

Afslutningsrapport

Har mælkefedt en forebyggende effekt på diabetes type 2
og andre velfærdssygdomme?

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2007-87

Marts 2007



mejeriforeningen

danish dairy board

Har mælkefedt en forebyggende effekt på diabetes type 2 og andre velfærdssygdomme?

2002 – 2006
Afslutningsrapport

Projektkoordinator:

Lektor Tine Tholstrup, Institut for Human Ernæring, KVL

Projektdeltagere:

Lektor Lars Hellgren, BioCentrum-DTU, Biokemi og Ernæring, DTU

Lektor Susanne Mandrup, Institut for Biokemi og Molekylær Biologi, SDU

Adjunkt Ellen Marie Straarup, BioCentrum-DTU, Biokemi og Ernæring, DTU (stoppet forår 2005)

Civilingeniør Pia Lund, BioCentrum-DTU, Biokemi og Ernæring, DTU

Ph.d.-studerende Maria Boysen Sandberg, Institut for Biokemi og Molekylær Biologi, SDU

Forskningsassistent Marianne Raff, Institut for Human Ernæring, KU

Finansiering:

Mejeriernes ForskningsFond og Direktoratet for FødevarerErhverv

Sammendrag:

Dette projekt undersøgte, hvorvidt to isomerer af konjugeret linolsyre (CLA) kunne reducere risikoen for at udvikle diabetes type 2, hjertekarsygdom, knogleskørhed og fedme. CLA er vist at have en gunstig effekt på disse sygdomme i dyr. Der findes flere CLA-isomerer, hvoraf to er mest undersøgt, nemlig c9,t11-CLA og t10,c12-CLA. C9,t11-CLA findes naturligt i mælk og kød fra drøvtyggere, og indholdet heri kan reguleres via foderet. t10,c12-CLA findes hovedsagligt i industrielt fremstillede CLA-produkter. Projektet bestod af tre dele, der til sammen belyste ovennævnte problemstilling fra flere supplerende vinkler. På Institut for Human Ernæring, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, udførtes et human interventionsstudie, hvor 75 kvinder dagligt indtog c9,t11-CLA, benævnt "mælke-CLA", en blanding af c9,t11-CLA og t10,c12-CLA eller olivenolie (kontrol). Resultaterne viste, at CLA-blandingen havde en ugunstig effekt på flere risikoparametre for hjertekarsygdom (C-reaktivt protein, plasminogen, plasminogen aktivator inhibitor, oxidativt stress) sammenlignet med den naturligt forekommende c9,t11-CLA-isomer og olivenolie. Der var ingen indikation af en ugunstig effekt af c9,t11-CLA på risikomarkører for diabetes. Blandingsproduktet reducerede den totale fedtmasse i kroppen samt i benene. Begge CLA-supplementer øgede *in vivo* markøren for oxidativt stress, dog var forøgelsen efter mælke-CLA moderat.

På BioCentrum, Danmarks Tekniske Universitet, blev et fodringsforsøg med rotter udført for at undersøge CLA's indflydelse på fedtsyreprofilen i væv og organer, på genudtrykket af nøglezymer i lipogenesis, lipolysen og oxidationen af fedtsyrer, samt på markører for diabetes type II. Der var ingen forskelle i markører for diabetes og heller ingen forskelle på genekspression i lever og fedtvæv, hvilket kan hænge sammen med, at der ikke blev fundet større forskelle i fedtsyresammensætningen i de undersøgte væv og organer. Fodring med 0,5 % CLA-isomere i tre uger ikke havde nogen markant effekt på de undersøgte parametre hos rotter.

Institut for Biokemi og Molekylær Biologi, Syddansk Universitet, undersøgte effekten af de to CLA-isomere på primære humane fedtceller i kultur. Arbejdet blev udført i tæt samarbejde med professor M. McIntosh, University of North Carolina, USA. Resultaterne viste, at t10, c12-CLA, men ikke c9, t11-CLA, via aktivering af bestemte signalveje inducerer en inflammatorisk reaktion i præfedtcellerne, hvilket leder til frigivelse af en række cytokiner, som påvirker de modne fedtcellers genudtryk og funktion. Effekten på de modne fedtceller er således afhængig af tilstedeværelsen af præfedtceller. I de modne fedtceller sker der en signifikant reduktion i udtrykket af gener, som er involveret i lipidakkumulering, og dette fører til en delipidering af cellerne. Ligeledes reduceres fedtcellernes evne til at øge glukoseoptag som respons på insulin. Mange af disse effekter kan ledes tilbage til en reduceret aktivitet af den centrale transkriptionsfaktor, PPAR γ .

Summary:

The objective of this project was to examine the effect of conjugated linoleic acids (CLA) on risk markers of diabetes type 2, cardiovascular disease (CVD), osteoporosis, and obesity. In animal studies, CLA exert beneficial effect on risk markers of these diseases. There are several different CLA isomers, but only two are well-examined: the c9,t11-CLA, which is naturally occurring in milk, and t10,c12-CLA, which is predominantly found in commercial CLA products. Both isomers are biologically active. The project contained three parts, which together thoroughly examined the effects and mechanisms of CLA in human, animal, and cell models.

At the Department of Human Nutrition, Faculty of Life Sciences, The University of Copenhagen, a human intervention study was conducted, in which 75 women took a daily supplement with c9,t11-CLA, a mixture of c9,t11- and t10,c12-CLA or olive oil (control). The results showed that the mixture of CLA isomers had an unbeneficial effect on several risk markers of CVD (blood lipids, C reactive protein, plasminogen activator inhibitor, oxidative stress) compared to the naturally occurring CLA isomer and the olive oil. There were no indications of an unbeneficial effect of the c9,t11-CLA on risk markers of diabetes. The mix of CLA isomers reduced both total and lower body fat mass. Both CLA supplements increased the *in vivo* marker of oxidative stress, although the increase after c9,t11-CLA was moderate.

At BioCentrum, the Technical University of Denmark, a feeding study with rats was performed to elucidate how CLA affected markers of type 2 diabetes and the fatty acid profile and gene expression of key enzymes in lipid metabolism in different tissues. There were no effect of CLA on markers of diabetes, the relative gene expression, or the fatty acid profile in tissue and organs. Feeding with 0.5% CLA isomers for three weeks had no noteworthy effect on the examined parameters in rats.

At the Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, the effect of the two CLA isomers on primary human fat cells in culture was investigated. The work was performed in close collaboration with Professor M. McIntosh, University of North Carolina, USA. The results showed that t10, c12-CLA, but not c9, t11-CLA, activated specific signalling pathways in the pre-fat cells leading to induction of inflammatory cytokine expression and release. The release of these cytokines affected gene expression and function of the mature fat cells, and it was shown that these effects were dependent on the presence of the pre-fat cells. In the mature fat cells a significant reduction in the expression of genes involved in lipid accumulation was observed leading to delipidation of the fat cells. In addition, the ability of the fat cells to induce glucose uptake in response insulin was significantly reduced. Many of the effects on fat cell gene expression could be attributed to a reduced activity of the central transcription factor, PPAR γ .

Baggrund:

Konjugerede linolsyrer (CLA) er en gruppe umættede fedtsyrer med stor biologisk aktivitet, som har påkaldt sig megen opmærksomhed i de seneste år, da disse fedtsyrer i dyr er vist at have en forebyggende virkning over for nogle af de væsentligste sygdomme med ernæringsmæssig baggrund: hjerte- og karsygdomme, fedme, diabetes og cancer. Dyrestudier har vist, at CLA kan forebygge udviklingen af fedtaflejringer i årevæggen, forbedre insulinfølsomheden, påvirke knoglemetabolismen samt reducere mængden af kropsfedt (Pariza *et al.* 2001, Roche *et al.* 2001, Watkins *et al.* 2001), men dette er endnu ikke velundersøgt i mennesker.

Den væsentligste CLA-fedtsyre i kosten er c9,t11-isomeren, der findes naturligt i mejeriprodukter og kød fra drøvtyggere, og som er vist at være særdeles anti-carcinogen i celle- og dyremodeller. En anden betydningsfuld, aktiv CLA-fedtsyre er t10,c12-isomeren, som findes i syntetisk fremstillede CLA-produkter. Effekterne af de enkelte isomerer er først de senere år begyndt at blive belyst.

Formål:

Formålet med dette studium var at undersøge effekten af CLA:

1. **I mennesker:** virkning på en række risikoparametre for hjertekarsygdom, diabetes, knogleskørhed, inflammation, oxidativt stress samt kropskomposition og RNA for proteiner involveret i fedt- og glukosemetabolismen.
2. **I dyremodeller:** fedtprofilen ved inkorporering i væv og organer, på genudtrykket af nøgleenzymer i lipogenesis, lipolysen og oxidationen af fedtsyrer, samt på markører for diabetes type II i blodet hos diabetiske rotter.
3. **I primære humane fedtceller i kultur:** effekt på cellulær signalering, genudtryk og fedtcelle-funktion.

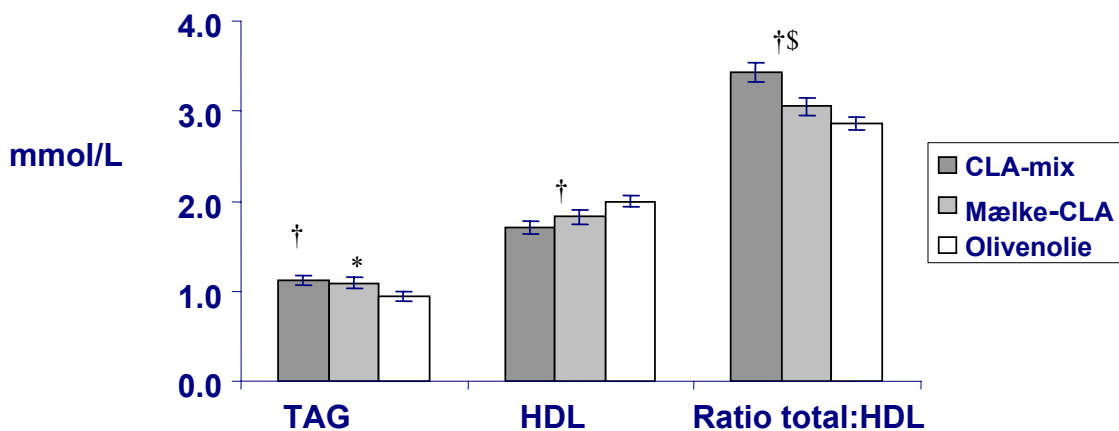
Resultater:

Ad 1: Humant interventionsstudium

75 ud af 81 kvinder gennemførte interventionen, hvor de i 16 uger dagligt fik kapsler med i alt 3,4 gram c9,t11-CLA, en blanding af c9,t11- og t10,c12-CLA eller olivenolie (kontrol). Der blev taget blod- og fedtvævsprøver, udført helkropsscanning (DEXA) og glukosetolerancetest (OGTT)(200 ml glukoseopløsning, 2,085 mmol/l) ved start og slut af interventionen. Desuden gennemførte alle deltagerne to 3-dages kostregistreringer, hvor al mad og drikke blev vejret og noteret. De præcise resultater og P-værdier er præsenteret i bilag 1.

