, J-M.; Cuvellier, J-C.; Auvin, S., 2009: Comparison of seizure reduction and serum fatty acid levels after receiving the ketogenic and modified Atkins diet. *Seizure*, 18(5):359-64.

Prola, L.; Dobenecker, B.; Mussa, P.P.; Kienzle, E., 2010: Influence of cellulose fibre length on faecal quality, mineral excretion and nutrient digestibility in cat. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94(3):362-7.

Renner, R., 1964: Factors affecting the utilization of "carbohydrate-free" diets by the chick. I. Level of protein. *The Journal of nutrition*, 84:322-6.

Renner, R.; Elcombe, A., 1967: Metabolic effects of feeding "carbohydrate-free" diets to chicks. *The Journal of nutrition*, 93(1):31-6.

Resnick, S., 1978: Effect of age on survivability of pups eating a carbohydrate-free diet. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(2):145-8.

Riemann J.F.; Fischbach W.; Galle P.R.; Mössner J., 2007: *Gastroenterologie in Klinik und Praxis. Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis. 1.Auflage. Thieme-Verlag: Stuttgart.*

Ríos, V.G., 2001: Complications of treatment of epilepsy by a ketogenic diet. *Revista de neurologia*, 33(10):909-15.

Romsos, D.R.; Belo, P.S.; Bennink, M.R.; Bergen, W.G.; Leveille, G.A., 1976: Effects of dietary carbohydrate, fat and protein on growth, body composition and blood metabolite levels in the dog. *The Journal of nutrition*, 106(10):1452-64.

Romsos, D.R.; Palmer, H.J.; Muiruri, K.L.; Bennink, M.R., 1981: Influence of a low carbohydrate diet on performance of pregnant and lactating dogs. *The Journal of nutrition*, 111(4):678-89.

Ross, R., 2000: GH, IGF-I and binding proteins in altered nutritional states. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24:S92-5.

Rothberg O., 1907: *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung. Bd. 66, p. 69.* Verlag S. Karger: Leipzig.

Ruskin, D.N.; Kawamura Jr., M.; Masino, S.A., 2009: Reduced pain and inflammation in juvenile and adult rats fed a ketogenic diet. *PLoS (Public Librray of Science) ONE*, 4(12):e8349.

Salem, G.J.; Zernicke, R.F.; Barnard, R.J., 1992: Diet-related changes in mechanical properties of rat vertebrae. *The American journal of physiology*, 262(2 Pt 2):R318-R21.

Schachter D.; Dowdle E.B.; Schenker H., 1960: Active transport of calcium by the small intestine of the rat. *The American journal of physiology*, 198:263-8.

Schmid, H.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H., 1984: Reduced lipogenesis in rats fed a high-protein carbohydrate-free diet. *Metabolism: clinical and experimental*, 33(3):219-23.

Schoenmakers, I.; Hazewinkel, H.; Voorhout, G.; Carlson, C.; Richardson, D., 2000: Effects of diets with different calcium and phosphorus contents on the skeletal development and blood chemistry of growing great danes. *The Veterinary Record*, 147(23):652-60.

Sears, B.; Lawren, B., 1995: Enter the zone. A dietary road map to lose weight permanently, reset your genetic code, prevent disease, achieve maximum physical performance. HarperCollins: New York, NY, USA.

Sharp, P.E.; Villano, J.S., 2012: The laboratory rat. Taylor & Francis Group: New York, NY, USA.

Stafstrom, C.E.; Rho, J.M., 2012: The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders. *Frontiers in pharmacology*, 3:59.

Steggerda, F.; Mitchell, H., 1951: The calcium balance of adult human subjects on high- and low-fat (butter) diets. *The Journal of Nutrition*, 45(2):201-11.

Steinitz, F., 1903: *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung*. Bd. 57. Verlag von S. Karger: Berlin.

Stewart, C.; Rotwein, P., 1996: Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiological reviews*, 76(4):1005-26.

Tadayyon, B.; Lutwak, L., 1969: Interrelationship of triglycerides with calcium, magnesium and phosphorus in the rat. *The Journal of nutrition*, 97(2):246-54.

Taylor, S.A.; Shrader, R.E.; Koski, K.G.; Zeman, F.J., 1983: Maternal and embryonic response to a "carbohydrate-free" diet fed to rats. *The Journal of nutrition*, 113(2):253-67.

Telfer S.V., 1921: The influence of free fatty acids in the intestinal contents on the excretion of calcium and phosphorus. *The Biochemical journal*, 15(3):347-54.

van Dokkum, W.; Cloughley, F.A.; Hulshof, K.F.; Oosterveen, L.A., 1983: Effect of variations in fat and linoleic acid intake on the calcium, magnesium and iron balance of young men. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 27(5):361-9.

van Vught, A.J.; Nieuwenhuizen, A.G.; Brummer, R.-J.M.; Westerterp-Plantenga, M.S., 2008: Somatotropic responses to soy protein alone and as part of a meal. *European Journal of Endocrinology*, 159(1):15-8.

Vining, E.P.; Freeman, J.M.; Ballaban-Gil, K.; Camfield, C.S.; Camfield, P.R.; Holmes, G.L.; Shinnar, S.; Shuman, R.; Trevathan, E.; Wheless, J.W., 1998: A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Archives of neurology*, 55(11):1433-7.

Vining, E.P.G.; Pyzik, P.; McGrogan, J.; Hladky, H.; Anand, A.; Kriegler, S.; Freeman, J.M., 2002: Growth of children on the ketogenic diet. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 44(12):796-802.

