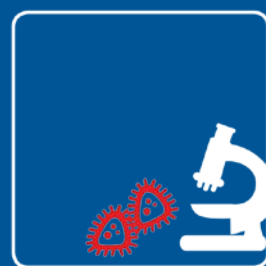


SLUTRAPPORT

NR. 2014-124

# Pro- og præbiotika, mikrobiota og livsstilssygdomme



# Pro- og præbiotika, mikrobiota og livsstilssygdomme (afsluttende rapport)

Projektperiode: 09/2011 – 12/2013

**Projektleder:** Lesli Hingstrup Larsen, Institut for Idræt og Ernæring (NEXS), Københavns Universitet, Rolighedsvej 26, 1958 Frederiksberg C, 35 33 36 32, [lehla@nexs.ku.dk](mailto:lehla@nexs.ku.dk)

**Øvrige medarbejdere:** Lena Kirchner Brahe, Institut for Idræt og Ernæring (NEXS), 35 33 25 06, [lekila@nexs.ku.dk](mailto:lekila@nexs.ku.dk) og Arne Astrup, Institut for Idræt og Ernæring (NEXS), 35 33 24 76, [ast@nexs.ku.dk](mailto:ast@nexs.ku.dk)

**Finansieringskilder:** Lundbeck Foundation Centre for Applied Medical Genomics in Personalized Disease Prediction, Prevention and Care (kr. 2.599.451), Mejeribrugets Forskningsfond (kr. 1.480.770), Arla Foods a.m.b.a (kr. 450.000) og NEXS, Københavns Universitet (kr. 1.542.000).

## Sammendrag

I de senere år er der blevet spekuleret i om de billioner af bakterier, der lever i vores tarmssystem (mikrobiota), er involveret i udviklingen af livsstilssygdomme, og om det er muligt at forebygge udviklingen af sådanne sygdomme ved at ændre på sammensætningen af mikrobiotaen.

Det primære formål med dette forskningsprojekt var at identificere tarmbakterier, der var associeret med risikomarkører for livsstilssygdomme samt at undersøge om indtag af kostkomponenter, der ændrede på den relative koncentration af tarmbakterierne, kunne forbedre helbredet hos svært overvægtige.

Med henblik på dette udførte vi et kostforsøg i 58 svært overvægtige kvinder, hvor vi både søgte efter tarmbakterier, der var associeret med markører for insulinresistens, inflammation og lipidmetabolisme, og undersøgte om indtag af probiotika (*Lactobacillus paracasei* F19) eller kostfibre fra hørfrø kunne ændre på forekomsten af tarmbakterier og derigennem sænke risikoen for livsstilssygdomme.

Vi opdagede flere tarmbakterier, der var associeret med risikomarkører, også efter der var taget højde for faktorer, som kunne være ansvarlig for årsagsforveksling såsom habituel diætindtag. Derudover viste vi at indtag af kostfibre fra hørfrø ændrede forekomsten af bakterier i tarmen og forbedrede insulinfølsomhed i svært overvægtige. Vi kunne dog ikke påvise at ændringen i tarmbakterierne var årsagen til den forbedrede insulinfølsomhed.

Projektets resultater understøtter således en forbindelse mellem tarmens mikrobiota og risiko for livsstilssygdomme i mennesker, men det kan ikke påvises at diæt-modulering af mikrobiotaen kan forbedre metabolisk sundhed på baggrund af resultaterne fra dette projekt.

## Abstract

Recently, it has been hypothesized that the microbes within our gut (microbiota) is implicated in the pathogenesis of obesity and that the gut microbes might constitute a target for prevention of obesity-related diseases.

The primary aim of this project was to identify gut microbes associated with metabolic risk markers in obesity and to explore if food components that modulate the gut microbiota can improve host health.

To accomplish this a clinical trial was conducted in 58 obese women to identify gut bacteria that were associated with insulin resistance, lipid metabolism and inflammation and to explore the effect on these metabolic markers following intake of the probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 or flaxseed mucilage.

We found that several gut bacteria are linked to metabolic risk markers in obesity also after adjustment for potential confounders, such as long term diet composition. In addition, we showed that intake of flaxseed mucilage changes the abundance of gut bacteria and improves insulin sensitivity. However, the improved insulin sensitivity did not appear to be mediated by the gut bacteria.

In summary, our results support a link between the gut microbiota and metabolic disturbances in obesity but do not provide evidence to claim that diet-induced modulation of the gut microbiota can improve host metabolic health.