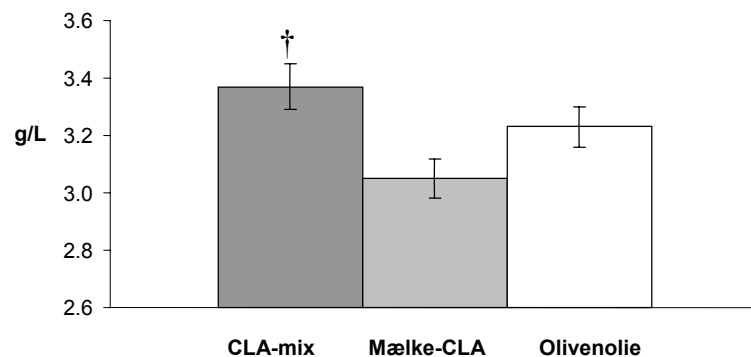
Hjertekarsygdom: Vi fandt, at CLA-mix resulterede i en lipidprofil, der er stærkere associeret til hjertekarsygdom end mælke-CLA og olivenolie (**figur 1**). På inflammatoriske markører fandt vi, at CLA-mix resulterede i en højere fibrinogen koncentration i forhold til mælke-CLA. En øget

koncentration af denne er associeret med øget risiko for hjertekarsygdom. Vi fandt desuden en højere koncentration af de inflammatoriske markører CRP og PAI-1 efter CLA-mix i forhold til både olivenolie og mælke-CLA (**figur 2 og 3**). Der var en højere udskillelse af 8-iso-PGF2 α i urinen efter CLA-mix i forhold til olivenolie og mælke-CLA (**figur 4**), hvilket indikerer øget oxidativt stress i kroppen og stemmer overens med andres observationer. Øget oxidativt stress menes at øge risikoen for hjertekarsygdom. Der var ingen forskel i effekten af mælke-CLA og olivenolie på blodlipid (kolesterol og triglycerider), de inflammatoriske markører inklusiv hæmostasemarkører (blodproppdannelse).

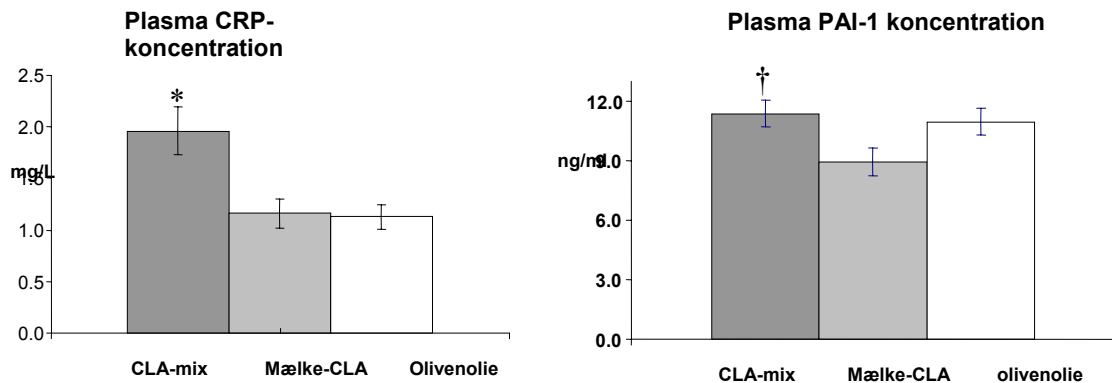


Figur 1. Plasmakoncentrationen (Mean \pm SEM) af triglycerider (TAG), HDL-kolesterol og ratioen total kolesterol: HDL-kolesterol efter 16 ugers supplementering med en blanding af c9,t11- og t10,c12-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA alene (mælke-CLA) eller olivenolie (kontrol). † Signifikant forskellig fra kontrol ($P \leq 0,01$) \$ forskellig fra forhold til c9,t11-CLA gruppen ($P \leq 0,05$). * Tendens til forskel i forhold til kontrol ($P \leq 0,08$).

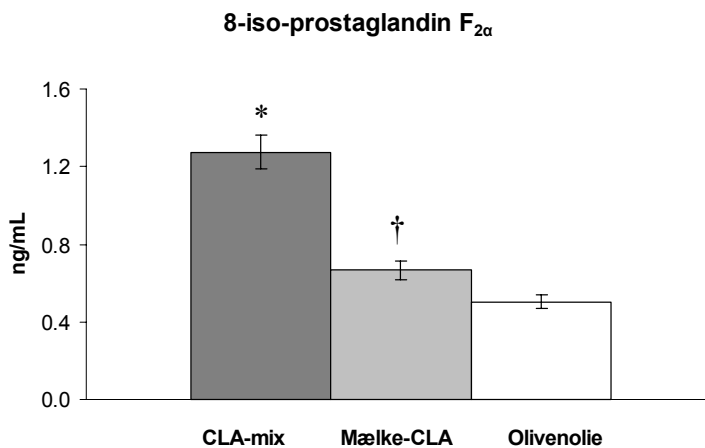
Plasmafibrinogen-koncentration



Figur 2. Plasmakoncentrationen (Mean \pm SEM) af fibrinogen efter 16 ugers supplementering med en blanding af c9,t11- og t10,c12-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA alene (Mælke-CLA) eller olivenolie (kontrol). † Forskellig fra Mælke-CLA ($P < 0,05$).



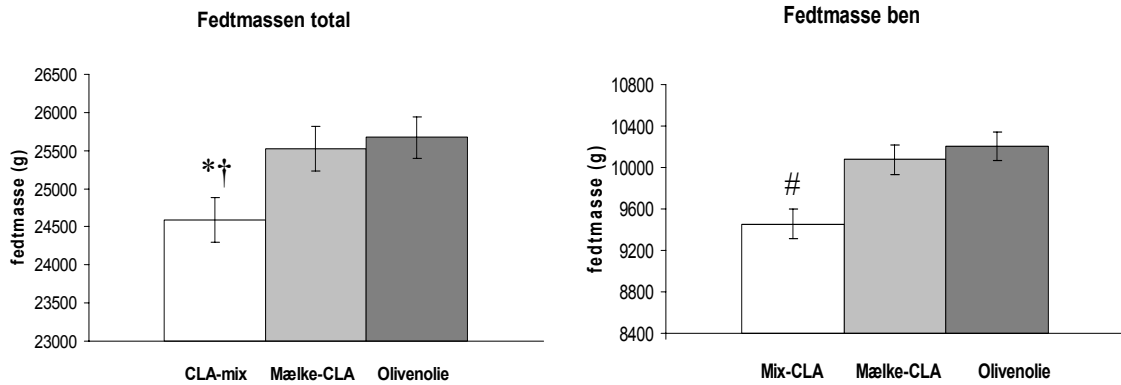
Figur 3. Plasmakoncentrationen (Mean \pm SEM) af C-reaktivit protein (CRP) og plasminogen aktivator inhibitor 1 (PAI-1) efter 16 ugers supplementering med en blanding af c9,t11- og t10,c12-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA alene (mælke-CLA) eller olivenolie (kontrol). * Forskellig fra både kontrol- og mælke-CLA gruppen ($P < 0,05$). † forskellig fra mælke-CLA gruppen, $P < 0,05$.



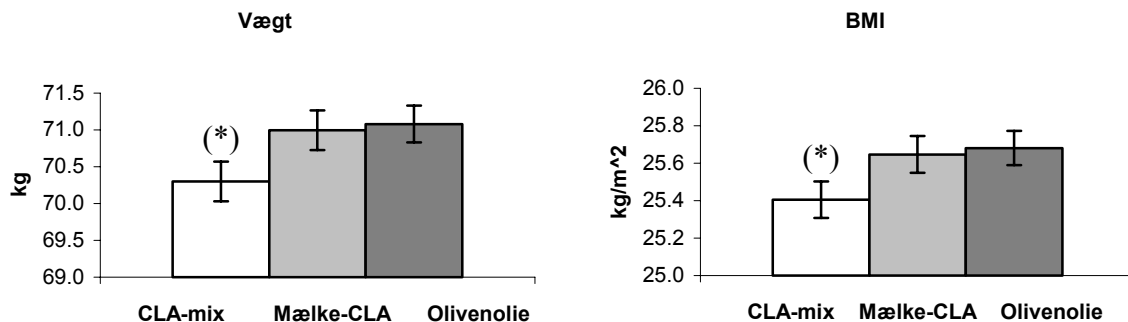
Figur 4. Isoprostan-udskillelsen i urinen efter interventionen (Mean \pm SEM). CLA-mix= blanding af t10,c12- og c9,t11-CLA, mælke-CLA= c9,t11-CLA. *Forskellig fra de to andre grupper ($P < 0,0001$). † forskellig fra kontrol, $P < 0,05$.

Diabetes type II: Der var ingen forskel i effekten af de tre behandlingstyper på glukose eller insulin koncentrationen i plasma, i hverken faste- eller 2-timers prøverne eller koncentrationen af glukose og insulin som funktion af tiden målt ved oral glukose tolerance test (OGTT).

Fedt- og muskelmasse, vægt og BMI: Vi fandt, at den totale fedtmasse var signifikant lavere, ca. 1 kg, efter CLA-mix i forhold til olivenolie, hvilket også tenderede til at være lavere i forhold til mælke-CLA. Fedtmassen i benene var også lavere, ca. 600 g, efter CLA-mix i forhold til både olivenolie og mælke-CLA. Disse ændringer i fedtmassen støttes af en tendens til en lavere vægt og BMI (kg/m^2) efter CLA-mix i forhold til både olivenolie og mælke-CLA (**figur 5 og 6**).



