



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2021 60 stp

Fakultet for Kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Hovedveileder Professor Harald Carlsen

Effekt av kalsium på fordøyelse av fettsyrer og uttrykk av gener involvert i kolesterolhomeostase i mus

Effect of calcium on fatty acid digestibility and
expression of genes involved in cholesterol
homeostasis in mice

Marte Andréa Uglum

Matvitenskap – Mat, ernæring og helse

FORORD

Denne masteroppgaven er skrevet som en avslutning på et to-årig masterprogram i Matvitenskap – Ernæring og helse ved Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Prosjektet er gjennomført fra august 2020 til september 2021.

Først og fremst vil jeg få takke min hovedveileder Professor Harald Carlsen for god veiledning, inspirasjon og motivasjon. Uansett om vi diskuterer kolesterolregulering, mus, musikk eller TV-serier er du alltid like engasjert! Takk for at jeg fikk muligheten til å utføre masterprosjekt med deg som veileder.

Videre vil jeg takke min biveileder PhD-stipendiat Dimitrios Papoutsis for enorm hjelp og veiledning hele veien. Du har alltid hjulpet til når det har vært behov for hjelp med alt fra frysetørking til muselab til genekspressjon. Under lockdown brukte du mye av din dyrebare tid på analysene våre. Jeg er dypt takknemlig!

Jeg vil også få takke Hanne Marie Devle for utrolig god hjelp med ekstraksjon og analyse av fettsyrer. Uten din ekspertise ville vi aldri fått til det vi fikk til!

Takk til min gode venninne og PhD-stipendiat Anne Mari Herfindal for utrolig god hjelp til statistikk, støtte, og et godt vennskap.

Sebastian Meling, min gode venn og medstudent! Tusen hjertelig takk for et fantastisk samarbeid, og et godt vennskap. Jeg hadde ikke klart dette uten deg.

Til slutt vil jeg gjerne få takke familien og samboer for støtte og trøst i tunge tider. Dere har alltid skrytt av meg og minnet meg på at så lenge jeg gjør så godt jeg kan, så er det godt nok.

September 2020, Ås

Marte Andréa Uglum

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Hjerte- og karsykdom (HKS), og særlig aterosklerotisk sykdom, er globalt en stor helsebyrde og er den ledende dødsårsaken i verden. Høye konsentrasjoner av lavtetthet-lipoprotein (LDL) i blodet er assosiert med utvikling av aterosklerotisk plakk, og et høyt inntak av mettede fettsyrer (SFA) kan øke konsentrasjonen av LDL i blodet. Inntak av kalsium kan påvirke risiko for utvikling av HKS ved å danne uløselige komplekser med SFA i tarm ved fordøyelse. Kalsium-SFA-kompleksene absorberes ikke av enterocytene, men blir i stedet akkumulert i avføring og skilt ut.

Hensikt: Målet med dette masterprosjektet var å undersøke om kalsium og/eller fôrkilde kan ha en effekt på vektutvikling, fettmasse, avføringsmengde og innhold av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9 i avføring, og ekspresjon av gener involvert i kolesterolhomeostase.

Metoder: 60 C57BL/6JRj hannmus ble fordelt i 6 grupper (n = 10). 5 av gruppene ble føret med høyfett-diett laget på ost eller smør og syrefelt kasein, med lite kalsium (2 g/kg fôr), middels (7 g/kg fôr), eller mye kalsium (20 g/kg fôr). Den siste gruppen fungerte som en «sunn» referanse og ble føret med standard tørrfôr (lavfett).

Resultater: Mus på smør-diett med mest innhold av kalsium (20Ca) hadde lavere vekt ved siste dag enn mus på smør-diett med minst innhold av kalsium (2Ca) og mer avføring enn de andre høyfett-gruppene ($P < 0,05$). Høykalsium-gruppene hadde lavere tilsynelatende fordøyelighet av samtlige analyserte fettsyrer enn lavkalsium-gruppen ($P < 0,05$). Plasma totalkolesterol var lavere med økende mengde kalsium, men effekten var så vidt ikke signifikant ($P = 0,06$). mRNA-ekspresjon i lever av gener involvert i biosyntese av kolesterol (*Hmgcr* og *Hmgcs1*), opptak av kolesterol fra sirkulasjonen (*Ldlr*) og biosyntese av gallesyrer (*Cyp7a1*) var høyere i mus føret mest kalsium ($P < 0,05$).

Konklusjon: Resultatene foreslår at kalsium reduserer absorpsjon av SFA og øker produksjon og opptak av kolesterol i lever, og biosyntese av gallesyrer. Dette kan bidra til lavere kroppsvekt og en bedret lipidprofil i mus føret med høyere mengde kalsium.

ABSTRACT

Background: Cardiovascular diseases (CVD), and especially atherosclerotic heart diseases, is a global health burden and the leading cause of mortality worldwide. High concentrations low-density lipoprotein (LDL) in the blood is associated with development of atherosclerotic plaque, and high intake of saturated fatty acids (SFA) increase LDL plasma concentration. High dietary intake of calcium can possibly reduce risk of developing CVD by forming insoluble complexes with saturated fatty acids during digestion. These complexes are not absorbed by enterocytes but is instead excreted in faeces.

Aim: The aim of this project was to study effects of calcium and/or feed matrix (cheese or butter) on weight development, fat mass, faecal excretion, and content of C14:0, C16:0, C18:0 and C18:1*cis*9 in the faeces. Furthermore, we wanted to study effects of calcium expression on liver genes involved in cholesterol homeostasis.

Methods: 60 male C57BL/6JRj mice were random distributed in 6 groups (n =10). 5 groups were fed high-fat diets made on cheese or butter and casein with low (2 g/kg feed), medium (7 g/kg feed), or high (20 g/kg feed) amounts of calcium. The last group were fed standard low-fat chow diet and functioned as a “healthy” reference.

Results: Mice fed high calcium (20Ca) butter diet had lower total weight development than mice fed butter diet with low amounts of calcium (2Ca) ($P < 0,05$). High calcium diets produced more faeces and had reduced apparent digestibility compared to mice on low calcium diets ($P < 0,05$). Plasma total cholesterol was lower with more dietary calcium, but the effect was not significant ($P = 0,06$). mRNA expression of liver genes involved in cholesterol biosynthesis (*Hmgcr* and *Hmgcs1*), uptake of cholesterol from circulation to liver (*Ldlr*) and bile acid synthesis (*Cyp7a1*) was significantly higher in mice fed high amounts of calcium ($P < 0,05$).

Conclusion: The results suggest that dietary calcium reduces digestibility of SFA and increases cholesterol production and tissue uptake, and synthesis of bile acids. This may contribute to lower body weight and improved plasma lipid profile in mice fed higher calcium.

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract.....	IV
Liste over tabeller	VIII
Liste over figurer	IX
Forkortelser.....	X
1 INTRODUKSJON.....	1
1.2 Lipider fra mat	2
1.2.1 Fettsyrer.....	2
1.2.2 Acylglyseroler	4
1.2.3 Fosfolipider	5
1.2.4 Kolesterol og regulering av biosyntese	5
1.3 Fordøyelse, absorpsjon og distribusjon av lipider	7
1.3.1 Galle	8
1.3.2 Lipoproteiner og distribusjon av lipider	9
1.4 Kolesterol og sykdom.....	12
1.5 Meieriprodukter og Sykdom.....	13
1.6 Kalsium og effekt på lipider i kroppen	14
1.6.1 Effekt av kalsium på vektutvikling	14
1.6.2 Effekt av kalsium på fordøyelighet av lipider	15
1.6.3 Effekt av kalsium på kolesterol.....	15
2 HENSIKTEN MED PROSJEKTET	16
3 MATERIALER OG METODER.....	18
3.1 Dyreforsøk	18
3.1.1 Dyr og dyrehold	18
3.1.2 Etikk	18
3.1.3 Eksperimentelt.....	18
3.1.4 Innhenting av prøver	20
3.2 Diettene.....	22
3.2.1 Begrunnelse for kalsiummengdene i diettene	22

3.2.2	Råstoff og ingredienser	22
3.2.3	Tillaging av diettene	24
3.3	Analyse av fettsyrer i fôr og avføring	24
3.3.1	Ekstaksjon av lipider	24
3.3.2	Fraksjonering av lipider med fast-fase ekstraksjon	25
3.3.3	Derivatisering av fettsyrer	26
3.3.4	Analyse av fettsyrer med gaskromatografi-massespektrometri	26
3.3.5	Tilsynelatende fordøyelighet	28
3.4	Kolesterolnivå i plasma	28
3.5	Analyse av genekspressjon	28
3.5.1	RNA-ekstraksjon	28
3.5.2	cDNA-syntese ved revers transkripsjon	30
3.5.3	Design, bestilling og testing av primerpar for qPCR	31
3.5.4	Relativ kvantifisering ved qPCR	33
3.6	Statistiske analyser	36
4	RESULTATER	37
4.1	Fettsyreinnhold i fôr	37
4.2	Vekt og fettmengde i mus ved oppstart av prosjektet	38
4.3	Vektutvikling, fettprosent, energiinntak og avføring	39
4.4	Fordøyelse av fettsyrer	41
4.5	Glukose og plasmakolesterol	44
4.6	Genekspressjon	45
5	DISKUSJON.....	48
5.1	Hovedfunn	48
5.2	Effekt av kalsium på vektutvikling	49
5.3	Glukosekonsentrasjon og plasma-totalkolesterolkolesterol	50
5.4	Fettsyrer	51
5.5	Genekspressjon	52
5.6	Metodologiske betraktninger	54
5.7	Forslag til videre arbeid	56
6	KONKLUSJON.....	57

REFERANSER.....	58
------------------------	-----------

BILAG	62
--------------------	-----------

Bilag A – Detaljert tidsplan over museprosjekt.....	62
Bilag B – Dietter.....	62
Bilag C – Instrumenter, roboter og annet elektronisk utstyr	64
Bilag D – Programvare	65
Bilag E – Nettsider	65
Bilag F – ZRF-cocktail	66
Bilag G – Kit.....	66
Bilag H – Fettsyrer	66
Bilag I – Annet	67
Bilag J – Kjemikalier og reagenser.....	68
Bilag K – Spesifikke søksbetingelser ved design av primere.....	69
Bilag L – Primere	72

LISTE OVER TABELLER

Tabell 1.1 Systematiske, numeriske, omega og trivielle navn på noen kjente fettsyrer	4
Tabell 3.1 Temperatur- og tidsinnstillinger på kromatografen.	27
Tabell 3.2 Reaksjonsblanding for syntese av cDNA.....	31
Tabell 3.3 Temperatursyklus for syntese av cDNA	31
Tabell 3.4 Reaksjonsblanding for PCR ved test av primere	32
Tabell 3.5 Temperatursykluser for PCR ved test av primere	32
Tabell 3.6 Primerpar brukt ved qPCR.....	34
Tabell 3.7 Reaksjonsblanding for qPCR.....	35
Tabell 3.8 Temperatursyklus for qPCR.....	35
Tabell 4.1 Innhold av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1 <i>cis</i> 9 i de ulike diettene	37
Tabell 4.2 Kroppsvekt, fettmasse og fettprosent ved oppstart av prosjektet.....	38
Tabell 4.3 Tilsynelatende fordøyelighet av noen fettsyrer i smør- og ostegruppene	42
Tabell 4.4 Fastende blodglukose etter 5 uker intervensjon	44
Tabell 4.5 Fastende totalkolesterol i plasma etter 5 uker intervensjon.	44

LISTE OVER FIGURER

Figur 1.1 Eksempler på ulike typer fettsyrer.....	3
Figur 1.2 Regulering av SREBP2 ved lave nivåer av kolesterol i cellen.....	7
Figur 1.3 Regulering av SREBP2 ved høye nivåer av kolesterol i cellen.....	7
Figur 1.4 Lipoproteiner.....	11
Figur 3.1 Gruppedesign for museforsøk.....	19
Figur 3.2 Tidslinje for museprosjekt.....	19
Figur 3.3 Skjematisk framstilling av et typisk resultat ved qPCR.....	34
Figur 4.1 Utvikling av kroppsvekt i gram.....	39
Figur 4.2 Total prosent utvikling av kroppsvekt (A) og fett (B).....	40
Figur 4.3 Totalt energiinntak (A) og avføringsmengde per mus per uke (B).....	41
Figur 4.4 Sammenligning av fordøyelighet i mellom- og høykalsium-gruppene.....	43
Figur 4.5. Relativ mRNA ekspresjon av HMGCR (A), HMGCS1 (B), LDLR (C) og CYP7A1 (D) i smørgruppene.....	46
Figur 4.6 Relativ mRNA ekspresjon av HMGCR (A), HMGCS1 (B), LDLR (C) og CYP7A1 (D) i mellom- og høykalsiumgruppene.....	47

FORKORTELSER

cDNA	Komplementær DNA (<i>complementary DNA</i>)
Cyp7a1	Cytokrom P450 7A1; Kolesterol 7 alfa-hydroksylase (<i>Cholesterol 7 alpha-hydroxylase</i>)
DNA	Deoksyribonukleinsyre (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
FAME	Fettsyremetylester (<i>fatty acid methyl ester</i>)
HDL	Høy-tetthet lipoprotein (<i>high-density lipoprotein</i>)
HKS	Hjerte- og karsykdommer
HMG-CoA	Hydroksymetylglutaryl-koenzym
Hmgcr	HMG-CoA reduktase
Hmgcs1	HMG-CoA syntase 1
LDL	Lav tetthet lipoprotein (<i>low-density lipoprotein</i>)
Ldlr	LDL-reseptor
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MCFA	Mellomlange fettsyrer (<i>medium chain fatty acid</i>)
MUFA	Enumettede fettsyrer (<i>monounsaturated fatty acid</i>)
NL	Nøytrale lipider
PCR	Polymerase kjedereaksjon (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PUFA	Flerumettede fettsyrer (<i>polyunsaturated fatty acid</i>)
qPCR	Kvantitativ PCR (<i>quantitative PCR</i>)
RNA	Ribonukleinsyre (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Revers transkriptase
SCFA	Korte fettsyrer (<i>short chain fatty acid</i>)
SFA	Mettede fettsyrer (<i>saturated fatty acid</i>)
TAG	Triacylglyserol
TFA	Transfettsyrer (<i>trans fatty acids</i>)
VLDL	Veldig lav-tetthet lipoprotein (<i>very low-density lipoprotein</i>)

1 INTRODUKSJON

Hjerte- og karsykdommer (HKS) er den ledende dødsårsaken i verden og var i 2019 ansvarlig for 17,9 millioner tapte liv (32 % av alle dødsfall) (World Health Organization, 2020). I Norge er HKS den andre største dødsårsaken med 9 513 av totalt 40 534 dødsfall i 2020, rett bak kreft (11 081 døde) (Statistikkbanken, 2021). En av de viktigste årsakene til død av HKS knyttes opp til aterosklerose, også kalt åreforkalkning. Aterosklerose er en prosess som fører til innsnevring og forkalkninger av blodårer etterfulgt av lokal oksygenmangel i omkringliggende vev (Libby et al., 2019). Mindre blodårer er spesielt utsatt, og skjer dette i hjertets kransarterier, kan sykdommen føre til angina pectoris, eller hjerteinfarkt. I hjernen kan aterosklerose føre til hjerneslag, og i større blodårer (f.eks. aorta) kan aterosklerose ende i utposning (aneurisme), eller overrivning (ruptur). I perifere vev kan ubehandlet aterosklerose over tid føre til smerter ved bevegelse (røykebein), og i ytterste konsekvens nekrose og koldbrann. Utvikling av aterosklerose assosieres med for høye nivåer av og kolesterol (hyperkolesterolemi) i blodet. Hyperkolesterolemi assosieres med høyt energiinntak, med større bidrag fra mettede fettsyrer og *trans*-fettsyrer.