## Baggrund og mål

I de senere år er der blevet spekuleret i om de billioner af bakterier, der lever i vores tarmsystem (tarm mikrobiotaen), er involveret i udviklingen af overvægt og overvægtsrelaterede metaboliske forstyrrelser såsom metabolisk syndrom og type 2 diabetes, samt om det er muligt at forebygge udviklingen af sådanne sygdomme ved at ændre på den relative koncentration af specifikke bakterier i tarmen. En måde at inducere en målrettet ændring af mikrobiota sammensætningen er indtag af probiotika eller præbiotika.

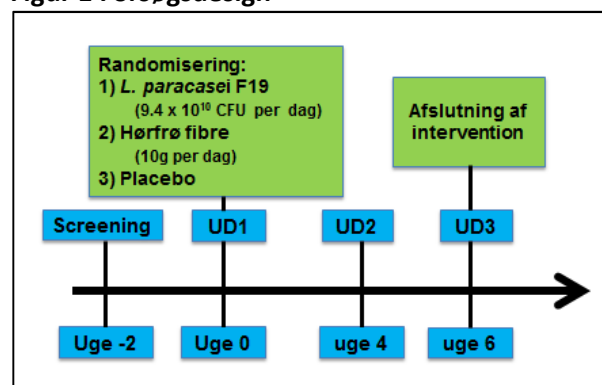
Formålet med dette forsøg var at identificere tarmbakterier, der var associeret med metaboliske risikomarkører, samt at undersøge om indtag af kostkomponenter, der ændrede på den relative koncentration af bakterierne i tarmen, kunne forbedre helbredet hos svært overvægtige.

## Metode

I forsøget blev 58 svært overvægtige post-menopausale kvinder randomiseret til 6 ugers dagligt indtag af enten 1) probiotika (*Lactobacillus paracasei* F19) i pulverform, 2) hørfrø fibre indbagt i brød eller 3) placebo. Forsøgspersonerne var ikke informeret om hvilken gruppe de var allokeret til, og der var placebo produkter der modsvarede de aktive produkter.

Før (UD1), under (UD2) og efter interventionen (UD3) blev der indsamlet afføringsprøver og blodprøver, der blev udført en sukkerbelastningstest (OGTT) samt målt kropssammensætning (DEXA, antropometri) (Figur 1). Hensigten med dataindsamlingen var at vurdere effekten af diætinterventionerne på tarmmikrobiotaen (metagenomics) samt om eventuelle ændringer i tarmmikrobiotaen medierede ændringer i markører for insulinfølsomhed, lipidmetabolisme eller inflammation.

Figur 1 Forsøgsdesign

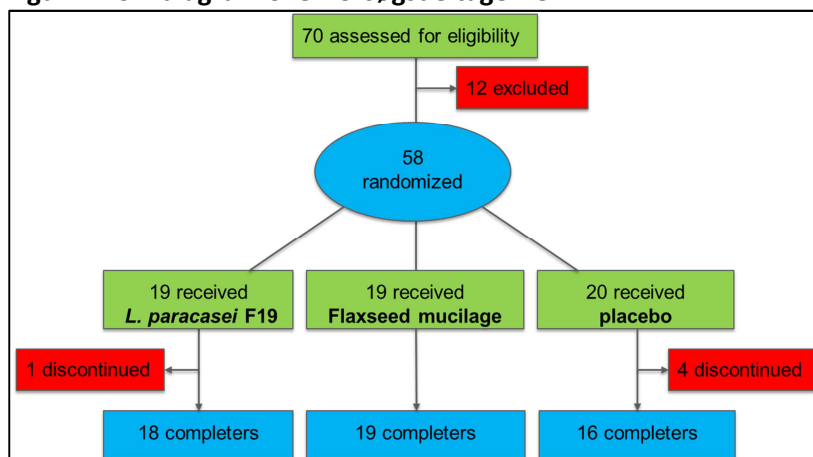


UD, undersøgelsesdag

## Resultater

Af de 58 deltagere der blev randomiseret til interventionen gennemførte 53 hele forsøget (Figur 2). Forsøgspersonerne var kvinder omkring 60 år med et BMI på cirka 35 kg/m<sup>2</sup> (Tabel 1).