Figur 5. Fedtmasse total og i benene, gennemsnit \pm SEM (data er justeret for startværdierne og højden). *Lavere i forhold til olivenolie ($P < 0,05$). # lavere end olivenolie og mælke-CLA ($P < 0,01$). †Tendens til lavere i forhold til mælke-CLA ($P < 0,10$).

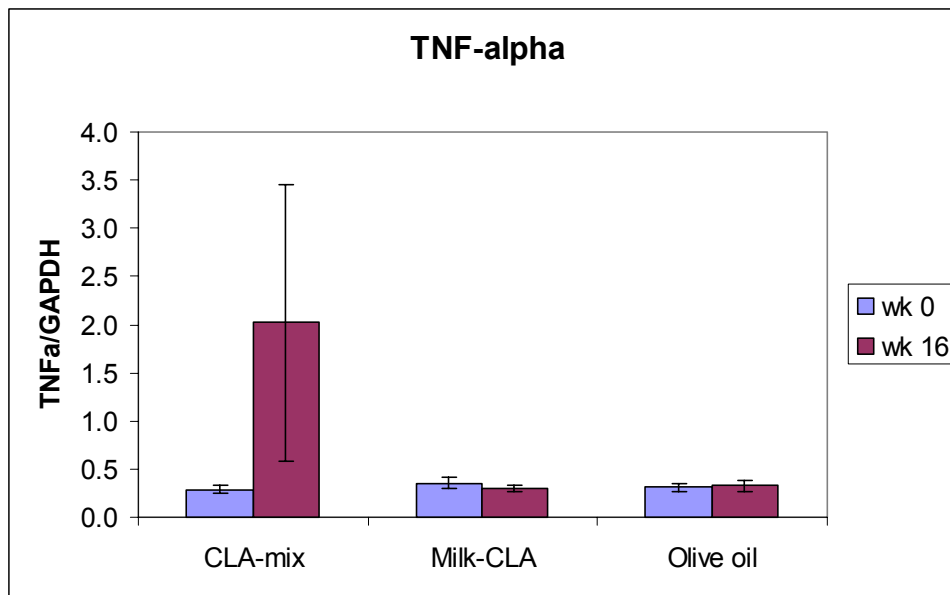


Figur 6. Vægt og BMI efter 16 ugers intervention med en blanding af t10,c12- og c9,t11-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA alene (mælke-CLA) eller en olivenolie kontrol. Gennemsnitsværdier \pm SEM (justeret for startværdierne). (*) Tendens til at være lavere i forhold til olivenolie- og mælke-CLA grupperne, $P < 0,1$.

Knogleskørhed: Knoglemassen blev bestemt for hele kroppen, de nederste lændehvirvler (L2-L4) og for hoften (femur-knoglen), hvor de to sidstnævnte repræsenterer de knogler med det største slid, og derfor oftest er steder, man først lokaliserer knogleskørhed. Vi fandt ingen signifikante forskelle i effekten af de tre supplement.

RNA for proteiner i fedt- og glukosemetabolismen: Fedtvævsbiopsier blev analyseret for mRNA udtrykket af proteiner involveret i fedt- og glukosemetabolismen (TNF- α , ALBP, adiponectin, GLUT4, leptin, LPL, PPAR γ_2 , og UCP2). Vi fandt en tendens til, at udtrykket af det proinflammatoriske cytokin TNF- α var højere efter CLA-mix i forhold til kontrollen ($P = 0,08$, figur 7). Standardafvigelseerne var meget høje, og dette kan muligvis forklare, hvorfor forskellen ikke var signifikant. Ved at sammenligne udtrykket af proteinerne før og efter interventionen fandt vi tydelige tendenser til, at udtrykket af adiponectin, GLUT4, leptin, LPL og PPAR γ var lavere efter interventionen i CLA-mix gruppen, hvorimod ingen forskelle fandtes i de to andre grupper. Dette stemmer overens med dyre- og cellestudier af CLA. Dog kan det i vores forsøg ikke udelukkes at

hænge sammen med, at CLA-mix gruppen havde lidt højere startniveauer end de to andre grupper. Vi fandt desuden, at ændringer i genudtrykket af proteinerne var signifikant korreleret til indholdet af CLA i fedtvævet.



Figur 7. Relative mRNA udtryk af TNF- α fra subcutane fedtvævsbiopsier (fedtvæv under huden i balle) før (wk 0) og efter (wk 16) 16 ugers intervention med konjugeret linolsyre (CLA)-mix (blanding af primært t10,c12- og c9,t11-CLA), milk-CLA (c9,t11-CLA) eller en olivenolie-kontrol i 75 postmenopausale kvinder. Data er præsenteret som gennemsnit \pm SD.

Delkonklusion: Resultaterne fra det humane interventionsstudie viste, at et kommercielt blandingsprodukt af CLA-isomerer havde en ugunstig effekt på flere risikoparametre for hjertekarsygdom i forhold til den naturligt forekommende CLA-isomer og olivenolie. Der var ingen indikation af en ugunstig effekt af mælke-CLA på risikomarkører for diabetes. Blandingsproduktet reducerede fedtmassen totalt og i benene, men da en reduceret fedtmasse i benene er associeret til en nedsat insulinfølsomhed (Bueman & Astrup 2006), kan dette ikke entydigt tolkes som gunstigt. Da den eneste forskel på de to CLA-supplementer var indholdet af t10,c12-CLA-isomeren, er det sandsynligt, at de ugunstige effekter, vi har fundet netop skyldes denne isomer, hvilket er i overensstemmelse med resultater fra andre. Begge CLA-supplementer øgede *in vivo* markøren for oxidativt stress, hvilket må betragtes som ugunstigt.

Ad 2: Fodringsforsøg med diabetesrotter

Der anvendtes to diabetesrotter, en overvægtig ZDF fa/fa Gmi rotte og en ikke-overvægtig GK rotte. Kontrolrotter var hhv. ZDF lean og Wistar rotter. Hver rottegenotype blev fodret med fire forskellige fodertyper i tre uger for at sammenligne effekten af CLA-isomere og linolsyre. Fedtkilden i foderet var smør med lavt indhold af CLA. Tidselolie tilsattes for at opnå passende indhold af linolsyre. Til 3 af fodertyperne blev tilsat henholdsvis 5% c9,t11-CLA, 5% t10,c12-CLA

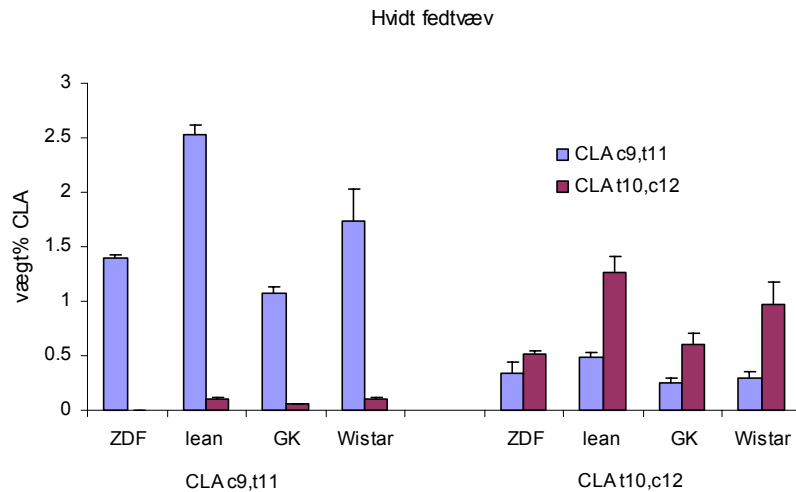
og 5% linolsyre. Foderblandingerne indeholdt 10% fedt. Fedtsyresammensætningen i foderblandingerne er anført i **tabel 1**.

Tabel 1. Fedtsyresammensætningen i testfoderet (vægt%)

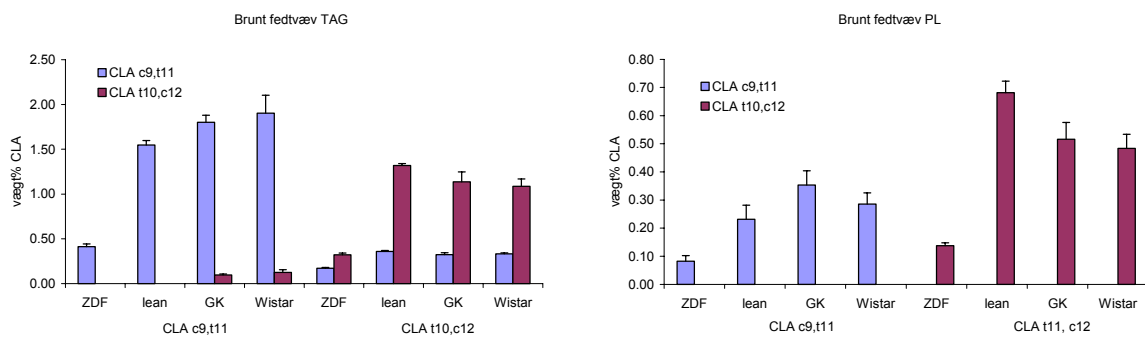
	Fodertype			
	CLA t9,c11	CLA t10,c12	Kontrol	C18:2 (Kontrol)
C4:0 –C12:0	10,77	10,75	10,86	11,16
C14:0	7,99	8,08	8,70	8,16
C16:0	25,37	25,52	27,44	26,11
C16:1n-7	1,28	1,29	1,38	1,31
C18:0	7,65	7,72	8,37	7,89
C18:1n-7 trans	0,87	0,88	0,95	0,89
C18:1n-9	16,36	16,15	17,26	16,71
C18:1n-7	0,59	0,58	0,61	0,61
C18:2n-6	14,96	14,61	15,08	18,16
C18:3n-3	1,37	1,35	1,42	1,40
CLA c9,t11	5,26	0,92	0,44	0,43
CLA t10,c12	0,41	5,04	-	-
andre	7,10	7,12	7,48	7,16

Vægt: Der blev ikke fundet forskel i effekten af fedttyperne på rotternes tilvækst eller organvægt.