Det er vel kjent at kalsium fra mat er essensielt for god benhelse og sterke tenner, men det har lenge vært forsket på om kalsium også kan forbedre lipidprofil, og redusere risiko for HKS. Meieriprodukter inneholder naturlig mye kalsium og enkelte av disse produktene er knyttet til redusert risiko for HKS.

1.2 LIPIDER FRA MAT

Som forklart innledningsvis er høyt kolesterol en risikofaktor for utvikling av aterosklerose. Høyt kolesterol kan oppstå som et resultat av et høyt inntak av ulike lipider. Denne oppgaven starter derfor med en rask introduksjon til ulike lipider og reguleringsmekanismer, meieriprodukter og betydning for utvikling av aterosklerose.

Lipider, eller fettstoffer, omfatter flere grupper av ulike organiske hydrofobiske molekyler som er mer løselige i organiske løsningsmidler enn i vann (Barrett, 2014; Damodaran & Parkin, 2017; Drevon & Blomhoff, 2014). I næringsmidler kalles lipider for fett eller oljer, og er det mest energigivende næringsstoffet med 9 kcal per gram, til forskjell fra proteiner, karbohydrater og alkohol med henholdsvis 4, 4 og 7 kcal/g. Faktum at fett ikke binder vann, og fordi det er så energitett gjør det til det mest plass- og vektbesparende energilageret i kroppen. Energioverskudd som følge av høyere inntak enn forbruk, lagres derfor som fettstoffet triacylglyserol (TAG) i hovedsakelig fettvev. Det viktigste lipidet fra mat er TAG som bidrar med 90–95 % av energien fra lipider i mat (Iqbal & Hussain, 2009). Ved siden av energi og energilagring har fett fra mat flere viktige funksjoner i kroppen, som isolasjon og mekanisk beskyttelse, rolle som signalmolekyler og transkripsjonsregulatorer, ligander og kofaktorer i en rekke enzymatiske reaksjoner, og lipider kan være forløpere for andre viktige molekyler. Andre viktige fettstoffer fra mat inkluderer steroler, fosfolipider og fettløselige vitaminer.

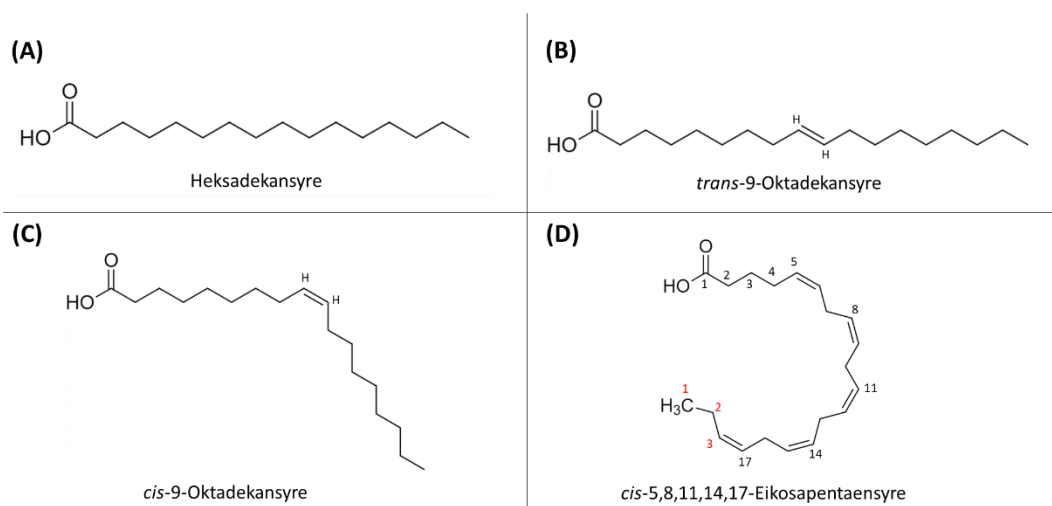
1.2.1 Fettsyrer

En fettsyre er en alifatisk hydrokarbonkjede med en karboksylsyregruppe (Damodaran & Parkin, 2017). Fettsyrer klassifiseres som mettede (SFA) eller umettede, der sistnevnte kan inneholde en eller flere dobbeltbindinger (henholdsvis MUFA og PUFA) mellom karbonenhetene (figur 1.1). SFA, som ikke inneholder noen dobbeltbindinger, vil ha en rett, utstrakt konfigurasjon (figur 1.1A). Den naturlige konfigurasjonen til en dobbeltbinding, *cis*-konfigurasjon, gir en knekk i hydrokarbonkjeden fordi hydrogenatomene i karbonenhetene på hver side av dobbeltbindingen peker i samme retning (figur 1.1C). Under raffineringsprosess av vegetabiliske og marine oljer kan umettede fettsyrer endre konfigurasjon til *trans*-konfigurasjon (industriell TFA). TFA kan formeres naturlig av hydrogenering i pattedyr

INTRODUKSJON

(animalsk TFA), og finnes derfor i mange animalske matvarer. I en TFA peker hydrogenatomene til hver sin retning, slik at kjeden blir rettere og ligner mer på en SFA (figur 1.1B). PUFA har to eller flere dobbeltbindinger, og dermed flere knekker i kjeden (figur 1.1D).

Fettsyrene i mat består stort sett av 4–26 karbonatomer, der antall karbonatomer som regel forekommer i partall (Ross et al., 2014). > 14 karbonatomer betegnes som lange fettsyrer (LCFA), 6–12 som mellomlange (MCFA), og 2 og 4 som korte fettsyrer (SCFA). Fettsyrer kan navngis systematisk, numerisk, eller trivielt.



Figur 1.1 Eksempler på ulike typer fettsyrer. (A) illustrerer en langkjedet mettet fettsyre. (B) er en langkjedet *trans*-fettsyre med én dobbeltbinding plassert mellom karbonenhet 9 og 10, telt fra karboksylenden. Fettsyren er helt rett, uten knekk til tross for dobbeltbinding. (C) er en langkjedet enumettet *cis*-fettsyre med dobbeltbinding plassert mellom karbonenhet 9 og 10, telt fra karboksylenden, med en knekk ved dobbeltbindingen. (D) er en langkjedet flerumettet *cis*-fettsyre, og en omega-3 fettsyre fordi første dobbeltbinding telt fra metylenden (røde tall) begynner på tredje karbonenhet. Figurene er laget i Chemdraw (bilag E).

Nomenklatur

Den systematiske nomenklaturen baseres på greske nummerprefikser etter hvor mange karbonatomer som finnes i hydrokarbonkjeden (f.eks.: 8 karboner er oktansyre og 16 karboner er heksadekansyre) (Damodaran & Parkin, 2017). Om fettsyren er umettet nummereres plassering av dobbeltbinding telt fra karbonet nærmest karboksylsyregruppen, og i tillegg bokstaveres dobbeltbindingen etter *cis*-(Z) eller *trans*-konfigurasjon (E) (Moss, 2013).

INTRODUKSJON

Numeriske navn beskriver antall karbonatomer (f.eks.: C16:0) i tillegg til dobbeltbindingenes antall, konfigurasjon og plassering (f.eks.: C18:1*cis*9) (Damodaran & Parkin, 2017). I ernæringsperspektiv beskrives umettede fettsyrer også som Omega (ω)-fettsyrer etter plassering av dobbeltbindingen fra metylenden (figur 1.1D). Mange fettsyrer har et trivielt navn, og de fleste navnene stammer fra hvor de første gang ble isolert (f.eks. palmitinsyre fra palmeolje). Et trivielt navn kan også være en forkortelse av systematisk navn: De mye omtalte marine ω -3-fettsyrene eikosapentaensyre og dokosaheksaensyre blir på folkemunne i Norge kalt for henholdsvis EPA og DHA. Liste over noen kjente fettsyrer navngitt systematisk, numerisk, omega og trivielt er presentert i (tabell 1.1).

Tabell 1.1 Systematiske, numeriske, omega og trivielle navn på noen kjente fettsyrer

	Systematisk navn	Numerisk navn	Omega	Trivielt navn
Mettede fettsyrer	Oktansyre	C8:0		Kaprylsyre
	Dodekansyre	C12:0		Laurinsyre
	Tetradekansyre	C14:0		Myritinsyre
	Heksadekansyre	C16:0		Palmitinsyre
	Oktadekansyre	C18:0		Stearinsyre
Umettede fettsyrer	(9Z)-Oktadekansyre	C18:1 <i>cis</i> 9	C18:1 ω 9	Oljesyre
	(9E)-Oktadekansyre	C18:1 <i>trans</i> 9		Elaidinsyre
	(9Z,12Z)-Oktadekadiensyre	C18:2 <i>cis</i> 9,12	C18:2 ω 6	Linolsyre
	(9Z,12Z,15Z)-Oktadekansyre	C18:3 <i>cis</i> 9,12,15	C18:3 ω 3	Alfalinolensyre
	(5Z,8Z,11Z,14Z)-Eikosatetraensyre	C20:4 <i>cis</i> 5,8,11,14	C20:4 ω 6	Arakidonsyre
	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eikosapentaensyre	C20:5 <i>cis</i> 5,8,11,14,17	C20:5 ω 3	EPA
(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Dokosaheksaensyre	C22:6 <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19	C22:6 ω 3	DHA	

Tabellen er inspirert av Damodaran & Parkin (2017), Ross et al. (2014) og IUPAC *Blue Book* (Moss, 2013).

1.2.2 Acylglyseroler

Fettsyrer i mat forekommer som regel esterifisert til glyserol (Damodaran & Parkin, 2017). De eksisterer som hovedsakelig som triestere og kalles triacylglyserol (TAG), men finnes også som mono- og diestere og kalles henholdsvis monoacylglyserol (MAG) og diacylglyserol (DAG). Posisjonene på glyserolenheten er nummererte etter stereokjemisk nummereringssystem og kalles *sn*1-, *sn*2- og *sn*3- (Mu & Høy, 2004). Lengde, mettetet og konfigurasjon er alle faktorer som er med på å bestemme egenskaper ved oljer, smør, margarin og andre fettkilder (Damodaran & Parkin, 2017). Smeltepunktet til en olje-/fettkilde bestemmes av pakkingen av TAG: jo tettere molekylene pakkes, desto høyere smeltepunkt.

INTRODUKSJON

Kortere fettsyrer har høyere smeltepunkt enn lengere fettsyrer, og umettede fettsyrer får lavere smeltepunkt med antall dobbeltbindinger på grunn av knekkdannelsen i hydrokarbonkjeden. TFA har rettere formasjon enn *cis*-fettsyrer, og har dermed høyere smeltepunkt. De termiske egenskapene ved fettsyrer gjenspeiler de fysiske egenskapene når de bygger opp cellemembraner som fosfolipider.

1.2.3 Fosfolipider

Den grunnleggende strukturelle enheten i de fleste biologiske membraner er fosfolipider (Geissler & Powers, 2011). På samme måte som for acylglyseroler består fosfolipider av fettsyrer esterbundet til glyserol, som gir hydrofobe egenskaper, men kun på *sn*1- og *sn*2-posisjonen. På *sn*-3-posisjonen er det bundet til en fosfatgruppe som igjen bindes til en base, og gir hydrofilt område. Både hydrofobe og hydrofile egenskaper i samme molekyl gjør fosfolipidene amfipatiske, og gir den unike evnen til å arrangeres til membraner der det hydrofile hodet med fosfatgruppen vender ut mot det ekstracellulære området, mens fettsyrene stikker innover og lager et hydrofobt miljø i senter. Kjedelengde og grad av mettetet i fosfolipidene bestemmer fluiditeten og egenskapene til cellemembranen (Geissler & Powers, 2011).

1.2.4 Kolesterol og regulering av biosyntese

Kolesterol er del av lipidklassen steroler som finnes i planter (fytosteroler) og dyr (Barrett, 2014). I dyr er kolesterol det viktigste steroleet og kan forekomme fritt (fritt kolesterol), eller bundet til en fettsyre (kolesterol-ester). Kolesterol er molekyl med flere viktige biokjemiske roller i kroppen. Den kjemiske strukturen til kolesterol gjør det overflateaktivt og lipidet kan dermed orientere seg i cellemembraner der det er viktig i stabilisering av strukturen. Kolesterol er i tillegg forløper for gallesyrer og mange viktige hormoner. Selv om kolesterol er essensielt for dyreliv er hyperkolesterolemi assosiert med negativ helse, og er særlig forbundet med sykdommer i hjerte- og karsystemet.

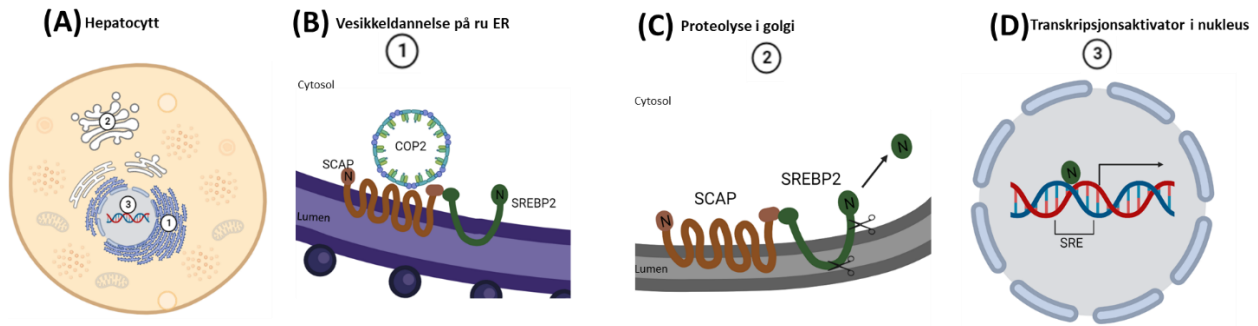
Kolesterol er forløper for syntese av galle, som er essensielt for normal fordøyelse av fett. Andre viktige derivater av kolesterol er steroider inkludert kjønnshormoner, kortikoider og vitamin D (Ross et al., 2014).