Volek, J.S.; Sharman, M.J.; Love, D.M.; Avery, N.G.; Scheett, T.P.; Kraemer, W.J., 2002: Body composition and hormonal responses to a carbohydrate-restricted diet.

Metabolism: clinical and experimental, 51(7):864-70.

Volek, J.S.; Westman, E.C., 2002: Very-low-carbohydrate weight-loss diets revisited. Cleveland Clinic journal of medicine, 69(11):849.

Webster, G.T., 1942: Cirrhosis of the liver among rats receiving diets poor in protein and rich in fat. The Journal of clinical investigation, 21(4):385-92.

Westerterp, K.R.; Wilson, S.A.; Rolland, V., 1999: Diet induced thermogenesis measured over 24h in a respiration chamber: effect of diet composition. International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity, 23(3):287-92.

Wexler, I.D.; Hemalatha, S.G.; McConnell, J.; Buist, N.R.M.; Dahl, H-H.M.; Berry, S.A.; Cederbaum, S. D.; Patel, M. S.; Kerr, D. S., 1997: Outcome of pyruvate dehydrogenase deficiency treated with ketogenic diets: Studies in patients with identical mutations. Neurology, 49(6):1655-61.

Wilder, R., editor, 1921: The effects of ketonemia on the course of epilepsy. Mayo Clin Proc.

Williams, E.A.; Perkins, S.N.; Smith, N.C.; Hursting, S.D.; Lane, M.A., 2007: Carbohydrate versus energy restriction: effects on weight loss, body composition and metabolism. Annals of Nutrition and Metabolism, 51(3):232-43.

Williams, J.; Hurlbaeus, A.J., 1965: Response of the liver to prolonged protein depletion V. neutral glycerides and cholesterol; production of fatty livers by certain amino acids fed in a protein-free ration. The Journal of nutrition, 85(1):73-81.

Wohl, G.R.; Loehrke, L.; Watkins, B.A.; Zernicke, R.F., 1998: Effects of high-fat diet on mature bone mineral content, structure, and mechanical properties. Calcified tissue international, 63(1):74-9.

Zernicke, R.F.; Salem, G.J.; Barnard, R.J.; Schramm, E., 1995: Long-term, high-fat-sucrose diet alters rat femoral neck and vertebral morphology, bone mineral content, and mechanical properties. Bone, 16(1):25-31.

Zhou, W.; Mukherjee, P.; Kiebish, M.A.; Markis, W.T.; Mantis, J.G.; Seyfried, T.N., 2007: The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer. Nutrition and metabolism, 4:5.

Zur, B., 2005: Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse. Medizinische Dissertation, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

IX. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ellen Kienzle für Ihre intensive wissenschaftliche Betreuung der Versuche, der Publikationen und dieser Arbeit. Ich bedanke mich sehr für Ihre hilfsbereite Unterstützung, Ihre Geduld! und Ihr Engagement und natürlich für die Überlassung dieses interessanten Themas. Ich danke Ihnen auch sehr für die Präsentation unseres Posters!

Ich danke Dr. med. Martin Bidlingmaier und PD Dr. med. vet. Dr. habil. med. Maximilian Bielohuby sehr herzlich für die fachliche und praktische Betreuung der Versuche, die geduldige Erörterung wissenschaftlicher Fragestellungen und den immer sehr guten Input zu den gemeinsamen Publikationen. Ich bedanke mich auch sehr, dass ich die Möglichkeit hatte, im Rahmen eines Labmeetings unsere Ergebnisse zu präsentieren. Meinen Promotionskollegen Barbara Stoehr und Dominik Menhofer danke ich für die immer schöne und sehr entspannte Zusammenarbeit und die gegenseitige Hilfe während der Versuche. Ich bedanke mich auch sehr beim gesamten Team des Endokrinologischen Labors/AG Bidlingmaier, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität der LMU München für die Betreuung der Tiere, die Unterstützung bei der Sektion und bei der Analyse der Blutproben.

Ich danke dem Team vom OWF, v.a. Frau Gabi Reder, für die Hilfe bei der Vorbereitung der Proben zur Analytik. Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierernährung und Diätetik in Oberschleißheim, v.a. Herrn Christian Overdiek, danke ich sehr für die freundliche und geduldige Einarbeitung und die Unterstützung bei der Analytik der Proben in einem immer tollen Arbeitsklima!

Meinen Eltern und Großeltern danke ich, dass sie mir mein Studium und die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht haben. Meiner Schwester Hanna danke ich für ihr stets offenes Ohr - Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Meinen Schwiegereltern danke ich für Ihre Unterstützung und das bereitwillige Korrekturlesen dieser Arbeit. Meiner Schwägerin Saskia danke ich für gute Ideen und die Hilfe beim Übersetzen.

Malte, du bist das Beste was mir in meinem Leben passieren konnte, danke, dass du mir jederzeit den Rücken freigehalten und gestärkt hast!

Das Team der Praxis Dr. Schork in Wallhausen hat die Fertigstellung meiner Arbeit sehr unterstützt, vielen Dank euch allen! Danke Yvonne, dass du mir Notdienste abgenommen und mir so wertvolle Zeit in der finalen Phase dieser Arbeit geschenkt hast!

An dieser Stelle soll auch Platz sein, einem besonderen Weggefährten zu danken. Er ist für mich seit fast 20 Jahren wie ein Spiegel und hat mich immer wieder auf neue, interessante Wege geführt. Danke, Farinelli.