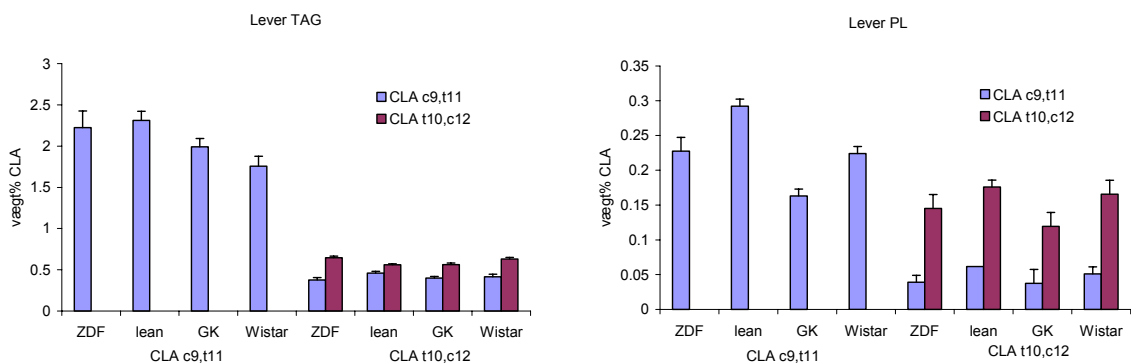
Væv: Fodring med CLA-isomere (0,5% i foderet) medførte ikke væsentlige ændringer i fedtsyresammensætningen i de undersøgte væv og organer (hvidt og brunt fedtvæv, lever og hjerte). Foderets indhold af CLA blev som forventet afspejlet i væv og organers fedtsyresammensætning, men t10,c12-CLA blev generelt inkorporeret dårligere end c9,t11-CLA (**figur 8**). t10,c12-CLA blev bedre inkorporeret i phospholipider (PL) fra brunt fedt og hjerte; mens ikke i lever PL (**figur 9 og 10**). Foderets indhold af linolsyre blev kun til en vis grad afspejlet i vævenes og organernes fedtsyre-sammensætning, især hos ZDF fa/fa og lean rotterne.



Figur 8. Indholdet af CLA i hvidt fedtvæv fra de fire forskellige rotte-genotyper efter fodring med c9,t11-CLA c9,t11 henholdsvis t10,c12-CLA i tre uger.

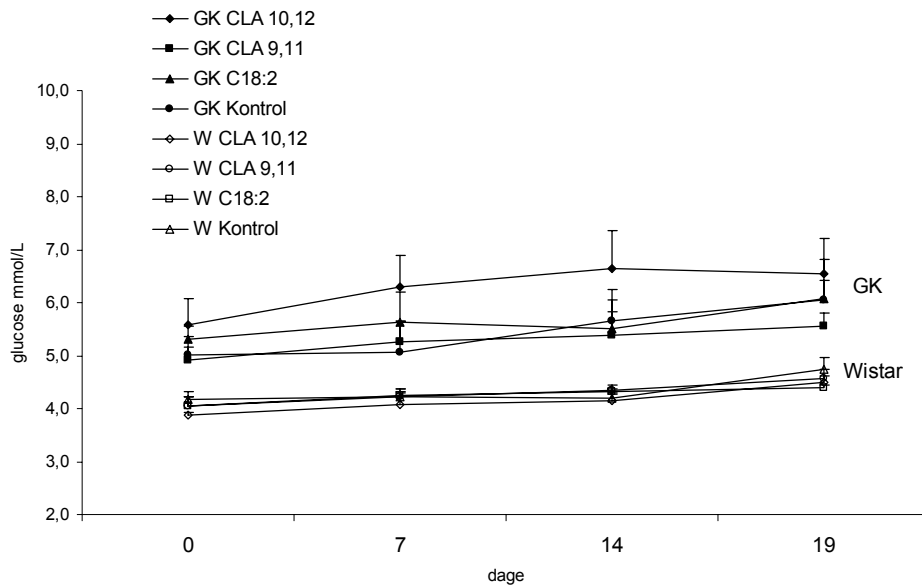


Figur 9. Indholdet af CLA i TAG og PL fra brunt fedtvæv fra de fire rotte-genotyper efter fodring med c9,t11-CLA henholdsvis t10,c12-CLA i tre uger.



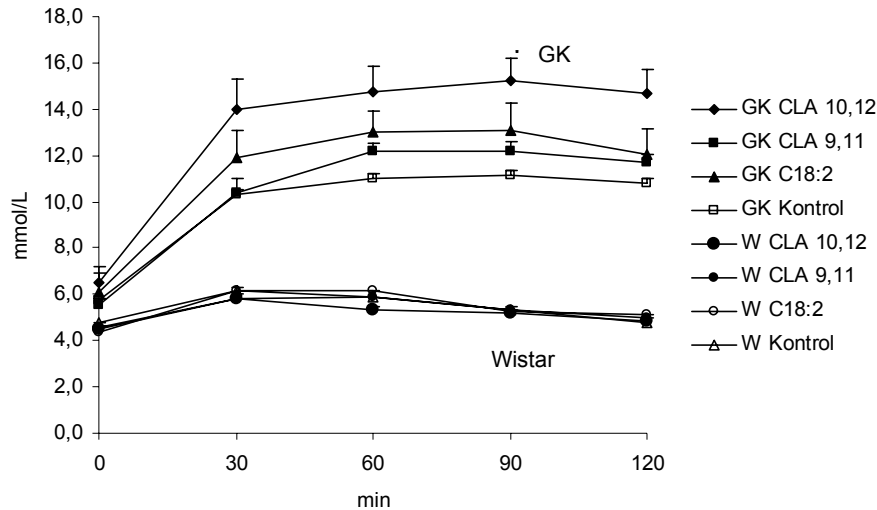
Figur 10. Indholdet af CLA i lever TAG og PL fra de fire rotte-genotyper efter fodring med c9,t11-CLA henholdsvis t10,c12-CLA i tre uger.

Blodglukose: For ZDF fa/fa rotterne var der ingen forskel i glukosekoncentrationen mellem de 4 grupper i fodringsperioden. Glukosekoncentrationen i blodet hos ZDF fa/fa rotterne efter oral glukose tolerancetest (OGTT) var ikke signifikant forskellige for de fire grupper. For GK rotterne var der ingen signifikant forskel mellem de fire grupper, men der var en tendens til, at rotterne fodret med t10,c12-CLA havde den højeste glukose-koncentration (**figur 11**).



Figur 11. Indholdet af glukose i blodet fra GK og Wistar rotter efter 0, 7, 14 og 19 dages fodring med henholdsvis t10,c12-CLA , c9,t11-CLA, linolsyre eller kontrolfoder.

For GK-rotterne, fodret med t10,c12-CLA, lå glukosekoncentrationen efter OGTT højere end for de andre grupper; men der var kun signifikant forskel efter 90 og 120 min (**figur 12**). Disse resultater kan tyde på, at t10,c12-CLA medførte en dårligere insulinfølsomhed hos diabetiske GK rotter.



Figur 12. Indholdet af glukose i blodet fra GK og Wistar rotter efter indgivelse af en glukosebolus ved en Oral glukose tolerance test (OGTT).

Plasmainsulin: Der var ingen forskel i plasmainsulinkoncentrationen under fodringsforsøget eller efter OGTT mellem de fire grupper, hvilket viste, at CLA ikke påvirkede plasmainsulinniveauet anderledes end linolsyre.

Genekspressionen i fedt- og levervæv: mRNA udtrykket fra forskellige gener blev analyseret ved real-time PCR.

Leveren:

- Lipogenese gener: Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c), steraoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1), SCD-2, fatty acid synthetase (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC)
- Liver-type carnitine palmitoyl-CoA transferase (L-CPT) (hastighedsbegrænsende i fedtsyre-oxidation)
- Glucose transporter 2 (Glut2) (involveret i glukoseoptag).

Hvidt fedtvæv:

- Fedtvævsspecifikke transskriptionsfaktorer peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) og CCAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)
- PPAR γ målgener: lipoprotein lipase (LPL), perilipin, adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) og Glut4
- Gener involveret i fedtsyresyntesen: SCD-1, SCD-2, FAS, ACC
- Det proinflammatoriske cytokin interleukin 6 (IL-6).

Der sås ingen effekt af de to CLA-isomere på genekspressionen i fedtvævsprøverne eller i leverprøverne.

Ceramid og diacylglycerol i soleusmusklen: Det er tidligere vist en sammenhæng mellem insulinresistens og ceramidindholdet i muskler, hvilket kan hænge sammen med triacylglycerol (TAG) akkumulering i musklen ved fedme. Soleusmusklen fra ZDF-rotterne blev analyseret for indholdet af ceramid og diacylglycerol (DAG). Analysen viste ingen forskel i ceramid- og DAG-indholdet i soleus mellem de fire grupper.

Adipocytokiner: Det var ikke muligt at bestemme IL6 og TNF α i plasmaprøverne, da koncentrationen var under detektionsgrænsen for det anvendte ELISA-kit.

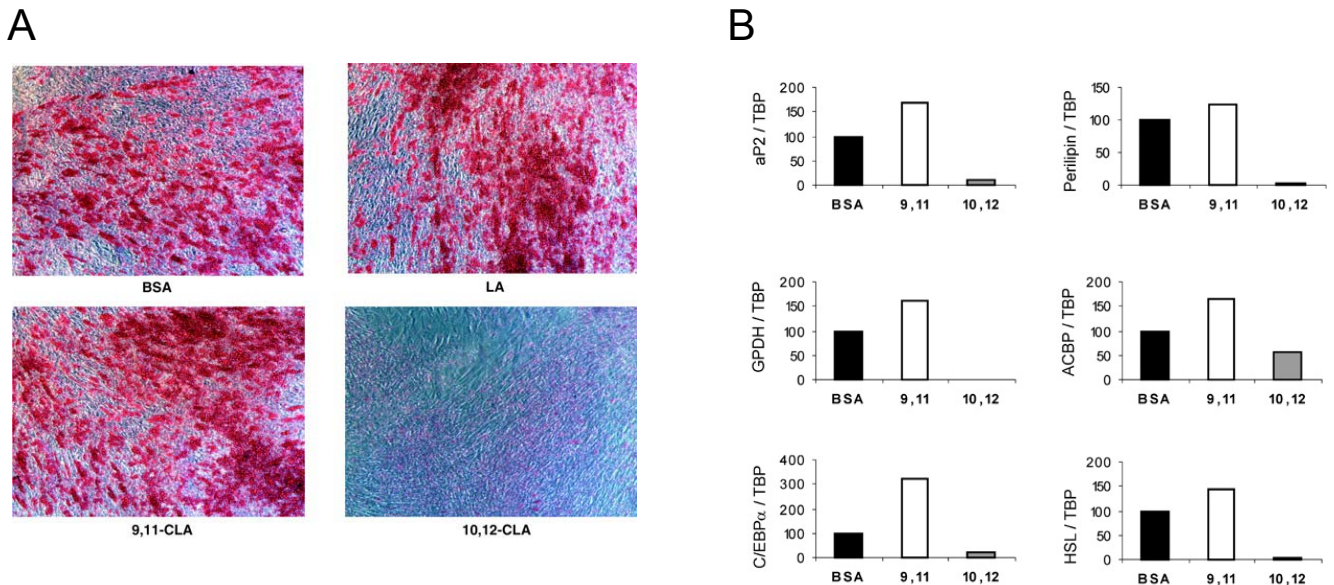
Leptinindholdet (pg/ml) i plasma fra ZDF rotterne fodret med c9,t11-CLA var højere sammenlignet med rotter, der havde fået foder med lavt indhold af linolsyre.