INTRODUKSJON

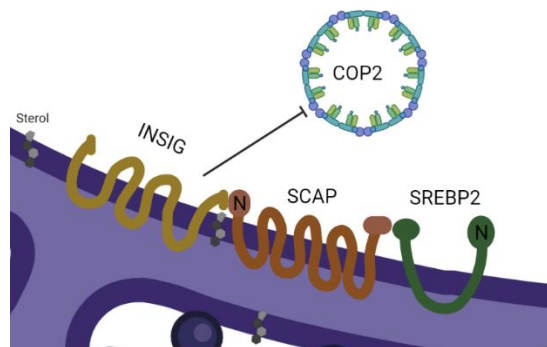
Det er noe tilgjengelig kolesterol i alt av animalske matvarer, men endogen biosyntese av kolesterol bidrar til mesteparten av mengden kolesterol i kroppen. I kroppen dannes omtrent ett gram kolesterol hver dag, som er 3 til 4 ganger høyere enn det som tilføres fra et gjennomsnittlig nordisk kosthold (Nordic Council of Ministers, 2014). Opptak av kolesterol fra kosten beskrives i delkapittel 1.3.

Kolesterolsyntese er en energikrevende prosess og består av en serie på rundt 30 reaksjoner fra acetyl-coenzym A (CoA) til kolesterol. Første steg innebærer syntese av 3-hydroxy-3-methylglutarat-coenzym A (HMG-CoA) fra acetyl-CoA og acetoacetyl-CoA katalysert av HMG-CoA syntase (HMGCS) (Ross et al., 2014). HMG-CoA blir videre konvertert til mevalonsyre av HMG-CoA reduktase (HMGCR). HMGCR er første hastighetsbegrensende enzym i kolesterol-biosyntese, og reguleres av sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) gjennom konsentrasjon av kolesterol (Luo et al., 2020). Det finnes tre isoformer av SREBP i pattedyr: SREBP1a, SREBP1c og SREBP2. SREBP2 regulerer spesifikt gener som koder for proteiner knyttet til kolesterol. SREBP2 syntetiseres som et integrert membranprotein på endoplasmatiske retikulum (ER) av ribosomer bundet til membranen (Goldstein & Brown, 2015). Proteinet består av (1) en NH₂-ende i cytosol (2) en midtre hydrofobisk del med to transmembran-seksjoner, og (3) en karboksyl-ende i cytosol. Karboksyl-enden er bundet til karboksyl-enden til SREBP2-cleavage activating protein (SCAP) (Goldstein & Brown, 2015; Luo et al., 2020). Dersom mengde kolesterol i ER-membranene faller under 5 % av totale lipider, pakkes SCAP/SREBP2 i COPII-beklede vesikler som leveres til golgi-apparatet (figur 1.2B). I golgi finnes det to proteaser: (1) Site-1 protease (S1P) er en serinprotease og kutter SREBP2 i løkken i lumen, (2) site-2 protease (S2P) er en metalloprotease og kutter av NH₂-enden (figur 1.2C). NH₂-enden, en aktiv transkripsjonsfaktor, fraktes til cellekjernen der den binder til sterol regulatory element (SRE) i promotoren til målgener som blant annet *Hmgcs* og *Hmgcr* (figur 1.2D). Dersom det er mye kolesterol til stede binder det til SCAP som dermed interagerer med insulin-induced gene (INSIG)-proteiner (figur 1.3). Dette fører til blokkering av COPII slik at det ikke dannes vesikler. SCAP/SREBP2 blir da værende på ER-membranen, og målgenene blir ikke transkribert. Biosyntese av kolesterol er nøye regulert, og når opptak av kolesterol fra tarm øker, synker uttrykk av SREBP2.

INTRODUKSJON



Figur 1.2 Regulering av SREBP2 ved lave nivåer av kolesterol i cellen. (A) Viser oversikt over hvor i cellen de ulike stegene foregår. På ru endoplasmatisk retikulum (B) binder SCAP til COPII-proteiner som innlemmer SCAP/SREBP2-komplekset i COPII-beklede vesikler (Goldstein & Brown, 2015). Vesikkelen leverer SCAP/SREBP2 til golgi-apparatet (C) der SREBP2 prosesseres av to proteaser (S1P og S2P), slik at den aktive N-enden kan entre nukleus (D). I nukleus binder N-enden til SRE og aktiverer gener som øker syntese og opptak av kolesterol. Figuren er laget i Biorender (bilag E).



Figur 1.3 Regulering av SREBP2 ved høye nivåer av kolesterol i cellen. Ved høye nivåer av kolesterol i cellen bindes kolesterol til SCAP som videre binder insulin-indusert gen- (INSIG) proteiner. Dette blokkerer COPII fra å binde SCAP, og fører til at SCAP/SREBP2-komplekset forblir på ER-membranen. På denne måten blir SREBP2 hemmet fra å aktivere transkripsjon av målgener (blant annet *Hmgcr*, *Hmgcs1* og *Ldlr*). Figuren er laget i Biorender (bilag E).

1.3 FORDØYELSE, ABSORPSJON OG DISTRIBUSJON AV LIPIDER

Fordøyelse av lipider begynner i munnen med sekresjon av lingual lipase fra kjertler på tunga (Iqbal & Hussain, 2009). Fordøyelsen fortsetter i magesekken der aktiviteten til lingual lipase øker, og sammen med gastrisk lipase hydrolyseres 10–30 % av TAG til DAG og frie fettsyrer (FFA) (Mu & Høy, 2004). I magesekken begynner også emulgering av fett fra maten og det dannes små fettdråper som slippes ut i øvre del av tynntarm (duodenum). I duodenum stiger pH som et resultat av utskillelse av bikarbonat. Samtidig blir det også utskilt

INTRODUKSJON

fordøyelsesenzymmer og gallesyrer fra henholdsvis pankreas og galleblære (Barrett, 2014). Økning i pH fører til at fettsyrer som ble hydrolysert i magesekken blir ionisert og plasserer seg på overflaten til fettdråpene for å stabilisere emulsjonen. Den gastriske hydrolysen fører også til bedret hydrolyse i duodenum ved økt løselighet for resterende TAG, i tillegg til at frie fettsyrer stimulerer til utskillelse av kolesystokinin (CCK) som igjen fører til økt utskillelse av pankreatiske enzymer og galle (Mu & Høy, 2004). Gallesyrer emulgerer fettdråpene ytterligere og øker overflaten slik at pankreatisk lipase lettere kommer til og hydrolyserer TAG og DAG til MAG og FFA. I pankreatisk fordøyelsesvæske befinner det seg også kolesterol esterase, også kalt uspesifikk esterase, som hydrolyserer esterbindinger på kolesterol-estere. Den kalles uspesifikk esterase fordi den, i tillegg til å hydrolysere kolesterol-estere, også har affinitet for fettløselige vitaminer. Gallesyrer og lipolytiske produkter formerer strukturer kjent som miceller og beveger seg til absorberende enterocytter i tynntarmen, der komponentene absorberes.

Korte fettsyrer kan diffundere over plasmamembranen ved passiv diffusjon, mens mellomlange og lange fettsyrer transporteres aktivt av enten CD36 eller fettsyre-transportprotein 4 (FATP4) (Wang et al., 2013). Kolesterol absorberes via transporterproteinet Niemann–Pick C1 lik 1 (NPC1L1) som befinner seg på absorberende enterocytter i tynntarmen. NPC1L1 sørger for opptak av kolesterol til enterocytene ved vesikulær endocytose.

1.3.1 Galle

Som nevnt tidligere er galle helt essensielt for fordøyelse og absorpsjon av lipider (Barrett, 2014). Biosyntese av gallesyrer kan foregå på to ulike måter: klassisk (eller nøytral) og alternativ (eller sur). Hos mennesker er den klassiske retningen viktigst og den alternative retningen er noe mer aktiv i gnagere, sammenlignet med mennesker (Chiang & Ferrell, 2020). Den klassiske retningen initieres av Kolesterol 7 alpha-hydroksylase (CYP7A1), som er medlem av cytokrom P450-familie 7, subfamilie A1, og uttrykkes utelukkende i lever. CYP7A1 hydroksylerer kolesterol til 7 α -hydroksykolesterol og er det eneste hastighetsbegrensende enzymet i syntese av gallesyrer. 7 α -hydroksykolesterol blir deretter konvertert til 7 α -hydroksy-4-kolesten-3-on (C4). C4 er felles forløper for de to viktigste gallesyrene kolsyre (CA: *cholic acid*) og kenodeoksykolsyre (CDCA: *chenodeoxycholic*

INTRODUKSJON

acid). CA og CDCA konjugeres enzymatisk til aminosyrene glycin eller taurin av og danner tauro- eller glyko-kolsyre og tauro- eller glyko-kenodeoksykolsyre. I mus konjugeres nesten alle gallesyrer til taurin, mens hos mennesker konjugeres tre fjerdedeler til glycin mens resten til taurin.

Konjugerte gallesyrer, ofte kalt gallesalter, har høyere løselighet i vann og kan ikke krysse cellemembraner passivt, sammenlignet med ukonjugerte gallesyrer. Så fort gallesyrene konjugeres eksporteres de fra leverceller til galleblære via gallesalt eksportpumpe (BSEP: *bile salt export pump*). Som nevnt tidligere slippes gallesyrene ut i duodenum for å emulgere fett under et måltid. De aller fleste gallesyrende (95 %) reabsorberes i terminalt ileum, og returneres til lever via det enterohepatiske sirkulasjonssystemet. Enterohepatisk sirkulasjon av galle spiller en viktig rolle for resirkulering av galle, absorpsjon av næringsstoffer i tillegg til regulering av lipidmetabolisme (Chiang, 2009). Syntese av gallesyrer er den viktigste prosessen for katabolisme av kolesterol i mennesker. Regulering av syntese styres av en kompleks feedback-mekanisme som enda ikke er helt forstått (Chiang & Ferrell, 2020). Det er to responselementer som binder transkripsjonsfaktorer for basal transkripsjon av *Cyp7a1*. Reabsorbte gallesyrer i enterohepatisk sirkulasjon trigger kaskadereaksjoner som ender i blokkering av transkripsjonsaktivatorer.

Det må nevnes at galle i mus hovedsakelig består av hydrofile gallesyrer: murikolsyre og kolsyre, og er veldig forskjellig fra menneskelig galle bestående av CDCA, CA og deoksykolsyre. (Chiang, 2009)

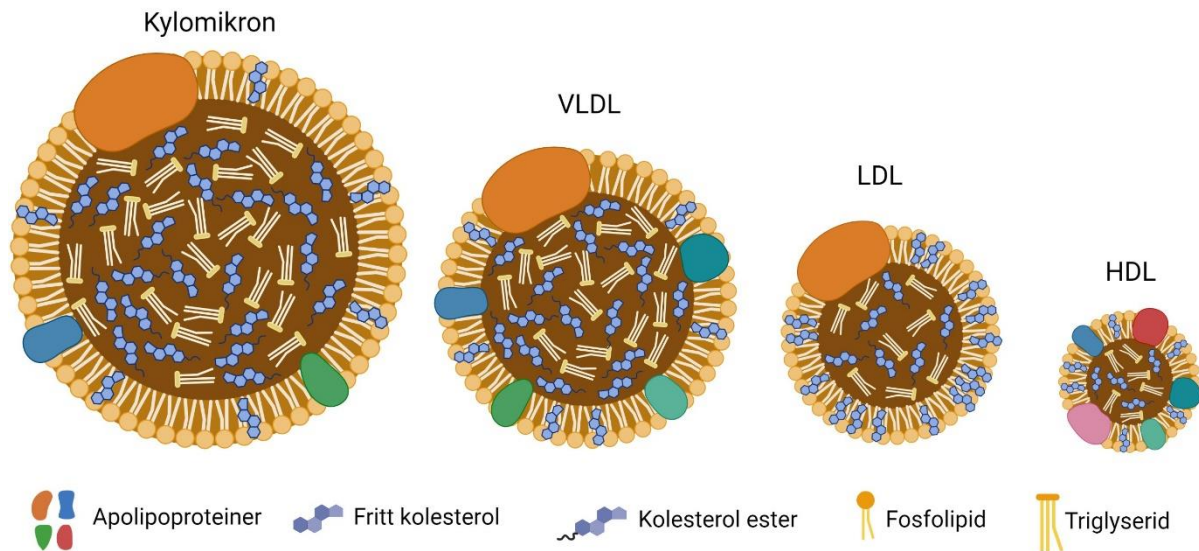
1.3.2 Lipoproteiner og distribusjon av lipider

Etter opptak i enterocytene reesterifiseres FFA og MAG til TAG, og pakkes med kolesterol, fettløselige vitaminer og karotenoider omsluttet av en membran av fosfolipider, noe fritt kolesterol og apolipoproteiner (Mu & Høy, 2004) (figur 1.3). Disse partiklene kalles kylomikroner og er de største av en gruppe transportpartikler kjent som lipoproteiner. Kjernen til kylomikroner inneholder hovedsakelig TAG (80–95 %), som bestemmer partikkelstørrelse, i tillegg til kolesterol og noe fettløselige vitaminer og karotenoider. Formasjon av kylomikroner er derfor helt essensielt for transport av lipider fra mat til sirkulasjonen. Sammensetningen av TAG varierer med fettinnholdet i maten som spises, mens type

INTRODUKSJON

fosfolipid stort sett er den samme fordi disse kommer fra gallesyrer (Mu & Høy, 2004). Via eksocytose eksporteres kylomikronene ut av enterocytene over i lymfevener, og derifra ut i blodsirkulasjonen i dyptliggende vener under kragebenet (*vena subclavia*), via lymfenettets hovedåre (*ductus thoracicus*). I sirkulasjonen blir TAG i kylomikronene hydrolysert av lipoprotein lipase (LPL) på kapillæroverflaten til ulike vev. Hydrolyse av TAG fører til opptak av fettsyrer til nærliggende vev, og etterlater kylomikronrester som deretter tas opp i lever. Videre transport av kolesterol og andre lipider til ekstrahepatiske vev begynner med dannelsen av lipoproteiner med veldig lav tetthet (VLDL: *very-low-density lipoprotein*) på ER i lever. VLDL består for det meste av TAG (55–80 %), men inneholder også noe kolesterol (5–15 %) omsluttet av fosfolipider og apolipoproteiner. Størrelsen varierer avhengig av mengde TAG, slik som for kylomikroner. VLDL skilles ut i sirkulasjonen, leverer TAG til ekstrahepatiske vev gjennom aktiv LPL, og konverteres dermed til lav-tetthet lipoprotein (LDL: *low-density lipoprotein*). Det er funnet VLDL-partikler i lymfesystemet, skilt ut fra enterocytene (Mu & Høy, 2004). I fastende fase, når nivået av lipider er for lavt for å drive dannelse av kylomikroner, dannes VLDL. Siden mye av TAG i VLDL blir avlevert til ekstrahepatisk vev, vil andelen kolesterol i LDL øke (LDL: 40–50 %). LDL inneholder også litt TAG (5–15 %), men fungerer som hovedtransportør av kolesterol til perifere vev (Ross et al., 2014). Revers kolesterol-transport involverer frakting av kolesterol fra perifere vev og tilbake til lever for utskillelse i tarm for ekskresjon. Lipoproteinet ansvarlig for dette er høy-tetthet lipoprotein (HDL: *high density lipoprotein*). De ulike lipoproteinene er presentert i figur 1.4.