Figur 2 Flow diagram over forsøgsdeltagerne



Tabel 1 Baseline karakteristika for forsøgsdeltagerne

	<i>L. paracasei</i> F19 (n = 19)	Hørfre fibre (n = 19)	Placebo (n = 20)
Alder (y)	61 (7)	61 (6)	58 (5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	34.2 (3.1)	35.2 (4.5)	34.3 (3.8)
Talje omfang (cm)	104.7 (6.8)	103.6 (9.2)	104.2 (11.0)
Kropsfedt %	46.7 (4.1)	48.0 (3.3)	46.8 (3.6)
Fastende plasma glukose (mmol/l)	5.9 (0.8)	5.8 (0.9)	5.8 (0.8)
Fastende serum insulin (pmol/l)	113.3 (55.1)	71.1 (32.1)	89.4 (55.8)
Fastende serum C-peptid (pmol/l)	957.9 (343.7)	712.7 (185.3)	816.1 (384.7)
AUC glukose (mmol/l/ min)	7.6 (1.7)	7.0 (1.7)	6.8 (0.9)
AUC insulin (pmol/l/min)	475.7 (211.8)	331.2 (154.0)	420.1 (303.1)
AUC C-peptid (pmol/l/min)	3056.1 (966.2)	2466.4 (753.8)	2714.0 (1204.4)
HOMA-IR	5.1 (2.9)	3.2 (1.8)	3.9 (2.6)
Matsudas index	1.8 (1.0)	2.8 (1.7)	2.7 (1.9)
Serum total kolesterol (mmol/l)	6.1 (1.1)	6.4 (0.9)	5.8 (0.7)
Serum HDL kolesterol (mmol/l)	1.5 (0.3)	1.4 (0.2)	1.6 (0.4)
Serum LDL kolesterol (mmol/l)	3.7 (0.8)	4.1 (0.8)	3.4 (0.7)
Serum triglycerid (mmol/l)	1.7 (0.8)	1.5 (0.8)	1.1 (0.3)
Plasma hsCRP (mg/l)	2.9 (3.8)	3.7 (3.7)	4.1 (2.9)
Plasma LBP (µg/L)	18.7 (5.9)	19.6 (7.2)	18.5 (7.6)

BMI, body mass index; AUC, area under the curve; HOMA-IR, homeostatic model assessment insulin resistance; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; LBP, lipopolysaccharide-binding protein.

Der var ingen effekt på metaboliske risikomarkører efter seks ugers indtag af *L. paracasei* F19, men indtag af højrfrø fibre forbedrede insulin følsomhed og inducerede systematiske ændringer i tarm mikrobiotaen i sammenligning med placebo interventionen (Tabel 2).