Delkonklusion: Fodringsforsøget viste ingen forskelle i markører for diabetes og heller ingen forskelle for genekspression i lever og fedtvæv. Dette hænger formodentlig sammen med, at der ikke blev fundet større forskelle i fedtsyresammensætningen i de undersøgte væv og organer, som kunne tilskrives fodring med CLA. Det vil sige, at fodring med 0,5 % CLA-isomere i tre uger ikke havde nogen markant effekt på de undersøgte parametre hos hverken diabetes- eller kontrolrotterne.

Ad 3: Effekter på humane fedtceller i kultur

For at belyse de molekulære mekanismer bag de isomer-specifikke effekter af CLA på fedtvævet, har vi i samarbejde med Dr. Michael McIntosh undersøgt, hvordan de enkelte isomere påvirker humane præ-fedtceller samt modne fedtceller i kultur.

Fedtcelleudvikling. Vi har vist, at trans-10, cis-12-CLA hæmmer akkumuleringen af triglycerid i differentierende humane præfedtceller (**figur 13A**) ved at hæmme optag af glukose (målt som cellulært optag C-14 mærket deoxy-glucose) og fedtsyrer (målt som cellulært optag af C-14 mærket oliesyre optag) samt inkorporeringen af disse i triglycerid (målt som hhv. C-14 mærket glukose og C-14 mærket oliesyre inkorporering i den lipidopløselige cellulære fraktion). Vha. kvantitativ real-time PCR viste vi at en lang række fedtcelle-specifikke gener er specifikt nedreguleret af trans-10, cis-12-CLA (**figur 13B**). Desuden nedregulerer trans-10, cis-12-CLA udtrykket af PPAR γ , som er en central aktivator af fedtcelleudvikling og lipidakkumulering. Vores resultater tyder på, at denne nedregulering af PPAR γ udtryk er central for trans-10, cis-12-CLAs hæmmende effekt på fedtakkumulering under udvikling af humane fedtceller.



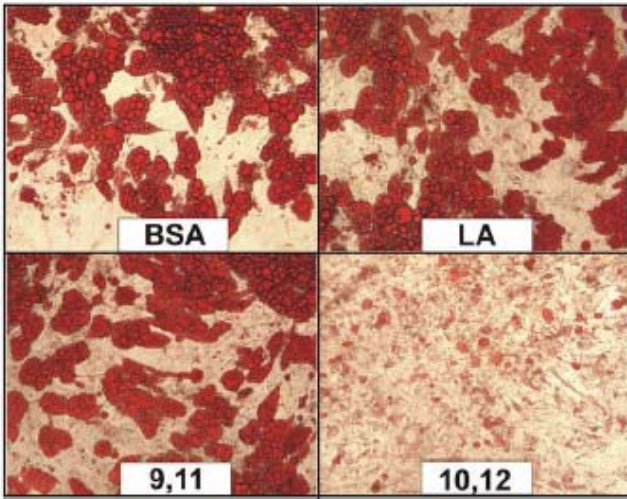
Figur 13. Trans-10, cis-12 CLA-isomeren hæmmer fedtcelleudvikling af primære humane præfedtceller i kultur.

A. Lipidakkumulering under fedtcelleudvikling efter behandling med bovint serum albumin (BSA), eller BSA-komplekset til hhv. linolsyre (LA) og CLA-isomere. Lipid er visualiseret ved oil-red-O farvning.

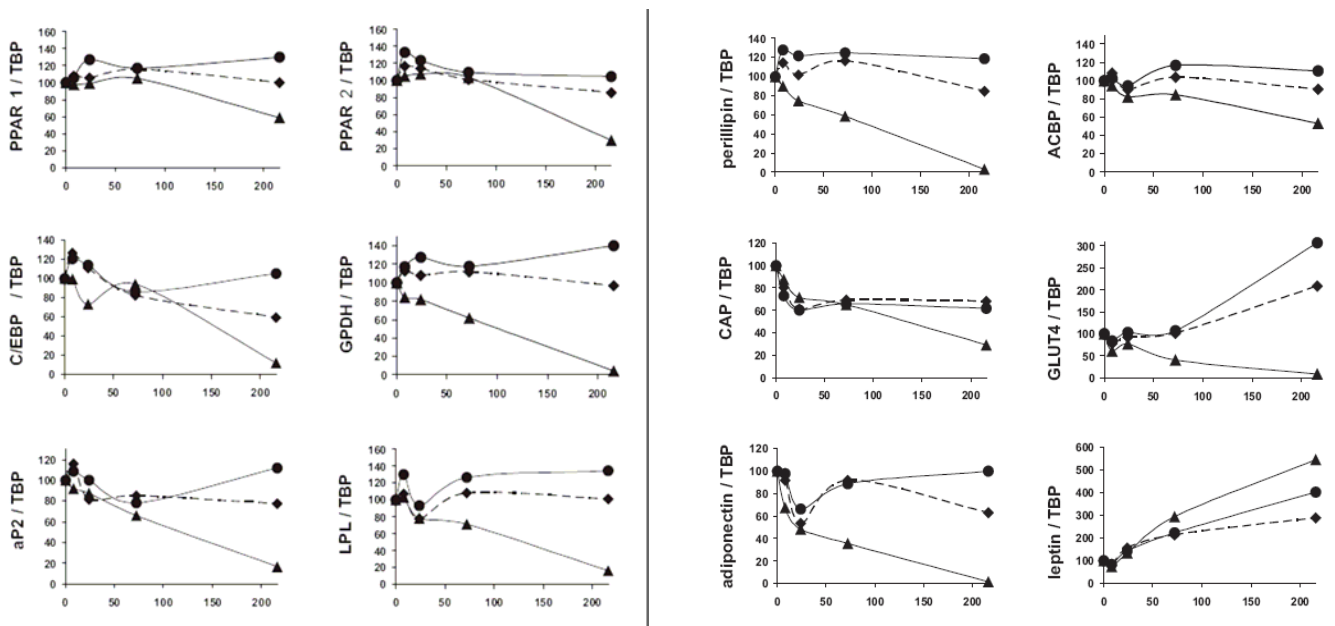
B. Genudtryk af fedtcelle-specifikke gener efter behandling med hhv. BSA og CLA-isomere.

Effekt på modne fedtceller. Ligeledes har vi undersøgt, hvordan modne fedtceller påvirkes af CLA-isomerene. Vore resultater viste, at trans-10, cis-12 CLA-isomeren, men ikke cis-, trans-11-CLA-isomeren, forårsager delipidering af modne humane fedtceller (**figur 14**). Dette sker gennem en hæmning af fedtsyreoptag (målt som cellulært optag af C-14 mærket oliesyre) og glukoseoptag (målt som cellulært optag af C-14 mærket deoxy-glucose) samt inkorporeringen af disse i triglycerid (målt som hhv. C-14 mærket glukose og C-14-mærket oliesyreinkorporering i den lipidopløselige cellulære fraktion). Vha. kvantitativ real-time PCR viste vi desuden, at trans-10, cis-12 CLA-isomeren i løbet af 1-3 dage nedregulerer en lang række fedtcelle-specifikke gener i *modne* humane adipocytter (**figur 15**). Dette drejer sig bl.a. om de samme fedtcelle-specifikke gener, som vi tidligere rapporterede nedreguleret, når denne CLA-isomer blev givet *under* udviklingen af humane præadipocytter (**figur 13B**).

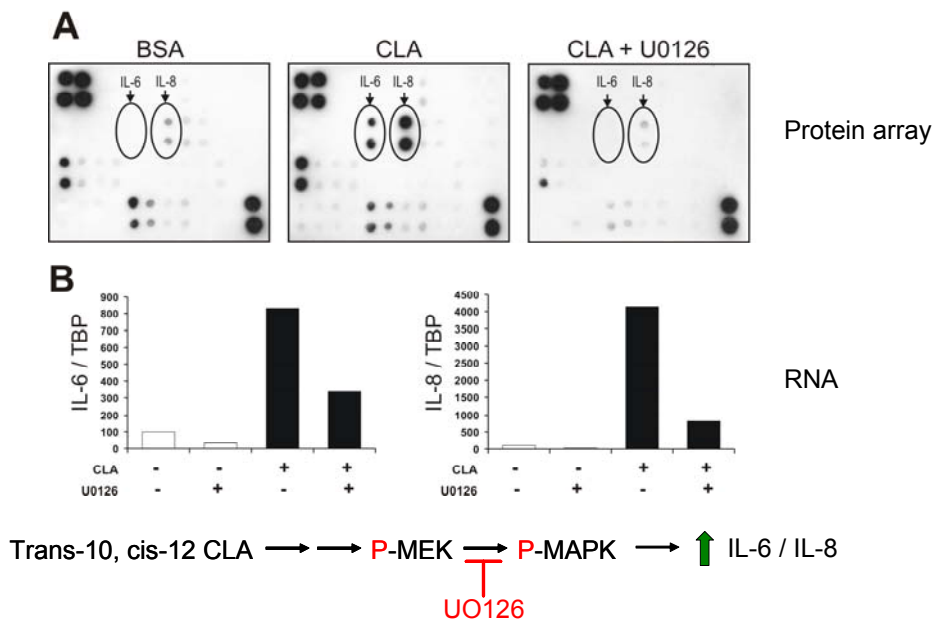
Endvidere viste vi, at trans-10, cis-12-CLA forårsager en kraftig opregulering af udtrykket af interleukin 6 og 8 (IL-6 og IL-8) i kulturer af præfedtceller og modne fedtceller, som er afhængig af protein-kinasen ERK (**figur 16**). Vha. co-kultur, hvor modne fedtceller dyrkes hhv. med og uden præfedtceller, viste vi, at effekten af trans-10, cis-12-CLA er helt afhængig af tilstedeværelsen af præfedtceller, og at cytokin-produktionen næsten udelukkende stammer fra præfedtcellerne (**figur 17**). Dette har ført til modellen for trans-10, cis-12-CLA's virkning skitseret i figur 18.