INTRODUKSJON



Figur 1.4 Lipoproteiner. Figuren viser en oversikt over de ulike lipoproteinene (Kylomikron, VLDL, LDL og HDL). Kylomikroner er de største lipoproteinene og frakter lipider fra enterocytene, gjennom lymfevener og over i blodbanen i dyptliggende vener under kragebenet (*vena subclavia*). VLDL er mindre enn kylomikronene, blir dannet i lever og frakter hovedsakelig TAG til perifere vev. Etter avlevering av TAG konverteres VLDL til LDL, som er et mindre lipoprotein og inneholder større andel kolesterol. Det minste lipoproteinet er HDL, og utfører revers kolesterol-transport. Lipoproteinene består av TAG og kolesterol omsluttet av en membran av fosfolipider, apolipoproteiner og kolesterol. Figuren er laget i Biorender (bilag E).

LDL-reseptor

LDL, som er hovedtransportør av steroler til celler for vekst og hormon- eller galleproduksjon, tas opp via LDL-reseptor (LDLR) (Luo et al., 2020). LDLR bidrar til den viktigste mekanismen for opptak av kolesterol fra sirkulasjonen og er derfor essensielt for kolesterolhomeostase. Reseptoren er uttrykt på plasmamembranen i de fleste celler der den fanger sirkulerende LDL via ligandbindende domene, og rekrutterer diverse proteiner inkludert clathrin. LDL blir på denne måten inkorporert i en clathrin-bekledd vesikkel og entrer cellen via endocytose (Goldstein & Brown, 2009; Morris & Cooper, 2001). LDLR-LDL-komplekset dissosierer i endosomet grunnet lav pH, og LDLR fraktes tilbake til membranoverflaten, via endosomal resirkuleringskompleks, for flere runder med opptak. Dersom det ikke er behov for mer opptak av kolesterol fra sirkulasjonen føres LDLR isteden til lysosomer for degradering. Fra endosomet fraktes LDL videre til lysosomer der kolesterol estere hydrolyseres av lysosomal lipase for å danne kolesterol (Luo et al., 2020). Kolesterol

INTRODUKSJON

blir deretter fraktet til cellemembranen eller ER-membranen der den fungerer som sensor for SREBP2/SCAP-regulering.

Ldlr er et av målgenene til SREBP2 (ved siden av blant annet *Hmgcr* og *Hmgcs1*), som tidligere nevnt aktiveres ved lite tilstedeværelse av kolesterol på ER-membranen. I polariserte celler (f.eks.: tarm- og leverceller) er LDLR tilknyttet den basolaterale cellemembranen.

Viktigheten av LDLR i kolesterolhomeostase vises tydelig ved manglende funksjon eller fravær av proteinet. Dysfunksjon av LDLR grunnet mutasjoner i arvematerialet resulterer i familiær hyperkolesterolemi med symptomatisk høy konsentrasjon av LDL i blodet (Terasaka et al., 2007).

1.4 KOLESTEROL OG SYKDOM

Dannelse av aterosklerose er en kompleks prosess initiert av inflammatoriske og oksidative mekanismer. Aterosklerotisk plakk formeres i intima, det innerste laget av blodårevæggen, etter endotelet (Libby et al., 2019). Skade på endotelet, som følge av blant annet røyking, høyt blodtrykk og diabetes mellitus, fører til akkumulering av LDL-partikler i intima.

Akkumuleringen av LDL-partikler trigger immunforsvarets makrofager (utviklet fra sirkulerende monocytter), som via «scavanger»-reseptorer binder og absorberer LDL, og blir til skumceller. I tillegg til makrofager aktiveres også T-lymfocytter. Aktivering av både makrofager og T-lymfocytter resulterer i lokal produksjon av cytokiner som aktiverer enda flere inflammatoriske celler. T-cellene skiller også ut vekstfaktorer og fører til migrering av glatte muskelceller fra media til intima. Etter hvert som plakket utvikles stimuleres glatte muskelceller til å produsere collagen og elastin som stabiliserer plakket. Dersom plakket sprekker vil det rekruttere blodplater, som kan i verste fall tette åren helt og det oppstår iskemisk skade.

Hvordan overflødig LDL i blodet fører til aterosklerose er fremdeles uklart. LDL-partikler er utsatt for oksidering (oxLDL) og forhøyet nivå av oxLDL i blodet er blitt assosiert med risiko for hjerte- og karsykdommer (HKS) (Libby et al., 2019; Terasaka et al., 2007). Det er fortsatt usikkerhet i den nøyaktige mekanismen, og teorien om oxLDL har skapt en nye spørsmål om det kun er oxLDL, vanlig LDL, små og tette LDL eller en blanding av alle, som utgjør risiko for utvikling av aterosklerose (Libby et al., 2019; Ross et al., 2014; Terasaka et al., 2007).

INTRODUKSJON

Til forskjell fra LDL der høye nivåer relateres til utvikling av aterosklerotisk HKS, er HDL-nivåer i plasma omvendt relatert (Rader, 2006; Terasaka et al., 2007). En av de mest beskyttende rollene til HDL på utvikling av aterosklerose er revers kolesteroltransport, en mekanisme der overflødig kolesterol i skumceller fraktes tilbake til lever for utskillelse i galle og avføring.

Statiner er kolesterolsenkende medisiner. Når statiner inntas ender det fort opp i lever der det binder og blokkerer HMGCR, og dermed syntese av kolesterol (Goldstein & Brown, 2009). Fordi syntese av kolesterol bidrar til det meste av kolesterolet i kroppen vil blokkering av HMGCR føre til lavere konsentrasjon. Lavere konsentrasjon av kolesterol aktiverer prosessering av SREBP2 og øker uttrykk av *Ldlr*. SREBP2 øker også uttrykk av *Hmgcr* og *Hmgcs1*, men fordi statiner blokkerer aktiviteten til HMGCR øker ikke konsentrasjon av kolesterol. Nye LDLR fjerner LDL fra blodet utfallet er at mengde kolesterol i lever normaliseres, mens LDL-kolesterol i blodet holdes lavt. LDLR binder ikke HDL, slik av nivåer av dette ikke synker.

1.5 MEIERIPRODUKTER OG SYKDOM

Helsedirektoratet anbefaler norsk befolkning et inntak av fett på 25–40 E%, på bakgrunn av *Nordic Nutrition Recommendations* (Nasjonalt råd for ernæring, 2011; Nordic Council of Ministers, 2014). Videre anbefalinger inkluderer inntak av *cis*-MUFA på 10–20 E%, *cis*-PUFA på 5–10 E%, SFA < 10 E%, og TFA så lavt som mulig. Den store *Landsomfattende kostholdsundersøkelsen blant menn og kvinner i Norge i alderen 10–70 år, 2010–11* (NORKOST 3) avslørte at inntaket i norsk befolkning var innenfor anbefalingene på totalt fett (34 E%), *cis*-MUFA (12 E%), *cis*-PUFA (6,2 E%), men at SFA lå over anbefalingene med et inntak på 13 E% (Totland et al., 2012). En av de største bidragsyterne for det høye inntaket av SFA var ost som stod for 20 %. Matvaregruppene «smør, margarin og oljer» og «kjøtt og kjøttprodukter» stod også for 20 % hver av inntaket.

Meieriprodukter er en viktig næringsrik matvaregruppe i nordisk kosthold, og er gode kilder til protein, fett, vitaminer og mineraler. Fettet i mange meieriprodukter består av mye SFA og noe TFA og kolesterol, som er blitt assosiert med økte nivåer av LDL, som igjen er en risikofaktor for utvikling av HKS (Nasjonalt råd for ernæring, 2011; Thorning et al., 2017). I

INTRODUKSJON

nordiske anbefalinger inkluderes meieriprodukter som viktig næringskilde, men det anbefales å velge produkter med redusert mengde fett for å unngå høyt inntak av SFA, TFA og kolesterol (Nordic Council of Ministers, 2014). Det finnes derimot ingen overbevisende bevis på at meieriprodukter øker risiko for HKS. Flere metaanalyser finner ingen assosiasjoner mellom meieriprodukter og død av HKS (Alexander et al., 2016; Guo et al., 2017; Larsson et al., 2015; Mullie et al., 2016).

Melk og meieriprodukter er hovedkilden til kalsium i nordiske land, og ost inneholder spesielt mye kalsium (750–940 mg per 100 g) (Nordic Council of Ministers, 2014). En mulig årsak til hvordan ost kan ha en beskyttende effekt på sykdom innebærer formasjon av uløselige komplekser med kalsium og fett i tynntarm (Gacs & Barltrop, 1977; Kjølback et al., 2017; Mu & Høy, 2004; Thorning et al., 2017; Torcello-Gómez et al., 2018). Lange SFA som blir igjen på overflaten av lipiddråpene under hydrolyse i tynntarm, før formering av miceller, kan danne uløselige komplekser med kalsium. Disse uløselige kompleksene kalles kalsiumsåper. Kalsiumsåpene er ikke tilgjengelig for opptak, men fortsetter ned tarmsystemet og ut i avføring. På denne måten absorberes færre lange SFA, og dermed øker ikke LDL i sirkulasjonen.

1.6 KALSIMUM OG EFFEKT PÅ LIPIDER I KROPPEN

1.6.1 Effekt av kalsium på vektutvikling

Overvekt og høyt kolesterol er begge assosiert med økt risiko for aterosklerose, som igjen gir økt risiko for HKS. En mulig sammenheng mellom kalsiuminntak og redusert kroppsmasse har vært studert siden 1984 (McCarron et al., 1984), men flere studier og metaanalyser har varierende konklusjoner. Noen studier rapporterer lavere vekt ved høyt inntak av kalsium sammenlignet med lavt inntak av kalsium (Davies et al., 2000; Jacqmain et al., 2003; Papakonstantinou et al., 2003).

En studie brukte rotter føret med høyfett-diett og ulike mengder kalsium som modell for å studere effekt av kalsium på en rekke risikofaktorer knyttet til HKS (Alomaim et al., 2019). De fant ingen sammenheng mellom økt mengde inntak av kalsium og reduksjon av vekt. Derimot fant de lavest vekt og fettmasse i rottene matet med lavest mengde kalsium (0,75 g

INTRODUKSJON

Ca/kg fôr) sammenlignet med andre grupper med mer kalsium (2, 5, 10 og 20 g Ca/kg fôr). De antyder at dette var på grunn av et lavere energiinntak, og at et så lavt kalsiuminntak (0,75 g Ca/kg fôr tilsvarer 16 % av daglig anbefalt inntak) er et uvanlig lavt inntak for den generelle befolkning. En studie på ovariektomerte hamstere fant ingen forskjell i vekt eller matinntak etter en intervensjon der hamsterne ble matet med kalsiummengder tilsvarende mangeltilstand, utilstrekkelig, adekvat og tilstrekkelig (Ma et al., 2011).

1.6.2 Effekt av kalsium på fordøyelighet av lipider

En teori på hvorfor enkelte finner mindre vekt hos individer med høyere inntak av kalsium kan komme av økt mengde fett i avføring. En metastudie basert på 17 andre studier rapporterer en effekt av kalsium på økt fett i avføring (Christensen et al., 2009). Alomaim og medarbeidere analyserte lipider i rottenes fôr og avføring for å estimere fordøyelighet av fettsyrer og kolesterol i de ulike gruppene matet med ulik mengde kalsium (Alomaim et al., 2019). Rottene på fôr med høye doser kalsium hadde større mengder fett i avføringen, og de viste nedsatt tilsynelatende fordøyelighet av alle fire fettsyretypene (SFA, MUFA, PUFA og TFA). Størst var effekten på TFA etterfulgt av SFA.

1.6.3 Effekt av kalsium på kolesterol

Økt inntak av SFA til fordel for PUFA har vist å øke nivå av LDL i plasma (Müller et al., 2001). På samme måte har et økt inntak av PUFA og MUFA til fordel for SFA vist å senke nivå av LDL i plasma. En studie har vist at daglig inntak av kalsium korrelerer negativt med plasma LDL kolesterol, totalkolesterol og totalkolesterol:HDL ratio i mennesker (Jacqmain et al., 2003). Alomaim og medarbeidere har vist at kalsium har en effekt på genekspressjon av gener involvert i syntese av kolesterol (*Hmgcr* og *Hmgcs1*), opptak av LDL fra sirkulasjonen (*Ldlr*) og esterifisering av kolesterol (*Acat2*) (Alomaim et al., 2019). En dansk studie observerte assosiasjon mellom høyere kalsiuminntak og bedret lipidprofil ved lavere totalkolesterol og LDL (Kjølbæk et al., 2017).

2 HENSIKTEN MED PROSJEKTET

Denne masteroppgaven er en del av et større samarbeidsprosjekt mellom NMBU, NTNU, UiO og TNO (Nederland). Prosjektet har navnet LipidinflammaGenes og har som hovedformål å studere TAG fra norske animalske produkter, og på hvilken måte dette kan påvirke risiko for HKS, metthetsfølelse og inflammasjon.

Selv om mekanismen foreløpig er uklar, er det stor enighet om at SFA øker nivået av LDL i blodet, og derfor anbefales det å redusere inntaket av matvarer med mye SFA. En av de største bidragsyterne for inntak av SFA i nordiske land er ost, men det ser ikke ut til at det er en sammenheng mellom ost og risiko for sykdom. En teori på hvorfor ost heller viser beskyttende effekt innebærer det høye nivået av kalsium, som kan danne uløselige komplekser med ioniserte SFA i tarm, og reduserer dermed opptaket av disse. For å undersøke denne teorien ble det utviklet en metode for å ekstrahere fettsyrer fra museavføring, for å analysere innholdet av fett. En naturlig hypotese på effekter av økt ekskresjon av SFA innebærer mindre vektøppgang, større mengde avføring og endret nivå av LDL i plasma. Videre skal det undersøkes om kalsium påvirker totalkolesterol i plasma og uttrykk av gener involvert i kolesterol-biosyntese (*Hmgcs1* og *Hmgcr*), opptak av kolesterol fra sirkulasjonen via LDLR (*Ldlr*) og syntese av gallesyrer (*Cyp7a1*).