**Tabel 2 Ændringer i risikomarkører under interventionen**

Tabel 2 Resultater	<i>L. paracasei</i> F19 (n = 18)	Højrfrø fibre (n = 19)	Placebo (n = 16)	P
Fastende plasma glukose (mmol/l)	5.8 (0.2)	5.7 (0.2)	5.6 (0.1)	
Δ glucose	-0.2 (0.1)	-0.1 (0.1)	-0.3 (0.1)	0.524
Fastende serum insulin (pmol/l)	114.1 (13.0)	71.6 (7.8)	104.2 (11.8)	
Δ insulin	-0.7 (5.7)	0.5 (4.7)	9.1 (6.8)	0.166
Fastende serum C-peptid (pmol/l)	970.1 (90.5)	699.1 (51.4)	916.9 (83.1)	
Δ C-peptid	4.9 (37.0)	-13.7 (33.3)	57.7 (53.3)	0.258
AUC glukose (mmol/l/ min)	7.49 (0.4)	6.91 (0.4)	7.00 (0.3)	
Δ AUC glukose	-0.04 (0.17)	-0.2 (0.15)	0.1 (0.16)	0.523
AUC insulin (pmol/l/min)	503.6 (51.8)	297.0 (32.0)	480.9 (71.1)	
Δ AUC insulin	<b>27.0 (29.0)</b>	<b>-43.9 (18.8)</b>	<b>39.0 (27.3)</b>	<b>0.001</b>
AUC C-peptid (pmol/l/min)	3175.3 (252.1)	2204.0 (131.7)	2866.4 (282.9)	
Δ AUC C-peptid	<b>110.3 (127.4)</b>	<b>-297.3 (93.3)</b>	<b>100.5 (116.2)</b>	<b>0.001</b>
HOMA-IR	5.1 (0.7)	3.1 (0.4)	4.0 (0.7)	
Δ HOMA-IR	-0.1 (0.1)	-0.1 (0.1)	-0.3 (0.1)	0.296
Matsudas index	1.8 (0.2)	3.1 (0.4)	2.2 (0.4)	
Δ Matsudas index	<b>0.02 (0.1)</b>	<b>0.3 (0.2)</b>	<b>-0.4 (0.3)</b>	<b>0.048</b>
Serum total kolesterol (mmol/l)	6.2 (0.3)	5.9 (0.2)	5.7 (0.2)	
Δ total kolesterol	0.1 (0.2)	-0.5 (0.1)	-0.1 (0.1)	0.154
Serum HDL kolesterol (mmol/l)	1.45 (0.06)	1.34 (0.05)	1.54 (0.09)	
Δ HDL kolesterol	-0.01 (0.04)	-0.06 (0.04)	0.01 (0.04)	0.150
Serum LDL kolesterol (mmol/l)	3.8 (0.2)	3.7 (0.2)	3.5 (0.2)	
Δ LDL kolesterol	<b>0.1 (0.2)</b>	<b>-0.4 (0.1)</b>	<b>-0.1 (0.1)</b>	<b>0.068<sup>a</sup></b>
Serum triglycerid (mmol/l)	2.0 (0.2)	1.5 (0.1)	1.2 (0.1)	
Δ triglyceride	0.2 (0.1)	-0.03 (0.1)	0.1 (0.1)	0.205
Plasma hsCRP (mg/l)	3.4 (1.0)	2.7 (0.8)	2.9 (0.7)	
Δ hsCRP	<b>0.4 (0.3)</b>	<b>-0.9 (0.2)</b>	<b>-1.3 (0.5)</b>	<b>0.036<sup>a</sup></b>
Plasma LBP (μg/L)	19.7 (1.5)	18.1 (1.5)	16.3 (1.5)	
Δ LBP	0.6 (0.8)	-1.5 (0.8)	-1.9 (0.9)	0.221

Data er præsenteret som middelværdi (SE). P-værdier er fra lineære regressionsanalyser af effekten af diætgruppe på den specifikke parameter ved justering for effekt af relevante co-variate såsom baseline værdier. Δ angiver ændringer efter de 6 ugers intervention (ujusterede værdier). <sup>a)</sup> Indikerer at det er forskellen mellem F19 og højrfrø fiber gruppen der er signifikant forskellig, men ikke når de sammenlignes med placebo gruppen. BMI, body mass index; AUC, area under the curve; HOMA-IR, homeostatic model assessment insulin resistance; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; LBP, lipopolysaccharide-binding protein.

For at undersøge om ændringerne i mikrobiotaen medierede ændringerne i insulinfølsomhed blev de relative ændringer i koncentrationen af tarmbakterier inddraget i statistiske regressionsanalyser, der undersøgte effekten af diætintervention på markører for insulinfølsomhed. Af disse analyser fremgik det at ændringerne i mikrobiotaen ikke var forbundet med den forbedrede insulin følsomhed. Disse resultater præsenteres i artiklen: Dietary intervention modulates the gut microbiota and improves insulin resistance - a randomized controlled trial in obese postmenopausal women (se venligst publikationer og offentliggørelser).

Der blev desuden identificeret flere bakterier der var både positivt og negativt associeret med markører for insulinfølsomhed, dyslipidæmi og inflammation ved baseline, også efter justering for diætindtag, alder og fedtprocent. Disse resultater offentliggøres i en artikel med titlen Gut bacteria are associated with metabolic markers in obesity (se venligst publikationer og offentliggørelser).

### **Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribruget**

Resultaterne understøtter at der er en sammenhæng mellem specifikke tarmbakterier og metaboliske risikomarkører hos mennesker med svær overvægt og identificerer flere nye bakterier, der ikke tidligere har været associeret med metaboliske markører. Desuden identificeres sammenhænge mellem indtag af specifikke næringsstoffer og relativ koncentration af specifikke gavnlige bakterier i tarmen. Denne viden kan anvendes til at designe nye diætinterventioner, der kombinerer indtag af potentielt probiotiske bakterier og indtag af specifikke næringsstoffer, som en strategi til at forebygge fedme-relateret metabolisk sygdom. Resultaterne understøtter ikke en gavnlige effekt af *Lactobacillus Paracasei* F19 på metaboliske risikomarkører ved fedme i denne form, population eller tidperiode.