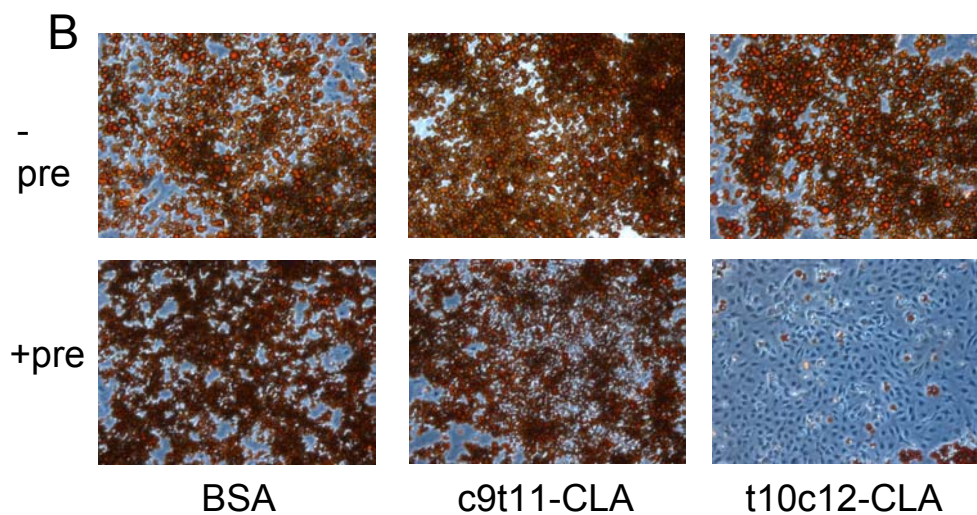
Figur 14. Behandling af kulturer af modne fedtceller og præfedtceller med i 3 uger fører til næsten fuldstændig delipidering af fedtcellerne. Lipid er visualiseret ved oil-red-O farvning.



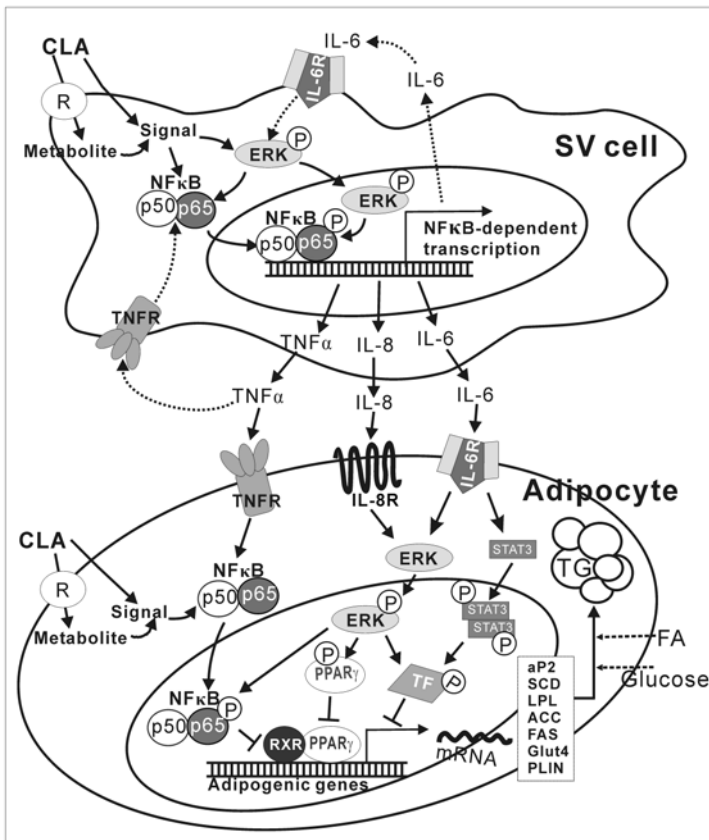
Figur 15. Udtryk af fedtcelle-specifikke gener i kulturer af modne fedtceller og præfedtceller efter behandling med BSA (■), cis-9, trans-11 CLA (●) og trans-10, cis-12 CLA (▲). Tid efter tilsætning er angivet i timer.



Figur 16. Effekt af CLA-isomere på kulturer af modne fedtceller og præfedtceller. Trans-10, cis-12-CLA fører til en induktion af de proinflammatoriske cytokiner IL6 og IL-8 protein (A) og mRNA (B), og denne effekt er afhængig af aktivering af protein-kinasen MEK, som kan hæmmes af UO126.



Figur 17. Co-kultur forsøg viser, at tilstedeværelsen af præfedtceller er nødvendig for trans-10, cis-12-CLAs delipiderende virkning på fedtceller. Fuldt differentierede muse fedtceller af 3T3-L1 fedtcellelinien blev behandlet med 30 μ M c9t11-CLA, 30 μ M t10c12-CLA eller BSA i tilstedeværelse (+pre) eller fravær (-pre) af præfedtceller. Efter tre ugers behandling med fedtsyrer eller BSA blev lipid i cellerne farvet med Oil Red.



Figur 18. Model for virkningen af trans-10, cis-12 CLA i fedtvæv. CLA-isomeren virker især ved at aktivere transkriptionsfaktoren NFκB i præfedtceller (SV cell) på en måde, som er afhængig af proteinkinase ERK. Dette fører til øget udtryk og udskillelse af proinflammatoriske cytokiner (TNFα, IL-6 og IL-8) i præfedtcellen. Disse cytokiner stimulerer nu NFκB aktivitet i de modne fedtceller (adipocyte), hvilket hæmmer funktionen af PPARγ og dermed udtrykket af en lang række fedtcellespecifikke gener. Hæmning af PPARγ fører også til delipidering af fedtcellerne og tab af cellernes evne til at respondere på insulin (insulinresistens).

Delkonklusion: Vores resultater viser, at trans-10, cis-12, men ikke cis-9, trans-11-CLA, fører til en øget cytokinproduktion i præfedtcellerne, som hæmmer disses udvikling til modne fedtceller, og som desuden fører til et inflammatorisk respons med aktivering af transkriptionsfaktoren NFκB i de modne fedtceller. Vores hypotese er, at det er denne aktivering af NFκB, som er hovedansvarlig for hæmning af PPARγ i de modne fedtceller. Hæmning af PPARγ fører til nedsat udtryk af fedtcellespecifikke gener og dermed til nedsat insulin-følsomhed samt nedsat evne til at optage glukose og fedt og oplagre dette som fedt i cellerne. Ifølge vores resultater er dette ansvarlig for den gradvise delipidering af cellerne. Vores resultater fra cellekulturer stemmer overens med de resultater, der er opnået fra humane fedtvævsbiopsier og giver således en mulig molekylær forklaring på, at CLA-mix men ikke mælke-CLA (cis-9, trans-11-CLA) øger inflammatoriske markører i plasma.

Referencer:

Buemann B, Astrup A, Pedersen O, Black E, Holst C, Toubro S, Echwald S, Holst JJ, Rasmussen C, Sorensen TI. Possible role of adiponectin and insulin sensitivity in mediating the favorable effects of lower body fat mass on blood lipids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(5):1698-1704.

Pariza MW, Park Y, Cook ME. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*, 2001; 40(4): 283-98.

Roche HM, Noone E, Nugent A, Gibney MJ. Conjugated linoleic acid: a novel therapeutic nutrient? *Nutrient Research Reviews* 2001; 14: 173-187.

Watkins BA, Lippmann HE, Bouteiller L, Li Y, Seifert MF. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog Lipid Res* 2001; 40(1-2): 125-48.

Publikationer der er et resultat af projektet:

Internationale tidsskrifter:

Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Jensen, S.S.; Morrison, R.F.; Storkson, J.; Currie, R.L.; Pariza, M.; Mandrup, S. & McIntosh, M.K. (2003) Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases glucose and fatty acid uptake and oxidation and inhibits PPARgamma-dependent gene expression in human preadipocytes. *J. Lipid Res.* 44: 1287-1300.

Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Chung, S.; Fabiyi, O.; Morrison, R.F.; Mandrup, S.; & McIntosh, M.K. (2004) Conjugated linoleic acid (CLA) induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signalling by adipocytokines, *J. Biol. Chem.* 279: 26735-47.

Chung, S.; LaPoint, K.; Martinez, K.; Kennedy, A.; Boysen Sandberg, M. & McIntosh, M.K. (2006) Preadipocytes Mediate Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Insulin Resistance in Primary Cultures of Newly Differentiated Human Adipocytes. *Endocrinology* 147: 5340-5351.

Chung, S.; Brown, J.M.; Boysen Sandberg, M.; & McIntosh, M.K. (2006) *Trans*-10,*cis*-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signalling. *J. Lipid Res.* 46: 885 - 895.

Artikler under udarbejdelse:

Tholstrup, T.; Raff, M.; Straarup, E. M.; Lund, P.; Bruun, J.M. & Basu, S. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo oxidation compared to cis 9, trans 11 linoleic acid in post menopausal women.

Raff, M.; Tholstrup, T.; Boysen, M.S.; Mandrup, S. et al. The effect of 16 weeks supplementation with cis 9, trans 11 conjugated linoleic acid or a mixture of cis 9, trans 11- and trans 10, cis 12 conjugated linoleic acid on total and regional body composition in postmenopausal women.

Lund, P. & Straarup, E.M.. The Effect of Conjugated Linoleic Acid Isomers on Fatty Acid Profiles of Adipose Tissue, Brown Adipose Tissue and Liver from Diabetic Zucker, Lean, GK and Wistar Rats.

Populærvidenskabelige artikler:

Tholstrup, T.; Straarup, E. M. & Mandrup, S. (2003) Har komponenter i mælkefedt en forebyggende rolle på velfærdssygdomme? *Mælkeritidende* 24, 598-601.

Afhandlinger:

Jon Jehrbo Petersen. Ceramid akkumulering i muskler hos overvægtige, diabetiske rotter – effekt af CLA 30/6 2004. M.Sc.-afhandling, Biokemi og Ernæring, BioCentrum-DTU.

Maria Boysen Sandberg. Regulation of gene expression by CLA and glucose – implications in type 2 diabetes. Ph.d.-afhandling, Syddansk Universitet, 2006.