Spesifikke mål inkluderer:

- I. Å undersøke om kalsium påvirker utvikling av vekt og fettmasse, energiinntak og avføringsmengde i mus matet med høyfett-diett.
- II. Å undersøke om høy dose kalsium fører til redusert opptak av ulike fettsyrer i mus, og om naturlig kalsium i ost gir andre utslag enn tilsatt kalsiumfosfat i fôr laget på smør og syrefelt kasein.
- III. Å undersøke om kalsium har en effekt på totalkolesterol i plasma. Videre skal det undersøkes om naturlig kalsium fra om fôrkilde kan ha en effekt (fôr basert på ost eller smør og syrefelt kasein).
- IV. Å undersøke om høy dose kalsium påvirker uttrykk av gener i lever involvert i kolesterol-biosyntese (*Hmgcs1* og *Hmgcr*), opptak av kolesterol til lever fra sirkulasjonen (*Ldlr*), og syntese av galle (*Cyp7a1*). I tillegg skal det undersøkes om

HENSIKTEN MED PROSJEKTET

naturlig kalsium fra ost gir andre resultater enn tilsatt kalsiumfosfat i fôr laget på smør og syrefelt kasein.

3 MATERIALER OG METODER

Følgende metoder ble utført høst/vinter 2020 og vår/sommer 2021 ved NMBU. Lister over detaljert tidsplan, diettkomposisjon, programvarer, instrumenter, materialer, kjemikalier og andre reagenser er oppført i bilag A–L.

3.1 DYREFORSØK

3.1.1 Dyr og dyrehold

60 C57BL/6JRj hannmus ble kjøpt fra Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankrike). Ved ankomst var musene seks uker gamle. Dyrene ble oppstallet parvis i individuelt ventilerte engangsbur (Innovive, San Diego, CA) i kontrollerte omgivelser (temperatur: 23–26°C; luftfuktighet: 45–55 %; 12t/12t lys/mørkesyklus med gradvis opp- og nedbelysning (hhv. 06:00 og 18:00). Lysintensiteten i burene ble i «dagperioden» anslått til ca. 30 lux. Burene inneholdt sagflis-underlag, og var beriket med hus, løpehjul og trepinner. I akklimatiseringsperioden (11–15 dager) ble musene gitt standard tørrfôr (RM1 (E), Special Diets Services, Essex, UK) og vann *ad libitum*, og hadde daglig tilsyn.

3.1.2 Etikk

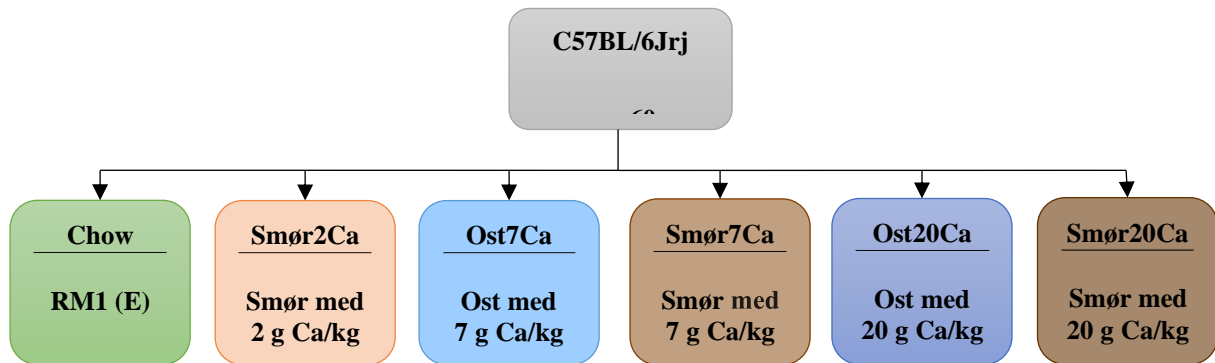
Eksperimentell protokoll og prosedyrene er fulgt i henhold til nåværende retningslinjer for dyrehold og bruk av dyr i forskning. Studien er godkjent av mattilsynet med FOTS ID: 25541.

3.1.3 Eksperimentelt

Etter akklimatiseringsperioden ble burene inndelt i 6 ulike diettgrupper ($n = 10/\text{diett}$); Chow, høyfett-dietter basert på smør med 2 g Ca/kg fôr (Smør2Ca), ost med 7 g Ca/kg fôr (Ost7Ca), smør med 7 g Ca/kg fôr (Smør7Ca), ost med 20 g Ca/kg fôr (Ost20Ca), og smør med 20 g Ca/kg fôr (Smør20Ca) (figur 3.1). Chow (standard vedlikeholdsfôr for gnagere: RM1 (E)) ble kjøpt fra Special Diets Services. Øvrige dietter ble tilberedt på NMBU og fremgangsmåte er

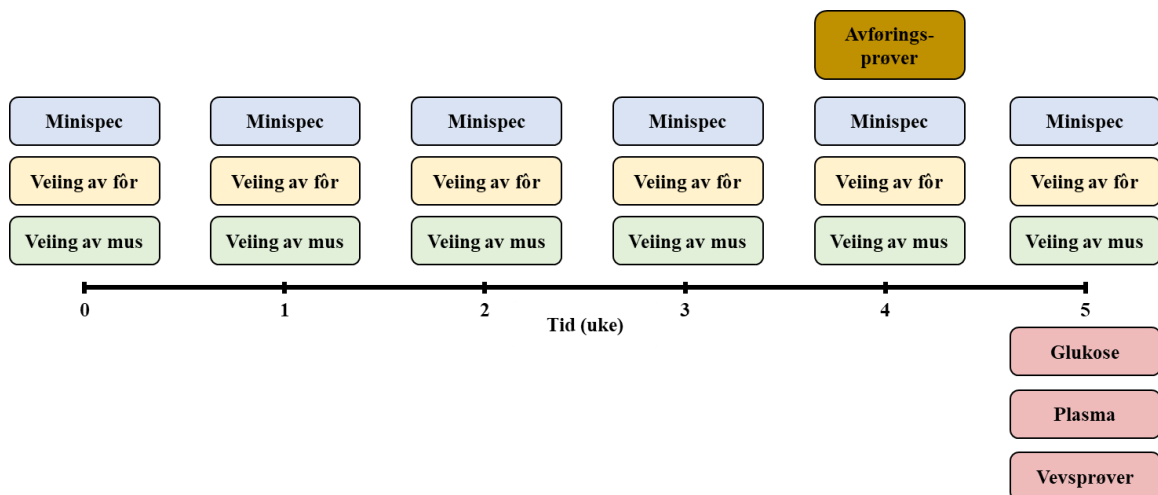
MATERIALER OG METODER

beskrevet i delkapittel 3.2. Løpehjul ble fjernet fra burene ved dag 0 av intervensjonen for å fremme vektoppgang.



Figur 3.1 Gruppedesign for museforsøk.

Kroppsvekt, kroppssammensetning og fôrintak ble registrert hver uke, og i uke 4 ble det samlet avføringsprøver. For å måle kroppssammensetning ble det benyttet en Bruker Minispec LF50 mq 7,5. Brukers Minispec ga målinger på fett-, muskelmasse og fri kroppsvæske, men det er kun fettmasse det brukes videre i dette prosjektet. På termineringsdagen ble dyrene fastet i 4 timer før glukosemåling etterfulgt av anestesering, plasmablodprøver i form av hjertepunktur, etterfulgt av cervikal dislokasjon for etisk terminering. Etter terminering ble det samlet vevsprøver fra tynntarm, lever og epididymalt fett. Av vevsprøvene er kun prøver fra lever analysert i denne oppgaven. Tidslinje for museforsøket er gitt i figur 3.2.



Figur 3.2 Tidslinje for museprosjekt

MATERIALER OG METODER

Burene ble fordelt ut over fem ulike ukedager, med ett bur fra hver gruppe hver dag. Denne inndelingen ble holdt konstant alle ukene slik at alle musene fikk samme behandling over like lang tid. Mer detaljert tidsskjema er gitt i bilag A.

3.1.4 Innhenting av prøver

Avføring

Etter tre uker med eksperimentelle dietter, ble avføring fra hvert bur samlet over en 7 dagers periode. I burene ble det lagt papirunderlag for å lettere plukke ut avføring. All avføring fra hvert bur ble hver dag hentet med pinsett over i Falconrør, veid og lagret ved -20 °C frem til analyse. Burene ble tørket og papirunderlaget ble skiftet daglig. Fra avføringen ble det ekstrahert og kvantifisert nøytrale lipider og frie fettsyrer beskrevet i delkapittel 3.3. På termineringsdagen ble det i tillegg samlet to–tre ferske avførings-pellets i Eppendorfrør og hurtigfrost i flytende nitrogen. Disse prøvene ble hentet for senere mikrobiologiske analyser, og vil ikke bli beskrevet i denne oppgaven.

Blod

Blod for glukosemåling ble hentet ved å lage et lite snitt i halen med skalpell. Blodglukose ble målt med glukoseapparat og teststrimler fra Accu-Chek (Roche Diagnostics).

Det ble gjort uttak av blod for plasmaprøver ved hjertepunktur. Denne prosedyren ble utført mens dyrene var i total bedøvelse av en blanding med Zoletil Forte, Rompun og Fentadon (ZRF-cocktail) (bilag C). Zoletil Forte inneholder zolazepam og tiletamin som virker beroligende og muskelavslappende. Rompun inneholder xylazin og forårsaker en søvnliggende tilstand, kombinert med muskelavslappende og noe smertelindrende virkning. Fentadon er et syntetisk opioid der effekten er smertefrihet. ZRF-cocktail ble injisert intraperitonealt (6–7 µL/g mus), og musene fikk hvile til de var under fullstendig bedøvelse. 500–800 µL blod ble hentet ut med 1 mL sprøyte med 25G sprøytespiss tilsatt dinatrium EDTA (0,05 M, 0,2 µm filtrert) i sprøytespissen som antikoagulant. Blodet ble overført til Eppendorfrør og vendt tre-fire ganger før prøvene ble lagt på is. Etter terminering av 12 mus ble blodprøvene sentrifugert i 20 minutter ved 6G. Plasma (supernatant) ble overført til nytt

MATERIALER OG METODER

Eppendorfrør, aliquotert og plassert ved -80 °C frem til analyse av kolesterol beskrevet i delkapittel 3.4.

Vev

Etter at blodet var hentet ble det utført cervikal dislokasjon på musene. Deretter ble mage- og brystregionen vasket med etanol for å unngå forurensing av vevsprøver. Dyrene ble åpnet og tynntarmen ble dissekert ut. Siste del av tynntarm (ileum) ble seksjonert, vasket i fosfatbufret saltvann (PBS: phosphate buffered saline), og åpnet ved å snitte opp langs hele seksjonen. Med et avflatet objektglass ble mukosa fra ileum skrapet ut og overført til et Eppendorfrør tilsatt *RNAlater* (ca. 100 µL/10 mg vev) og plassert i kjøleskap i ca. 24 timer. Dagen etter ble mukosaprøven fryst til -80 °C for senere analyser. Analyse av mukosa fra ileum vil ikke bli beskrevet i denne oppgaven.

Venstre leverlapp ble deretter dissekert ut og veid. ~20 mg fra distal del av venstre leverlapp ble klippet av og overført til et Eppendorfrør tilsatt *RNAlater* (ca. 100 µL/10 mg vev) og plassert i kjøleskap i ca. 24 timer. Dagen etter ble leverprøven med *RNAlater* fryst til -80 °C for senere analyse av genekspressjon beskrevet i delkapittel 2.5. Resten av venstre leverlapp, samt alt venstresidig epididymalt fett ble dissekert ut og overført til Eppendorfrør, hurtigfryst i flytende nitrogen og oppbevart ved -80 °C for senere analyser som ikke blir beskrevet i denne oppgaven.

3.2 DIETTENE

Intervensjonsdiettene var høyfett dietter med 45 E% fett, 20 E% protein, og 35 E% karbohydrater tilsatt 2 g Ca/kg fôr (Smør2Ca), 7 g Ca/kg fôr (Ost7Ca og Smør7Ca), eller 20 g Ca/kg fôr (Ost20Ca og Smør20Ca). Mengde ingredienser tilsatt hver diett ble nøye kalkulert for å oppnå lik energisammensetning samt likt innhold av vitaminer og mineraler. Tabell over diettkomposisjoner er gitt i bilag B.

3.2.1 Begrunnelse for kalsiummengdene i diettene

De offisielle anbefalingene for daglig inntak av kalsium for mus (5 g Ca/kg fôr) er basert på akseptabel livskvalitet og etter anbefalinger for rotter (National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). 2 g Ca/kg fôr er derfor i marginalt nedre grense for rotter. Det er verdt å merke seg at anbefalt kalsiummengde er primært viktig i en vekstfase, med tilvekst av benvev/skjelett. I dette forsøket brukte vi voksne mus som var ferdig utvokst. 2 g Ca/kg vil derfor trolig ikke representere problemer. Videre; 2 g Ca/kg fôr er i tråd med anbefalingene om 800 mg/dag for mennesker, gitt at omsetning av kalsium er korrelert med generell metabolisme i mus vs. menneske. Mus har ca. 10–15 ganger høyere metabolisme per kg kroppsvekt enn menneske.

3.2.2 Råstoff og ingredienser

Gulost (Norvegia vellagret i ni måneder), usaltet smør og skummetmelk ble kjøpt av TINE (Oslo, Norge). Kalsiumfosfat (dibasic, CaHPO_4 [Sigma Aldrich]) ble bestilt fra Merck KGaA (Darmstadt, Tyskland). Resten av ingrediensene ble kjøpt fra Dyets Inc. (Pennsylvania, USA).

Preparering av ost

Norvegia vellagret i 9 måneder ble raspet opp med Crypto Peerless TRS og frysetørket i Heto DryWinner 6-85. Deretter ble osten kuttet opp til pulver med en knivmølle grindomix GM 200, modell: 2001 (Retsch, Haan: Tyskland), og lagret ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til tilberedelse av fôr. Det ble registrert vekt før og etter frysetørking for å ha kontroll på næringsinnholdet i ost.

Tillaging av syrefelt kasein

Kasein ble laget av skummetmelk på pilotanlegget ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU, Ås, Norge).