### **Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter**

Undersøgelser af kostens betydning for tarm-mikrobiomet er undersøgt i dette og andre studier, men der er stadig mange ubesvarede spørgsmål i forhold til specifikke kostkomponenter og til hvilke specifikke bakterier og genfunktioner er påvirket. LuCAMP projektet har givet et lille indblik i betydningen af nogle kostkomponenter i forhold til både kortevarige kostændringer samt habituelt kostindtag. Baseret på disse undersøgelser er det indgået et samarbejde med Karsten Kristiansen og Pia Kiilerich på biologisk institut, som er samarbejdspartnere på LuCAMP projekter, men også MEPEB og FIAF projekterne støttet af MFF, for at lave en undersøgelse af mikrobiomet fra alle disse forsøg i forhold til specifikke diætkomponenter ud fra detaljerede kostregistreringer. En ansøgning om post doc midler til at lave disse analyser er netop indsendt til Lundbeckfonden.

### **Publikationer og offentliggørelser**

#### **Artikler**

Lena K. Brahe, Emmanuelle Le Chatelier, Edi Prifti, Nicolas Pons, Sean Kennedy, Torben Hansen, Oluf Pedersen, Arne Astrup, S. Dusko Ehrlich and Lesli H. Larsen. Gut bacteria are associated with metabolic markers in obesity (under udarbejdelse)

Lena K. Brahe, Emmanuelle Le Chatelier, Edi Prifti, Nicolas Pons, Sean Kennedy, Trine Blædel, Janet Håkansson, Trine K. Dalsgaard, Torben Hansen, Oluf Pedersen, Arne Astrup, S. Dusko Ehrlich and Lesli H. Larsen. Dietary intervention modulates the gut microbiota and improves insulin resistance - a randomized controlled trial in obese postmenopausal women (under udarbejdelse)

Lena K. Brahe, Arne Astrup and Lesli H. Larsen. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? Obesity Reviews 2013; 14: 950-959 (elektronisk udgave vedlagt)

Lena K. Brahe og Lesli H. Larsen: Kan en sund tarmflora forebygge livsstilssygdomme? Mælkeritidende 2012;25/26: 8-9

### **Indlæg ved internationale konferencer**

Exploring Human Host-Microbiome Interactions in Health and Disease; Cambridge 2014:

Dietary Modulation of the Obese Microbiota (oral præsentation)

Gut bacteria are associated with metabolic markers in obesity (poster præsentation)

International Congress on Obesity; Kuala Lumpur 2014:

Dietary intervention modulates the gut microbiota and improves insulin resistance (poster præsentation)

Fasting Induced Adipose Factor (FIAF) concentration is positively correlated with weight and lipid oxidation in overweight and obese individuals (poster præsentation)

### **Studenteropgaver**

Specialeprojekt: *Angiopoietin-like protein 4 and soluble CD14 – Quantification of plasma concentrations and their association with dyslipidemia, obesity, increased inflammatory tone and high blood pressure in a cohort of obese postmenopausal women.* Carrie Klestrup Rasmussen, Human Ernæring, Københavns Universitet.

Bachelorprojekt: *Kan hørfrøfibre forbedre insulinsensitiviteten?* Sabrina Mai Nielsen, det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

### **Redegørelse for forskeruddannelse**

Lena Kirchner Brahe har baseret sin ph.d. uddannelse og afhandling på dette projekt. Afhandlingen med titlen: *Obesity-related diseases – dietary modulation of the gut microbiota*, er blevet forhåndsgodkendt og er indstillet til offentligt forsvar på det Natur- og Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet den 4. juni 2014.

### **Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt**

Professor Oluf B. Pedersen og Professor Torben Hansen fra forskningssamarbejdet LuCAMP : Lundbeck Foundation Centre for Applied Medical Genomics in Personalized Disease Prediction, Prevention and Care ([www.lucamp.org](http://www.lucamp.org)).

Professor S. Dusko Ehrlich og hans medarbejdere Emmanuelle Le Chatelier, Edi Prifti, Nicolas Pons og Sean Kennedy fra Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA), US 1367 Metagenopolis, Jouy-en-Josas, Frankrig.

Janet Håkansson fra ARLAs Strategiske Innovationscenter, Stockholm, Sverige.

Lektor Trine Kastrup Dalsgaard, Institut for Fødevarer, Århus Universitet