Eva Tylková. Lipidomics. Analyses of phospholipid molecular species by MS in art spleens. Master project, Institute of Chemical Technology, Prag, Tjekkiet (ERASMUS-studerende på DTU Biocentrum i perioden januar til juni 2004).

Mødeindlæg ved internationale møder:**Posters:**

Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Chung, S.; Fabiyi, O.; Mandrup, S. & McIntosh, M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) alters metabolism, gene expression, and MEK/ERK signaling in mature human adipocytes. Keystone Symposia: Diabetes mellitus: Molecular signaling, Genes and therapeutics/Molecular control of Adipogenesis and Obesity 4.- 10. marts 2004, Banff, Canada.

Foredrag:

Susanne Mandrup. Regulation of Adipocyte Differentiation and Function. 43rd Annual meeting of the European Society for Pediatric Endocrinology, 10.-13. september 2004, Basel, Schweiz.

Redegørelse for forskeruddannelse og udstationering:

Ph.d. Maria Boysen Sandberg, Institut for Biokemi og Molekylær Biologi, SDU, har arbejdet på projektet som en del af sin ph.d.-uddannelse, og resultater fra projektet indgår i ph.d.-afhandlingen. Maria BS har tilbragt to mdr. hos samarbejdspartner prof. Dr. Michael McIntosh, University of North Carolina, Greensboro, USA, og har i den tid arbejdet med at lære og optimere forskellige procedurer til anvendelse i arbejdet med fedtcellekulturene. Maria B. Sandberg afsluttede sin ph.d.-uddannelse i maj 2006.

Marianne Raff, Institut for Human Ernæring, har desuden arbejdet som forskningsassistent på projektet og er pr. 1. august 2006 optaget som ph.d.-studerende. I ph.d.-uddannelse vil en del af arbejdet fra projektet blive anvendt (meritoverførelse), og resultater fra dele af det humane studie vil indgå i afhandlingen. Marianne Raff forventes at afslutte ph.d.-uddannelsen den 31. juli 2007.

Samarbejdsrelationer:

Analyse af inflammatoriske markører Il-6, TNF- α , MCP-1 og PAI-1 fra det humane interventionsstudie blev udført i samarbejde med overlæge, dr.med. Jens Meldgaard Bruun, Medicinsk-Endokronologisk afd. C, Århus Amtssygehus, Århus.

Forskningen i Susanne Mandrups gruppe har været udført i tæt samarbejde med Professor Dr. Michael McIntosh, University of North Carolina Greensboro, USA. M. McIntosh har bl.a. været på tre måneders forskningsophold i Susanne Mandrups gruppe (2004-2005).

Videnskabelig og praktisk betydning af projektet:

Det humane interventionsstudies videnskabelige betydning består i, at den naturligt forekommende CLA-isomer, cis-9,trans-11-CLA, der er den dominerende CLA i mælkefedt, er blevet sammenlignet med den kommercielle CLA-olie, der udover cis-9,trans-11-CLA-isomeren hovedsagligt indeholder trans-10,cis-12-CLA. Virkning af begge typer isomere er endvidere sammenlignet med olivenolie. Denne sammenligning er væsentlig, da olivenolie anses for neutral i relation til hjertekarsygdomme. Sammenligningen af de tre typer supplementering viste, at den kommercielle blanding af CLA-isomere havde en ugunstig effekt på flere risikoparametre i forhold til både cis-9,trans-11-CLA og olivenolien, hvorimod den CLA-isomer, der findes i mejeriprodukter ikke havde en effekt, der var forskellig fra olivenolie på andre parametre end det oxidative stress, hvor den havde en moderat øgende virkning. I overensstemmelse hermed viste cellekulturforsøg med primære humane fedtceller, at trans-10,cis-12-CLA inducerer udtryk af inflammatoriske cytokiner i præfedtceller, som fører til dysfunktion, herunder insulinresistens, af de modne fedtceller.

Overordnet var CLA-isomeren fra mælkefedt mere neutral og havde dermed en mere gunstig effekt på det menneskelige helbred end den industrielt fremstillede. Den var i øvrigt ikke forskellig fra olivenolien udover den svagt øgende effekt på det oxidative stress i organismen. Denne viden er væsentlig for mejeribrug, idet den friholder CLA-isomeren fra mælk fra skadelige egenskaber i forbindelse med insulinresistens og type 2 diabetes.

Bilag 1. Tabeller med resultater fra det humane interventionsforsøg

Tabel 2. Fedtsyresammensætningen i triacylglyceroler, kolesterolestre og phosphorlipider i 75 kvinder efter 16 ugers supplementering med en blanding af c9,t11-CLA og t10,c12-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA alene (Mælke-CLA) eller olivenolie¹.

%wt	Triacylglyceroler			Kolesterol estre			Phospholipider		
	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie
12:0	0,17±0,02	0,15±0,02	0,11±0,02	0,12±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01			
14:0	1,61±0,11 ^a	1,60±0,11 ^{ab}	1,26±0,08 ^b	0,76±0,03	0,74±0,03	0,72±0,03	0,30±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01
16:0	24,63±0,44	24,22±0,46	23,16±0,44	11,38±0,11	11,44±0,12	11,47±0,11	28,02±0,16	28,28±0,17	28,13±0,16
18:0	3,95±0,11	3,74±0,12	3,59±0,11	0,89±0,02 ^a	0,82±0,02 ^a	0,86±0,02	14,74±0,14 ^c	14,31±0,15	13,97±0,14 ^c
Σt18:1	0,66±0,05 [†]	0,58±0,05	0,62±0,05 [‡]	-	-	-	-	-	-
18:1 n-9	37,20±0,62^a	37,87±0,66	39,67±0,62^a	19,81±0,26^c	20,38±0,28^a	21,33±0,26^{ac}	9,74±0,18^a	10,33±0,21	10,49±0,20^a
18:2 n-6	11,79±0,36	11,84±0,38	12,39±0,38	47,57±0,55	46,76±0,58	45,95±0,55	19,32±0,35	19,29±0,38	19,25±0,35
18:3n-6	0,35±0,02	0,38±0,02	0,36±0,02	0,78±0,05	0,90±0,05	0,83±0,05	0,15±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01
+20:0									
18:3 n-3	1,06±0,05	1,14±0,06 ^c	0,90±0,05 ^c	0,66±0,02 ^a	0,70±0,03 ^c	0,58±0,02 ^{ac}	0,24±0,01	0,24±0,01	0,20±0,01
CLA9,11	0,84±0,06^{tec}	1,18±0,08^{‡cf}	0,24±0,12^{‡‡ef}	0,42±0,02^{ef}	0,76±0,04^{eg}	0,11±0,01^{fg}	0,50±0,03^{ef}	0,85±0,05^{eg}	0,14±0,01^{fg}
CLA10,12	0,29±0,02^{ef}	0,15±0,01^{eg}	0,09±0,01^{fg}	0,26±0,01^{ef}	0,11±0,01^{eg}	0,07±0,01^{fg}	0,27±0,01^{ef}	0,11±0,01^{eg}	0,05±0,01^{fg}
20:2 n-6	0,13±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01				0,30±0,01	0,29±0,01	0,29±0,01
20:3 n-6	0,23±0,02	0,21±0,02	0,23±0,02	0,60±0,02 ^c	0,63±0,02	0,68±0,02 ^c	2,61±0,09	2,71±0,09	2,89±0,09
20:4 n-6	1,37±0,06	1,30±0,06 ^a	1,52±0,06 ^a	6,20±0,14	6,08±0,15 ^a	6,63±0,14 ^a	8,98±0,17 ^a	8,87±0,18 ^c	9,69±0,17 ^{ac}
20:4 n-3	-	-	-	0,08±0,01	0,09±0,01	0,09±0,01	0,19±0,02	0,21±0,02	0,20±0,02
20:5 n-3	0,48±0,04	0,43±0,04	0,52±0,05	1,76±0,12	1,64±0,12	1,65±0,11	1,97±0,18	2,19±0,20	2,0±0,18
22:4n-6	0,15±0,01	0,13±0,01	0,14±0,01	-	-	-	0,27±0,01	0,27±0,01	0,27±0,01
+24:1									
22:5 n-6	0,11±0,01	0,10±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a	-	-	-	0,17±0,01 ^{†c}	0,16±0,01	0,16±0,01 ^{†c}
22:5 n-3	0,66±0,03	0,60±0,03	0,62±0,03	0,19±0,02	0,22±0,02	0,21±0,02	1,22±0,03	1,13±0,03	1,06±0,03
22:6 n-3	1,40±0,11	1,19±0,10	1,58±0,12	0,96±0,04	0,86±0,04	0,89±0,04	5,57±0,18	5,16±0,19	5,28±0,18

¹Gennemsnitsproportionerne justeret for baseline værdier ± SEM. Værdier i samme række med det samme bogstav er forskellige fra hinanden: a,b: P<0.05, c,d: P<0.01, e,f,g: P<0.001. †,‡: forskellige baseline værdier P<0.05.