Skummetmelk (32 °C) ble tilsatt 1M HCl litt etter litt til melken nådde pH på 4,57. Deretter ble blandingen varmet sakte opp til 42 °C og holdt i rundt 2 minutter. Kasein har et isoelektrisk punkt ved pH 4,6 som fører til utfelling der kaseinet aggregerer og væske (myse) presses ut. Mye av kalsiuminnholdet i melk er bundet til kaseinmiceller i form av kalsiumfosfat, og spaltes av ved syrefelling. Mysen ble deretter tappet av med sil og pumpe. Kaseinet ble vasket i tre omganger: (1) 3 x 15 minutter med vann surgjort med svovelsyre (pH = 4,6) ved 42 °C, (2) 3 x 15 minutter med vann surgjort med svovelsyre (pH = 4,6) ved 38 °C, og (3) én gang med rent vann (nøytral pH) ved 32 °C. Rent kasein ble deretter overført til dreneringsstoffposer for ost for å drenere av væske. Dreneringsprosessen foregikk i litt over 18 timer i kjølerom ved 4 °C. Ferdig drenert kaseinmasse ble hakket opp ved bruk av en hurtighakke, og oppbevart i forseglete vakuumposer i fryserom ved -20 °C frem til tilberedelse av fôr.

For å ha kontroll på næringsinnholdet og mengde kalsium i det ferdige fôret var det nødvendig å måle vann- og kalsiuminnhold i kaseinet. For tørrstoffanalyse ble ~5 g (3 paralleller) kasein veid ut i aluminiumsformer. Prøvene stod over natten ved romtemperatur for deretter og brennes ved 102 °C i ett døgn. Vekt av prøvene ble registrert etter tørkeprosessen. Prosent vekttap i prøvene utgjør prosent vanninnhold i kaseinet.

For kalsiumanalyse ble ~5 g (3 paralleller) veid ut i porselensdigel og brent ved 102 °C i ett døgn for å fjerne mest mulig væske. Deretter ble digelene plassert i muffelovn og brent/glødet ved 650 °C til prøvene ble forasket. Digelen med asken ble sakte tilsatt 10 mL 1 M HCl. Løsningen ble overført til en 200 mL erlenmeyerkolbe og tilsatt destillert vann til total mengde var 200 mL. 25 mL av løsningen ble pipettert over i ny erlenmeyerkolbe og tilsatt 20 mL 5:1 ammoniumhydroksid/ammoniumklorid bufferløsning (pH = 10,2). Kolbene ble plassert i lunkent vannbad og tilsatt en spaltespiss erichomesvart T. Kolbene stod i vannbad i 2 minutter før de ble plassert på magnetvortexer under titreringssystemet Dosimat plus 876

MATERIALER OG METODER

(Metrohm, Høvik, Norge). EDTA ble titrert til det oppstod stabilt fargeomslag fra fiolett til mørk blå. Formel benyttet for å regne ut % kalsium er gitt i ligning 1.

$$\frac{\text{mL EDTA} \times 0,4^{\text{a}} \times 8^{\text{b}} \times 100}{\text{mg innveid kasein}} = \% \text{ Ca i kasein} \quad (1)$$

^aFaktor. 1 mL EDTA tilsvarer 0,4 mg Ca⁺⁺ og styrken til EDTA er derfor 2,5. $1/2,5 = 0,4$.

^bFortynningsfaktor.

3.2.3 Tillaging av diettene

Alle ingredienser ble veid ut og blandet godt i en bolle. Tørre ingredienser ble godt blandet før flytende ingredienser ble tilsatt. Mengder av ingredienser er gitt i bilag B. Vann ble benyttet for å justere teksturen til formbar konsistens. Deigen ble formet til sylindriske pellets (lengde: ~2 cm; diameter: ~1,5 cm; vekt: 2–4 g). Ferdige pellets ble frosset ned, frysetørket i to døgn og oppbevart ved -80 °C frem til oppstart av prosjektet. Under prosjektet ble spesiallagde dietter oppbevart ved -20 °C.

3.3 ANALYSE AV FETTSYRER I FÔR OG AVFØRING

Et av målene med prosjektet var å bekrefte eller avkrefte hypotesen om at kalsium binder lipider under fordøyelse slik at opptak reduseres, og fettstoffene ender opp i avføringen. Ved å sammenligne fetttsyreinholdet i avføringen er det mulig å kalkulere hvor mye fett som ble fordøyd i de ulike gruppene.

3.3.1 Ekstaksjon av lipider

For å ekstrahere fettsyrer fra fôr- og avføringsprøver ble det benyttet modifisert Folch-metode (Folch et al., 1957; Kraus et al., 2015). Prøvemateriale ble malt opp til pulverform i en IKA A11 basic analytical mill (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland). ~500 mg ble veid ut i 50 mL falconrør og tilsatt 20 mL kloroform:metanol (2:1). I fôrprøvene ble det tilsatt 300 µL (30 mg) C19:0 TAG (trinonadecanoin) internstandard (IS) (Larodan, Monroe, MI, USA), og i avføringsprøvene ble det tilsatt 15 µL (0,15 mg) av samme IS i tillegg til 220 µL (2,2 mg) C19:0 FFA (nonadecanoic acid) (Larodan, Monroe, MI, USA). I avføringsprøvene

MATERIALER OG METODER

ble det videre tilsatt 3 dråper 6 M HCL for å senke pH til under 2 for å løse opp eventuelle kalsiumsåper. pH ble kontrollert ved bruk av pH-papir. Ved siden av før- og avføringsprøver ble det inkludert blankprøver (uten prøvemateriale). For å sikre homogen blanding ble prøvene plassert horisontalt på ristebord i romtemperatur i 20 minutter (300 rpm).

Kloroform og metanol danner en bifasisk løsning der polare komponenter løses opp i metanol og danner den øverste fasen, mens hydrofobe stoffer (lipider) løses i kloroform og danner den nederste fasen. Mellom fasene oppstår en masse bestående av uløselige komponenter. For å sikre at svakt polare lipider drives ned i kloroformfasen ble prøvene vasket med 4 mL salin (NaOH 0,9 %). Prøvene ble deretter sentrifugert på lav hastighet (2 000 rpm) i 30 minutter. Med en engangs-glasspipette ble metanolfasen fjernet for å lettere komme til kloroformfasen. Ved å forsiktig føre en engangs-glasspipette igjennom den uløselige massen ble kloroformfasen hentet ut og overført til et reagensrør i glass. Avføringsprøvene ble filtrert med teflon-sprøytefilter (millex-FG hydrophobic PTFE membrane filter 0,20 µm, 25 mm diameter) for å fjerne partikler, da kloroformfasen i disse prøvene inneholdt synlige partikler. Prøvene ble deretter dampet inn under nitrogentrykk (Stuart Block Heater og Stuart Sample Concentrator, Cole-Parmer, UK) til all væske var fordampet.

Prøvene ble resuspendert i 1 mL kloroform og overført til brune glass for gasskromatografi (GC-vials) og oppbevart ved -20 °C frem til fraksjonering.

3.3.2 Fraksjonering av lipider med fast-fase ekstraksjon

Fett i avføring kan forekomme som FFA eller som et acylglycerol, som i denne sammenhengen kalles nøytrale lipider (NL). For å analysere FFA og NL separat ble prøvene fraksjonert ved bruk av fast-fase ekstraksjon (SPE: *Solid phase extraction*) med GX-274 ASPEC System (Gilson Inc., Middleton, WI, USA). SPE-kolonnene brukt var Discovery DSC-NH₂ SPE Tube, 3 mL, 52637-U (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Heptan, kloroform og dietyleter:eddiksyre (98:2) ble brukt som løsemidler. Før påsettelse ble SPE-roboten rensert for luft med isopropanol to ganger. Prøver, kolonner og oppsamlingsrør ble plassert i henholdsvis prøve-, kolonne og oppsamlingsrommene. Flasker med løsemidler ble plassert i riktige beholdere rett før påsettelse.

Første steget i programmet var kondisjonering av kolonnene med heptan for å aktivere og rense sorbenten. Deretter ble prøvene påsatt kolonnen. NL ble eluert med kloroform og FFA med dietyketer:eddiksyre (98:2). Etter endt program ble fraksjonene overført til reagensglass med skrukork og dampet inn under nitrogentrykk.

3.3.3 Derivatisering av fettsyrer

Omestring av nøytrale lipider

Fraksjonene med NL ble resuspendert i 2 mL heptan og deretter tilsatt 1,5 mL natriummetanolat (3,3 mg/mL). Prøvene ble ristet på ristebord i 30 minutter (300 rpm) etterfulgt av sentrifugering i 5 minutter (2000 rpm). Natriummetanolat katalyserer omestring av NL til FAME. Heptan og metanol dannet en bifasisk løsning der FAME løst i heptan utgjør øverste fasen. Denne fasen ble hentet over i GC-vials og oppbevart ved -20 °C fram til gasskromatografi-massespektrometri.

Esterifisering av frie fettsyrer

Fraksjonene med FFA ble resuspendert i 1 mL BF₃-metanol og plassert i vannbad på 80 °C i 5 minutter. Prøvene ble kjølt til romtemperatur før de ble tilsatt 1 mL heptan og virvlet i 10 sekunder med vortexer før sentrifugering i 5 minutter (2000 rpm). BF₃-metanol katalyserer esterifisering av FFA til FAME. Slik som ved omestring av NL med natriummetanolat ble det dannet en bifasisk løsning der den organiske fasen (øverste fase) inneholdt FAME. Denne fasen ble forsiktig hentet ut og over i GC-vials med inserts og oppbevart ved -20 °C fram til gasskromatografi-massespektrometri.

3.3.4 Analyse av fettsyrer med gasskromatografi-massespektrometri

Kvantifisering av ulike fettsyrer ble utført med gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS). GC benyttet var en TRACE 1310 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) med en AI/AS 1319 Series Autosampler. Kolonnen var en 60 meter Rtx-2330 capillary column med ID 0,25 mm og filmtykkelse 0,20 µL (90 % biscyanopropyl og 10 % phenylcyanopropyl

MATERIALER OG METODER

polysiloxane) (Restek, Bellefonte, PA, USA). Mobilfasen var heliumgass (99,99990 %, AGA, Norge) og hadde konstant hastighet på 2,0 mL/min. Temperaturprogrammet er gitt i tabell 3.1.

Tabell 3.1 Temperatur- og tidsinnstillinger på kromatografen.

Retensjonstid (min)	Rate (°C/min)	Måltemperatur (°C)	Holdertid (min)
5	0	50	5
35,9	100	140	30
66,4	10	145	30
96,4	3	175	20
108,1	50	260	10

Programvaren som ble brukt for analyse var Chromeleon v7.2.9 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). ISQ Single Quadrupole GC-MS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ble brukt for å identifisere FAME i prøvene med en elektronionisasjonskilde (EI) med ioniseringsenergi på 70 eV. Masseområdet var m/z 50–450, og modus var satt til fullt skann med 0,2 sek skannetid. Overføringsledning og ionekilde var begge satt til 250 °C. For å bestemme FAME i prøvene ble retensjonstidene sammenlignet med en standard med 37 kjente fettsyrer A 37-component (FAME) mix (Food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA). I tillegg ble NIST 17 Mass Spectral Library (Gaithersburg, MD, USA) brukt som referansebibliotek.

Konsentrasjon av utvalgte fettsyrer ($K_{(FAME)}$) i fôr og avføringsprøver ble kalkulert ved å bruke arealene av signalene ($A_{(FAME)}$ og $A_{(IS)}$) i kromatogrammene og konsentrasjon tilsatt IS ($K_{(IS)}$), sammen med en forhåndsbestemt relativ responsfaktor (RRF) gitt i ligning 2.

$$K_{(FAME)} = \frac{A_{(FAME)} \times K_{(IS)}}{A_{(IS)} \times RRF} \quad (2)$$

Ligningen korrigerer for tap av fettsyrer i løpet av prøveopparbeiding med $K_{(IS)}$ og $A_{(IS)}$.

3.3.5 Tilsynelatende fordøyelighet

Tilsynelatende fordøyelighet av enkelte fettsyrer ble kalkulert ut ifra mengde inntak og mengde i avføring ved bruk av følgende formel (ligning 3):

$$\text{Fordøyelighet (\%)} = \frac{\text{Totalt konsumert} - \text{Totalt i avføring}}{\text{Totalt konsumert}} \times 100 \quad (3)$$

3.4 KOLESTEROLNIVÅ I PLASMA

For kvantifisering av kolesterol i plasma ble det benyttet «Cholesterol Quantification Kit» MAK043 (Sigma Aldrich). Analysen ble gjennomført i henhold til protokoll fra leverandør (Sigma-Aldrich, 2020). Plasmaprøvene ble fortynnet 10 ganger, og 4 µL ble tilsatt i hver brønn. Alle prøvene ble analysert i to paralleller og fotografert i SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA). Programvaren benyttet for innstillinger og organisering av brønnene var SoftMax Pro 6,5 (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA).

3.5 ANALYSE AV GENEKSPRESJON

For å undersøke om kalsium påvirker kolesterolmetabolisme ble det målt relativ genekspressjon på *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Cyp7a1* og *Ldlr*. Hele analysen er stor og inkluderer følgende trinn:

1. **RNA-ekstraksjon** fra vevsprøver.
2. **cDNA-syntese ved revers transkripsjon.** RNA konverteres til DNA.
3. **Design av primere** for real-time qPCR.
4. **Relativ kvantifisering ved qPCR.**

3.5.1 RNA-ekstraksjon

Isolering av RNA ble utført med NucleoSpin® RNA/Protein Purification kit (Macherey-Nagel, Düren, Tyskland). Prosedyren ble utført i henhold til fremgangsmåten beskrevet av

MATERIALER OG METODER

produsent (Macherey-Nagel, 2019). Sentrifugeringstrinnene er modifisert på bakgrunn av optimalisering av metoden ved tidligere gjennomføringer.

Ekstrahering

Vevsprøvene fra lever oppbevart i RNA $later$ ble tørket forsiktig med tørkepapir og veid. Maksimum 30 mg levervev ble overført til et oppsamlingsrør og tilsatt 350 μ L RP1-buffer og 3,5 μ L β -merkaptoetanol (β -ME). RP1 inneholder guanidintiocyanat (kaotropiske ioner) som fører til cellelyse og inaktivering av så å si alle enzymer, blant annet ribonukleaser og proteaser. Reduksjonsmiddelet β -ME denaturerer proteiner ved å bryte disulfidbindinger. For homogenisering av levervevet i lysisbufferen ble det sprøytet opp og ned med 1 mL-sprøyter med 23 G-sprøytespisser til det ikke var synlige større partikler igjen i løsningen. Prøvene ble deretter overført til NucleoSpin Filter plassert i nye oppsamlingsrør, og sentrifugert ved 11 000 g i 2 minutter. Dette fører til redusert viskositet og et klarere lysat. Filtrene ble fjernet og 350 μ L etanol (70 %) ble tilsatt og blandet ved pipettering for å endre bindingsbetingelsene i lysatet. Lysatet ble deretter varsomt overført til NucleoSpin RNA/Protein-kolonner plassert i nye oppsamlingsrør, og sentrifugert ved 13 000 g i 3 minutter. NucleoSpin-kolonnen inneholder en silikamembran som binder RNA og DNA, og slipper igjennom proteiner. Filtratet med proteiner ble kastet, og kolonnen med nukleinsyrer ble plassert i et nytt oppsamlingsrør.