Tabel 3. Baseline værdierne for deltagerne før interventionen^a

	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	P-værdi (global)
Total kolesterol (mmol/L)	5,88 ± 1,16	5,55 ± 0,9	5,58 ± 0,83	0,42
HDL kolesterol (mmol/L)	1,88 ± 0,44	1,93 ± 0,5	1,93 ± 0,47	0,90
LDL kolesterol (mmol/L)	4,25 ± 1,21	3,79 ± 0,84	3,86 ± 0,87	0,22
Triacylglycerol (mmol/L)	1,00 ± 0,33	1,04 ± 0,45	0,98 ± 0,41	0,85
Ratio Total:-HDL kolesterol	3,27 ± 0,99	3,06 ± 1,00	3,02 ± 0,72	0,58
PAI-1 (ng/mL)	10,90 ± 7,70	9,15 ± 5,86	9,23 ± 5,87	0,57
CRP (mg/L)	1,55 ± 1,29	1,25 ± 0,96	2,01 ± 2,02	0,29
IL-6 (ng/L)	1,99 ± 2,44	1,93 ± 2,35	1,46 ± 0,79	0,59
TNF- α (ng/L)	2,11 ± 1,91	1,70 ± 0,47	1,71 ± 0,50	0,25
MCP (ng/L)	218 ± 45	246 ± 85	239 ± 60	0,29
sICAM (ng/mL)	226 ± 40	237 ± 40	241 ± 52	0,49
sVCAM (ng/mL)	486 ± 147	495 ± 105	491 ± 118	0,97
FVII:c (arbejdsenheder)	1,29 ± 0,24	1,25 ± 0,18	1,22 ± 0,21	0,57
Fibrinogen (g/L)	3,15 ± 0,46	3,17 ± 0,66	3,21 ± 0,54	0,90
Insulin 0h ^{*3} (pmol/L)	42,2 ± 15,9	33,3 ± 14,4	33,8 ± 12,3	0,06
Insulin 2h ^{*4} (pmol/L)	259 ± 185	186 ± 77	174 ± 72	0,04
Insulin OGTT	151 ± 98	110 ± 43	104 ± 40	0,10
Glukose 0h (mmol/L)	5,06 ± 0,52	4,93 ± 0,39	4,81 ± 0,49	0,17
Glukose 2h ^{*1} (mmol/L)	5,25 ± 1,20	4,92 ± 0,97	4,41 ± 0,90	0,02
Glukose OGTT ⁶	5,16 ± 0,78	4,92 ± 0,57	4,61 ± 0,60	0,02
Adiponectin	13,6 ± 5,2	14,5 ± 6,3	13,6 ± 5,2	0,81
Isoprostaner (ng/L)	0,53 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,46 ± 0,03	0,15
Vægt (kg)	71,1 ± 9,8	69,9 ± 8,5	70,0 ± 11,0	0,90
BMI (kg/m ²)	25,6 ± 3,1	25,1 ± 2,7	25,5 ± 3,3	0,85
Højde (cm)	166,5 ± 4,6	165,9 ± 6,8	165,4 ± 6,0	0,69
Alder (år)	62,3 ± 5,0	58,3 ± 3,5	59,9 ± 4,9	0,17
Taljeomkreds (cm)	91,0 ± 1,0	89,1 ± 7,3	90,2 ± 8,9	0,73
Rygere (antal)	5	5	6	-
Indtag fedt (g)	78,1 ± 16,6	70,7 ± 22,6	73,2 ± 20,4	0,77
Indtag fedt (E %)	34,4 ± 5,1	32,6 ± 7,4	32,9 ± 6,3	0,61
Indtag protein (g)	80,7 ± 21,2	78,1 ± 22,8	81,4 ± 19,6	0,77
Indtag protein (E %)	15,9 ± 3,3	16,1 ± 2,8	16,5 ± 2,7	0,72
Indtag kulhydrat (g)	240 ± 67	220 ± 50	225 ± 57	0,78
Indtag kulhydrat (E %)	46,2 ± 5,3	45,8 ± 7,6	45,3 ± 5,6	0,89
Indtag energi (kJ)	8719 ± 1860	8178 ± 1395	8432 ± 1737	0,57

	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	P-værdi (global)
Indtag mætte fedt (g)	28,8 ± 8,7	25,8 ± 11,1	27,1 ± 8,1	0,82
Indtag monoumættet fedt (g)	24,5 ± 5,2	22,8 ± 9,7	23,0 ± 7,4	0,93
Indtag polyumættet fedt (g)	12,0 ± 3,2	9,9 ± 3,8	10,7 ± 3,5	0,29
Indtag mættet fedt (E %)	12,7 ± 3,8	11,9 ± 4,2	12,3 ± 3,4	0,77
Indtag monoumættet fedt (E %)	10,8 ± 2,1	10,6 ± 4,1	10,4 ± 2,6	0,87
Indtag polyumættet fedt (E %)	5,3 ± 1,4	4,6 ± 1,5	4,8 ± 1,2	0,22
Blødt væv totalt (g)	69020 ± 9730	67705 ± 8173	67837 ± 10728	0,68
Fedtvæv totalt (g)	25700 ± 7731	25158 ± 7356	25311 ± 8315	0,98
Blødt væv overkrop (g)	32551 ± 5418	31577 ± 4499	31994 ± 5575	0,84
Fedtvæv overkrop (g)	11502 ± 4130	10838 ± 3532	11357 ± 4335	0,84
Blødt væv ben (g)	24469 ± 3779	24499 ± 3203	24060 ± 4056	0,91
Fedtvæv ben (g)	10144 ± 3387	10387 ± 3372	9863 ± 3223	0,87
Knogledensitet totalt (g/cm ²)	1,12 ± 0,10	1,13 ± 0,09	1,11 ± 0,09	0,82
Knogledensitet lænd (g/cm ²)	1,14 ± 0,18	1,07 ± 0,19	1,07 ± 0,16	0,25
Knogledensitet hoften (g/cm ²)	0,94 ± 0,12	0,93 ± 0,11	0,91 ± 0,10	0,68

^a Gennemsnit ± SD før intervention med t10,c12- og c9,t11-CLA (CLA-mix), c9,t11-CLA (mælke-CLA) eller en olivenolie kontrol, h = timer (hour), E % = % af energiindtag, OGTT = oral glukose tolerance test, ¹ mix vs, kontrol P=0,0049 ³ mix vs, kontrol P=0,04, mix vs, mælke P=0,035 ⁴ mix vs, kontrol P=0,017, mix vs, mælk P=0,045 ⁶ mix vs, kontrol P=0,012.

Tabel 4. Resultaterne efter 16 ugers intervention¹

	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	P-værdi (global)
Total kolesterol (mmol/L)	5,65±0,09	5,69±0,10	5,60±0,09	0,81
HDL kolesterol (mmol/L)	1,71±0,07 ^d	1,83±0,08	2,00±0,60 ^d	0,01
LDL kolesterol (mmol/L)	3,94±0,09	3,91±0,09	3,83±0,09	0,06
Triacylglycerol (mmol/L)	1,12 ± 0,06 ^a	1,09 ± 0,06	0,94 ± 0,05 ^a	0,01
Ratio total:HDL kolesterol	3,43±0,10 ^{ag}	3,05±0,10 ^a	2,86±0,07 ^g	<0,001
PAI-1 (ng/mL)	11,38±0,69 ^a	8,96±0,71 ^a	10,95±0,67	0,04
CRP ² (mg/L)	1,96±0,23 ^{ad}	1,16±0,14 ^a	1,11±0,12 ^d	0,01
IL-6 (ng/L)	1,61±0,28	1,40±0,31	1,88±0,28	0,51
TNF-α (ng/L)	1,83±0,06	1,83±0,06	1,90±0,06	0,66
MCP (ng/L)	218±9	227±10	217±8	0,67
sICAM (ng/mL)	242±4	240±4	239±4	0,88
sVCAM ³ (ng/mL)	455±13	451±13	453±12	0,02
FVII:c (arbejdsenheder)	1,29±0,03	1,33±0,03	1,31±0,02	0,62
Fibrinogen (g/L)	3,37±0,08 ^a	3,05±0,07 ^a	3,23±0,07	0,02
Insulin 0h (pmol/L)	41,6±2,4	40,9±2,4	40,3±2,3	0,93
Insulin 2h (pmol/L)	232±19	202±16,8	188±15	0,24
Insulin OGTT	136±10	122±9	115±8	0,32
Glukose 0h (mmol/L)	5,13±0,06	5,09±0,06	5,13±0,06	0,84
Glukose 2h (mmol/L)	5,29±0,22	5,31±0,23	4,99±0,21	0,53
Glukose OGTT	5,24±0,13	5,22±0,13	5,11±0,12	0,75
Adiponectin	11,9±0,4	12,6±0,5	12,5±0,4	0,48
Isoprostaner (ng/L)	1,28±0,09 ^{gh}	0,67±0,05 ^{ag}	0,50±0,04 ^{ah}	<0,001
Vægt (kg)	70,3±0,3 ^k	71,0±0,3 ^j	71,1±0,3 ^k	0,08
BMI (kg/m ²)	25,4±0,1 ^k	25,7±0,1 ^j	25,7±0,1 ^k	0,10
Indtag fedt (g)	74,6 ± 2,1	70,0 ± 2,3	75,7 ± 2,0	0,16
Indtag fedt (E%)	34,3 ± 1,0	31,5 ± 1,0 ^a	34,2 ± 0,9 ^a	0,03
Indtag protein (g)	74,8 ± 2,7	78,6 ± 2,8	77,4 ± 2,5	0,61
Indtag protein (E%)	15,6 ± 0,6	17,4 ± 0,7	16,0 ± 0,6	0,11
Indtag kulhydrat (g)	219 ± 6	221 ± 6	206 ± 5	0,13
Indtag kulhydrat (E%)	45,0 ± 1,1	46,4 ± 1,2	43,1 ± 1,0	0,10
Indtag energi (kJ)	8419 ± 320 ^a	7332 ± 312 ^{ab}	8103 ± 256 ^b	0,03
Indtag mættet fedt (g)	28,2 ± 1,2	26,3 ± 1,4	28,8 ± 1,2	0,36
Indtag monoumættet fedt (g)	24,6 ± 1,1	23,0 ± 1,2	26,1 ± 1,0	0,16
Indtag polyumættet fedt (g)	10,0 ± 0,7	10,1 ± 0,8	10,3 ± 0,6	0,97
Blødt væv total (g)	68028±323	68771±323	68917±304	0,11
Fedtvæv total (g)	24588±291 ^{aj}	25522±291 ^j	25672±274 ^a	0,02

	CLA-mix	Mælke-CLA	Olivenolie	P-værdi (global)
Blødt væv overkrop (g)	32067±218	32449±218	32472±205	0,34
Fedtvæv overkrop (g)	10011±169	10059±170	10169±161	0,82
Blødt væv ben (g)	24124±174	24423±174	24486±164	0,29
Fedtvæv ben (g)	9456±143 ^{dg}	10077±143 ^d	10208±135 ^e	<0,001
Knogledensitet total (g/cm ²)	1,12±≤0,01	1,12±≤0,01	1,11±≤0,01	0,38
Knogledensitet lænd (g/cm ²)	1,09±0,01	1,10±0,01	1,08±0,01	0,23
Knogledensitet hofte (g/cm ²)	0,93±≤0,01 ^l	0,92±≤0,01 ^l	0,92±≤0,01	0,06

¹Resultaterne er alle LSMean ± SEM, E % = % af energiindtag, ratio total kolesterol:HDL-kolesterol ²alle værdier under 10mg/L er inkluderet i analysen ³post hoc parvis sammenligning med Tukey-Kramer justering viste ingen forskelle mellem grupperne, Værdier i samme række med samme bogstav er forskellige fra hinanden: a,b,c (P<0,05) d,e,f (P<0,01) g,h,i (P<0,001) j, k (P<0,1),