350 μ L MDB (membrane Desalting Buffer) ble tilsatt, og kolonnen ble sentrifugert ved 13 000 g i 3 minutter. MDB fjerner salt fra membranen og bedrer dermed effektiviteten av rekombinant DNase (rDNase)-aktivitet ved kommende steg. 90 μ L reaksjonsbuffer for rDNase og 10 μ L rDNase per prøve ble forberedt i et sterilt rør (12 prøver = 1,08 mL reaksjonsbuffer for rDNase + 120 μ L rDNase). 95 μ L av rDNase-reaksjonsblandingen ble tilsatt direkte på midten av silikamembranen i kolonnen, og inkubert i romtemperatur i 15 minutter. rDNase tilsettes for å degradere DNA på silikamembranen.

Etter inkubering ble kolonnene tilsatt 200 μ L vaskebuffer RA2 og sentrifugert ved 11 000 g i 2 minutter, for å inaktivere rDNase. Kolonnene ble plassert i nye oppsamlingsrør og tilsatt 600 μ L vaskebuffer RA3 og sentrifugert ved 11 000 g i 2 minutter. Filtratet ble kastet, kolonnen ble plassert tilbake i oppsamlingsrøret og tilsatt ytterligere 250 μ L vaskebuffer

MATERIALER OG METODER

RA3, og sentrifugert ved 11 000 g i 3 minutter. Filtratet ble kastet, og for å være sikker på at kolonnen var helt tørr, ble prøvene sentrifugert 10 sekunder. Oppsamlingsrørene ble kastet og kolonnen ble plassert i RNase-frie rør og tilsatt 40 µL RNase-fri H₂O, sentrifugert ved 13 000 g i 2 minutter ved 4 °C, og oppbevart ved -80 °C frem til måling av konsentrasjon og renhet.

Analyse av kvalitet og kvantitet

For å bestemme kvalitet (renhet), og kvantiteten (konsentrasjonen) av RNA ble det benyttet NanoDrop spektrofotometer. Alle nukleotider absorberer lys ved 260 nm. Ratio A_{260}/A_{280} brukes for å bestemme renhet av DNA eller RNA. En ratio på ~2 er akseptert som rent RNA. Dersom ratioen er lavere kan det bety tilstedeværelse av protein, eller andre kontaminanter som absorberer sterkt på eller nært 280 nm. Sekundær renhetsanalyse måler absorbans ved 230 nm for å fange opp andre kontaminanter. $A_{260}/A_{230} \approx 2,2$ antyder rent RNA. Lavere A_{260}/A_{230} kan indikere forurensing av fenoler fra ekstraksjonen eller andre kontaminanter som absorberer lys ved 230 nm.

3.5.2 cDNA-syntese ved revers transkripsjon

Genekspresjon ved qPCR er avhengig av DNA, og det var derfor nødvendig og konvertere ekstrahert mRNA til komplementær DNA (cDNA). Ved cDNA-syntese konverteres rensert RNA til cDNA av enzymet revers transkriptase (RT). Primere hybridiseres til RNA og av reaksjonsblandingens dNTP syntetiserer RT en komplementær basesekvens til RNA i prøven. RNase H degraderer RNA og resultatet er en enkeltrådig cDNA.

Syntese av cDNA ble utført med iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) etter instruksjoner fra leverandør. Reaksjonen ble kjørt på PTC-200 Thermal Cycler (MJ research, Waltham, MA, USA). Mengde av de ulike reagensene er presentert i tabell 3.2, og temperatursyklus i tabell 3.3. Syntetisert cDNA ble fortynnet til 8 ng/µL og oppbevart ved -80 °C frem til analyse ved qPCR.

Tabell 3.2 Reaksjonsblanding for syntese av cDNA

Komponent	Volum per reaksjon (μL)
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
Nukleasefritt vann	varierende
RNA-templat	varierende
Total	20

Nukleasefritt vann og RNA-templat ble tilsatt for å oppnå en RNA-konsentrasjon på ca. 40 ng/ μL i reaksjonsblandingen.

Tabell 3.3 Temperatursyklus for syntese av cDNA

Steg	Varighet (minutter)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
Hybridisering	5	25
Revers transkripsjon	20	46
Inaktivering av RT	1	95
Hold	∞	4

RT: Revers Transkriptase.

3.5.3 Design, bestilling og testing av primerpar for qPCR

Design av primere

Primerpar ble designet ved bruk GenBank og Primer-BLAST fra nettsiden til National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2021). Spesifikke innstillinger for søk til primer design i dette prosjektet er gitt i bilag K. De 2–3 teoretisk beste primere fra hvert gen ble bestemt ved bruk av analyseprogrammet NetPrimer (PrimerBiosoft, 2021). NetPrimer analyserer primere og primerpar, og presenterer mulighet for hårnåldannelse og primer-dimerformasjon. Utvalgte primerpar ble deretter bestilt fra Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, 2021). Bestilte primerpar ble testet ved konvensjonell PCR og gel-elektroforese, og ett primerpar fra hvert gen ble inkludert for RT-qPCR. Oversikt over alle designede, bestilte, testede og brukte primere er gitt i bilag L.

Testing og optimalisering av primere

For PCR ble det brukt 5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne, Tartu, Estland), primerpar, templat og nukleasefritt sterilt vann. Templatet bestod av et genforråd med cDNA fra alle gruppene. Oversikt over mengder av komponenter i reaksjonsblandingene er gitt i tabell 3.4.

Tabell 3.4 Reaksjonsblanding for PCR ved test av primere

Komponent	Volum per reaksjon (µL)
5x HOT FIREPol Blend Master Mix RTL	2
Primer framover	0,3
Primer revers	0,3
cDNA-templat	3
Vann, PCR grade	4,4
Total	10

Tabell over testede primere er gitt i bilag L.

Reaksjonen ble utført i C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), der amplifiseringstrinnet ble programmert med 8 ulike temperaturer fordelt mellom 55 og 65 ° i 25 eller 30 sykluser. 25 sykluser ble brukt som standard, men ved re-test på grunn av like resultater ved alle temperaturer ble det utført med 30. Protokoll for PCR er gitt i tabell 3.5.

Tabell 3.5 Temperatursykluser for PCR ved test av primere

Steg	Varighet	Temperatur (°C)	Sykluser
Aktivering av DNA-polymerase	13 minutter	95	1
Amplifisering	Denaturering	95	25/30 ^b
	Hybridisering	55–65 ^a	
	Elongering	72	
Avsluttende elongering	5 minutter	72	1
Hold	varierende	7	-

^a: 8 temperaturer over 10 grader (55; 55,7; 59; 61,4; 63,3; 64,5; 65 °C)

^b: 25 sykluser som standard innstilling, men 30 sykluser ble brukt ved re-test der det var usikkerhet i høyest intensitet på agarose-gelen.

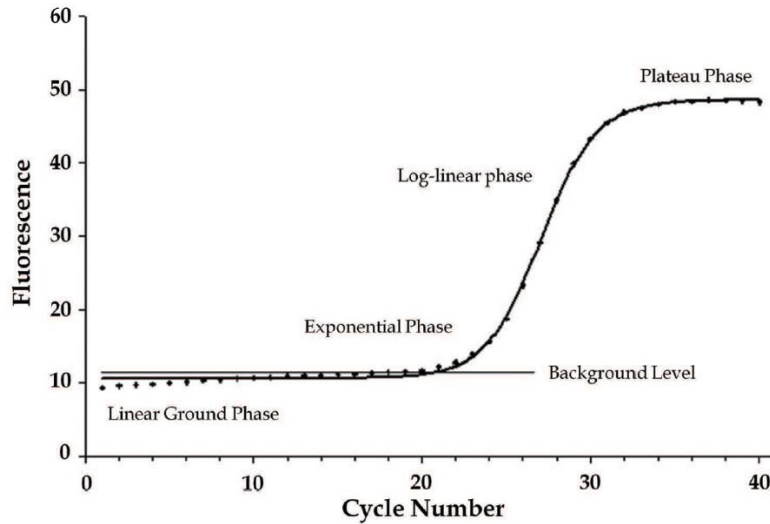
Gel-elektroforese

Valg av primerpar samt gunstig hybridiseringstemperatur ble bestemt med gel-elektroforese. Gelen bestod av 2 % agarose-gel tilsatt GelRed (5 μ L/100 mL). Brønnene i gelen ble tilsatt 6 μ L amplifisert prøve eller 4 μ L DNA Ladder, og hver gel ble kjørt på 92 volt i 30 minutter. Deretter ble gelene fotografert med Gel Doc EZ imager (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). Bånd med høyest intensitet indikerte temperaturer med høyest amplifiseringsgrad, og ble grunnlaget for valg av primerpar og temperatur ved videre analyse med qPCR. Dersom flere bånd var synlig i samme brønn kunne dette indikere tilstedeværelse av genomisk DNA (gDNA) eller uspesifikk amplifisering, og primerparet ble ekskludert for videre analyse.

3.5.4 Relativ kvantifisering ved qPCR

I qPCR kvantifiseres mengde cDNA i en prøve ved tilsette fluoriserende farge som detekteres under reaksjonen. Reaksjonsblandingen i en qPCR består av cDNA, primerpar, DNA-polymerase og dNTP slik som i konvensjonell PCR, men i tillegg tilsettes fluoriserende farge der strålingen forsterkes ved binding til dobbeltrådig DNA (dsDNA). For hver syklus øker mengde dsDNA, og dermed også det fluoriserende signalet. Utviklingen av fluoriserende signal former en kurve som deles inn i fire faser: (1) lag-fase, (2) eksponentiell fase, (3) log-lineær fase, og (4) platå-fase (figur 3.3). I lag-fasen forekommer amplifisering, men mengde fluoriserende signal overstiger ikke bakgrunnssignalet. Bakgrunnssignalet utgjør grunnlaget for bestemmelse av en terskelverdi som settes av programvaren. Først når signalet når eksponentiell fase krysses denne terskelen, og i hvilken syklus denne terskelen krysses utgjør C_q -verdien (*cycle quantification*).

MATERIALER OG METODER



Figur 3.3 Skjematisk framstilling av et typisk resultat ved qPCR. Kurven består av fire faser: lag-fase, eksponentiell fase, log-lineær fase og platåfase. C_q -verdien er der kurven krysser bakgrunnssignalet (her ca. 20,1) (Yilmaz et al., 2012).

qPCR ble utført ved bruk av 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix, primerpar, cDNA templat og vann (PCR grade). Primerpar benyttet i analysen er gitt i tabell 3.6. Oversikt over mengder av ulike komponenter er presentert i tabell 3.7.

Tabell 3.6 Primerpar brukt ved qPCR

Gen	Retning	Sekvens (5'-3')	Hybridiserings-temperatur (°C)
<i>GAPDH</i>	Fram	CTTCAACAGCAACTCCCCTCTT	60
	Revers	GCCGTATTCATTGTCATACCAGG	
<i>Hmgcr</i>	Fram	CAGCCATTTTGCCAGAGTTT	59
	Revers	AGGACCAAGCCTAAAGACATA	
<i>Hmgcs1</i>	Fram	CTACCGCAAAAAGATCCGTG	60
	Revers	TCATTCAGGAACATCCGAGC	
<i>Ldlr</i>	Fram	GGGCAATCGGAAAACCATTT	60
	Revers	TGTCCAATACACTTTGTCCTCA	
<i>Cyp7a1</i>	Fram	GTGAATGGAGCATTACAGAGT	59
	Revers	GAACCATCCTCAAGGTGTAGA	

MATERIALER OG METODER

Tabell 3.7 Reaksjonsblanding for qPCR

Komponent	Volum per reaksjon (µL)
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	2
Primer framover	0,2
Primer revers	0,2
cDNA-templat	3
Vann, PCR grade	4,6
Total	10

qPCR-platene ble klargjort på kjøleblokk i et sterilt rom dedikert for PCR, og alle komponenter ble oppbevart på is eller på kjøleblokk under arbeidet. Prøvene ble duplisert, og for hvert primerpar ble det inkludert én NAC (*no amplification control*) og én NTC (*no template control*). NAC inneholder alle komponenter utenom revers transkriptase og fungerer som en kontroll for tilstedeværelse av gDNA. NTC inneholder alle komponenter utenom cDNA-templat og fungerer som kontroll for rene omgivelser under arbeidet.

Platene ble kjørt i LightCycler 480 Instrument II (Applied Science, Indianapolis, IN, USA) med temperaturer og varighet presentert i tabell 3.8. Det ble lagt til en smeltekurveanalyse etter den kvantitative analysen for å kontrollere at ønsket ampikon ble detektert. Stegene i smeltekurveanalysen inkluderte 1 min ved 95 °C, 1 min ved 40 °C, deretter et kontinuerlig steg fra 60 til 90 °C med 20 målinger per grad (0,3 °C/sek).

Tabell 3.8 Temperatursyklus for qPCR

Steg		Varighet	Temperatur (°C)	Sykluser
Aktivering av DNA-polymerase		12 min	95	1
Kvantifisering	Denaturering	15 sek	95	40
	Hybridisering	20 sek	59/60 ^a	
	Elongering	20 sek	72	

Resultatene ble prosessert i LinRegPCR og bearbeidet i Microsoft Excel. Gjennomsnittet av C_q-verdier til parallelle prøver ble normalisert til GPDH, og relativ genekspresjon ble kalkulert etter C_q-metoden. Utrekningen av normaliseringen er gitt i ligning 4.

MATERIALER OG METODER

$$\text{Relativ genekspressjon} = \frac{E_{\text{målgen}}^{(-Cq_{\text{målgen}})}}{E_{\text{ref}}^{(-Cq_{\text{ref}})}} \quad (4)$$

E: effektiviteten til primeren; Cq: antall PCR-sykluser for å nå kvantifiseringsterskelen; ref: referanseggen.

3.6 STATISTISKE ANALYSER

All data er bearbeidet i Microsoft excel, og alle statistiske analyser er utført i GraphPad Prism 9. For hvert datasett er det vurdert hvilken statistisk modell som var best egnet. Alle datasett ble testet for normalfordeling med Shapiro-Wilk (W) i tillegg til vurdering av QQ-plot. Ved sammenligninger mellom grupper ble det brukt en-veis ANOVA etterfulgt av Tukeys test for flere sammenligninger dersom variansanalysen viste signifikans. To-veis ANOVA ble benyttet for å undersøke effekt av kalsium og fôrkilde på fordøyelse av fett, plasma total kolesterol og genekspressjon. Hvilken modell som er brukt er spesifisert i tekst, samt tabell- og figurtekster og signifikanskriterium var alltid satt til $P < 0,05$. Data og spredning i data er uttrykt i gjennomsnitt \pm standardavvik (SD).

4 RESULTATER

4.1 FETTSYREINNHOLD I FÔR

Mus ble fôret med høyfett-dietter laget på ost eller smør og syrefelt kasein, med ulike mengder kalsium: Smør2Ca (2 g Ca/kg fôr), Ost7Ca og Smør7Ca (7 g Ca/kg fôr), og Ost20Ca og Smør20Ca (20 g Ca/kg fôr). Diettene inneholdt henholdsvis 42, 140 og 400 % av anbefalt kalsiumbehovet for mus (National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). Etter ekstraksjon av fettsyrer fra fôr og analyse på GC-MS viste resultatene at alle høyfettdiettene hadde omtrent samme innhold av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9. Tabell 4.1 viser mengder av de ulike fettsyrene i alle diettene

Tabell 4.1 Innhold av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9 i de ulike diettene

	Dietter					
	Chow	Smør2Ca	Ost7Ca	Smør7Ca	Ost20Ca	Smør20Ca
C14:0	-	1,7	2	1,9	2	2
C16:0	0,38	7,1	7,1	7	7,3	7,1
C18:0	0,04	3	3	3,2	3	3,3
C18:1<i>cis</i>9	0,28	6	5,7	6	5,5	5,8

Verdier er oppgitt i g/100 g.

RESULTATER

4.2 VEKT OG FETTMENGDE I MUS VED OPPSTART AV PROSJEKTET

Ved oppstart av prosjektet (dag 0) ble musene tilfeldig plassert i bur for å randomisere gruppene. En-veis ANOVA avslørte ingen signifikante forskjeller i gjennomsnittlig kroppsvekt ($P = 0,308$), men imidlertid var det forskjeller i fettmasse ($P = 0,004$) og fettprosent ($P = 0,003$) (tabell 4.2). Ved nærmere analyse ble det observert at Smør2Ca hadde både høyere fettmasse og fettprosent enn Smør7Ca (henholdsvis $P = 0,042$ og $0,046$) og Smør20Ca (henholdsvis $P = 0,006$ og $0,002$).

Tabell 4.2 Kroppsvekt, fettmasse og fettprosent ved oppstart av prosjektet

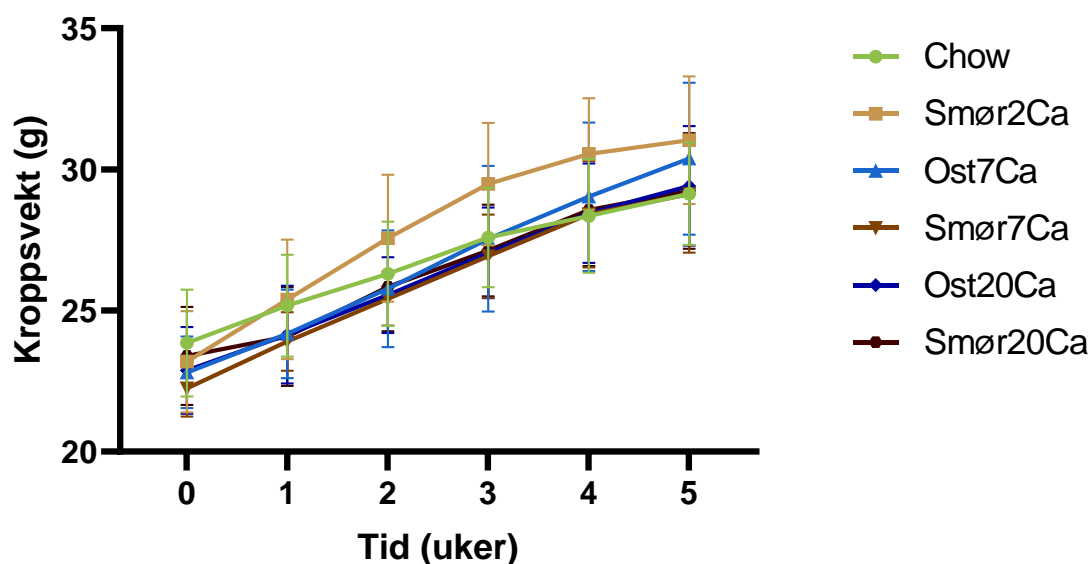
	Dietter					
	Chow	Smør2Ca	Ost7Ca	Smør7Ca	Ost20Ca	Smør20Ca
Kroppsvekt (g)	23,85 ± 1,89	23,19 ± 1,79	22,81 ± 1,27	22,24 ± 1,00	22,88 ± 1,53	23,39 ± 1,74
Fettmasse (g)	1,90 ± 0,60 ^{ab}	2,06 ± 0,58 ^a	1,64 ± 0,44 ^{ab}	1,44 ± 0,41 ^b	1,49 ± 0,25 ^{ab}	1,29 ± 0,42 ^b
Fettprosent	7,88 ± 2,14 ^{ab}	8,99 ± 2,79 ^a	7,19 ± 1,93 ^{ab}	6,42 ± 1,62 ^b	6,54 ± 1,21 ^{ab}	5,47 ± 1,49 ^b

Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SD, n = 10. Dataene ble analysert med en-veis ANOVA og Tukeys test for flere sammenligninger som posttest. Verdier uten felles hevet skrift er signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

4.3 VEKTUTVIKLING, FETTPROSENT, ENERGIINNTAK OG AVFØRING

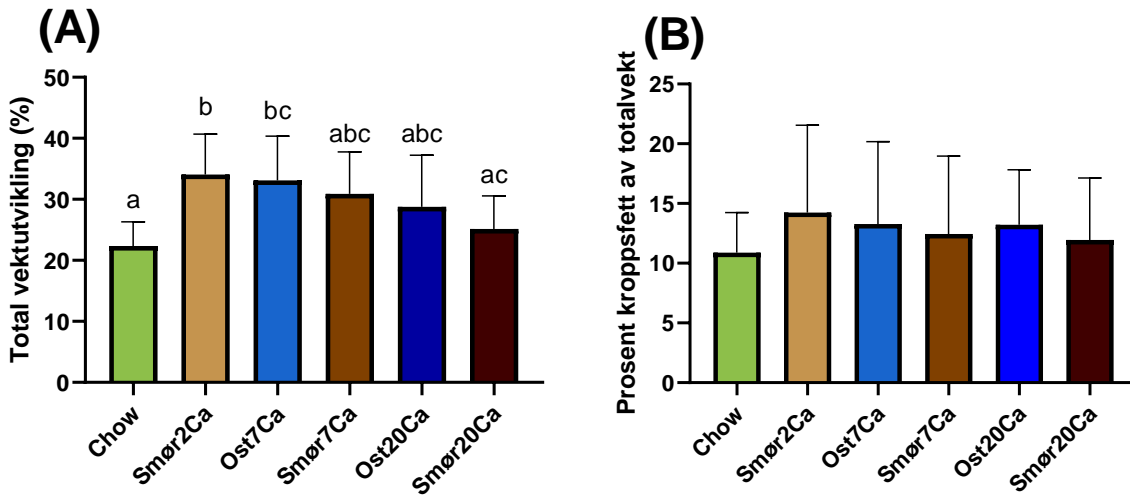
For å undersøke om kalsium og/eller fôrkilde hadde effekt på vektutvikling ble musene veid hver uke i løpet av den 5 uker lange intervensjonen. Alle gruppene hadde økning i kroppsvekt gjennom hele intervensjonen (figur 4.1).

En-veis ANOVA ble utført for å sammenligne effekt av diettene på total prosent utvikling av kroppsvekt, fettprosent ved siste dag, totalt energiinntak og avføringsmengde ved siste dag (figur 4.2 og figur 4.3). Analysene avslørte at det var en statistisk signifikant forskjell i prosent vektutvikling ($P = 0,001$). Tukeys test for flere sammenligninger viste at gjennomsnittlig prosent utvikling var forskjellig mellom Chow og Smør2Ca ($P = 0,003$), Chow og Ost7Ca ($P = 0,008$) og mellom Smør2Ca og Smør20Ca ($P = 0,042$). Det var ingen signifikante forskjeller i fettprosent ved siste dag ($P = 0,8399$).



Figur 4.1 Utvikling av kroppsvekt i gram. Kroppsvekt økte for alle musene gjennom hele intervensjonen. Størst vektøkning ble observert i Smør2Ca-musene. Chow-musene hadde lavest vektutvikling.

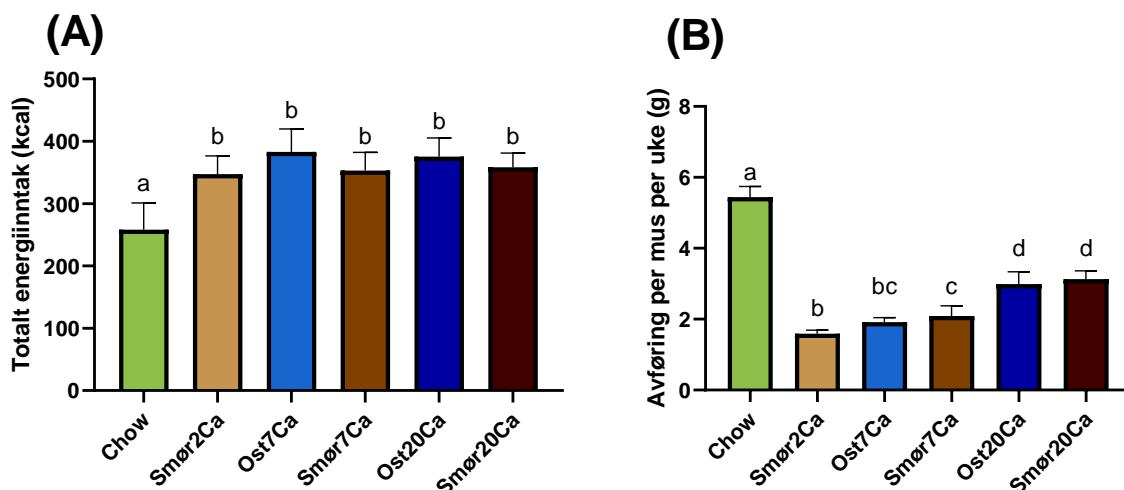
RESULTATER



Figur 4.2 Total prosent utvikling av kroppsvekt (A) og fett (B). Figurene viser prosent økt kroppsvekt (A) og fettprosent (B) ved siste måling på termineringsdagen av initialvekten ved dag 0. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt \pm SD, $n = 10$). Dataene ble analysert med en-veis ANOVA med Tukeys test for flere sammenligninger som posttest. Verdier uten felles hevet skrift er signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

En-veis ANOVA viste at diettene hadde signifikant effekt på totalt energiinntak ($P < 0,0001$) og avføring per mus per uke ($P < 0,0001$). Tukeys test for flere sammenligninger viste at Chow-musene hadde signifikant lavere totalt inntak av energi sammenlignet mot de andre gruppene (figur 4.3A). Det var ingen forskjell i energiinntak blant de andre gruppene som fikk høyfettdiett. Siden en av hypotesene i prosjektet var at kalsium påvirker opptak av fett, ble det også undersøkt om avføringsmengden var forskjellig mellom gruppene med forskjellige mengder kalsium i fôret. Som vist i figur 4.3B viser, er den totale avføringsmengden påvirket av kalsiummengden i fôr. Som forventet hadde mus i Chow-gruppen mer avføring på grunn av at de totalt spiste mer av fôret kombinert med at det er mer fiber i standard tørrfôr. I høyfettgruppene hadde gruppene med 20 g Ca/kg fôr (Ost20Ca og Smør20Ca) signifikant mer avføring enn de andre intervensjonsgruppene ($P < 0,0001$). Av mellom-kalsium-gruppene (Ost7Ca og Smør7Ca) var det kun Smør7Ca som hadde signifikant mer avføring enn Smør2 ($P = 0,045$). Ost7Ca hadde mer avføring enn Smør2Ca, men dette var ikke statistisk signifikant ($P = 0,337$). Som forventet hadde Smør2Ca-gruppen minst avføring.

RESULTATER



Figur 4.3 Totalt energiinntak (A) og avføringsmengde per mus per uke (B). (A) Viser totalt energiinntak gjennom hele intervansjonsperioden, og (B) viser en ukes avføringsmengde i gram per mus. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt \pm SD, $n = 5$. Dataene ble analysert med en-veis ANOVA med Tukeys test for flere sammenligninger som posttest. Verdier uten felles hevet skrift er forskjellig ($P < 0,05$).

4.4 FORDØYELSE AV FETTSYRER

Et av hovedmålene i dette prosjektet var å undersøke tilsynelatende fordøyelighet av ulike fettsyrer i diettene. Analyseprøvene fra Chow-gruppene ble ekskludert fra da en forskjell i fordøyelse fra de andre gruppene ikke kunne bli forklart av hverken kalsium eller fôrkilde. Én prøve fra hvert bur (tilsvarer 5 prøver per diett) ble analysert. Hypotesen var at mer kalsium i dietten ville føre til mer lange SFA i avføring, som betyr dårligere fordøyelse av disse fettsyrene. En-veis ANOVA ble utført for hver fettsyre, og resultatene viste signifikante forskjeller mellom gruppene for samtlige fettsyrer (tabell 4.3). Tukeys test for flere sammenligninger avslørte at Smør2Ca fordøyde mer fettsyrer enn høykalsium-gruppene (Ost20Ca og Smør20Ca). Den største forskjellen ble observert for C18:0, der Smør2Ca-musene hadde 97,8 % til forskjell fra 92 % i Ost20Ca ($P = 0,002$) og 91,8 % i Smør20Ca ($P = 0,0009$). Fordøyelighet av C16:0 var redusert fra 99,1 % hos Smør2Ca til 96,4 % i Ost20Ca ($P = 0,002$) og til 96,5 % i Smør20Ca ($P = 0,003$). Som forventet var det mindre forskjell i fordøyelighet av C14:0 og C18:1*cis*9. Fordøyelighet av C14:0 var på 99,7 % hos Smør2Ca, og var signifikant forskjellig fra Ost20Ca (97,8 % fordøyelighet, $P = 0,006$) og Smør20Ca (99

RESULTATER

% fordøyelighet, $P = 0,029$). C18:1*cis*9 hadde en fordøyelighet på 99,9 % hos Smør2Ca til forskjell fra 99,6 % i Ost20Ca ($P = 0,005$) og 99,5 % i Smør20Ca ($P = 0,001$). I tillegg hadde Smør20Ca lavere fordøyelighet enn mellomkalsium-gruppene (Ost7Ca og Smør7Ca), som begge hadde 99,8 % fordøyelighet av C18:1*cis*9 (henholdsvis $P = 0,024$ og $P = 0,012$).

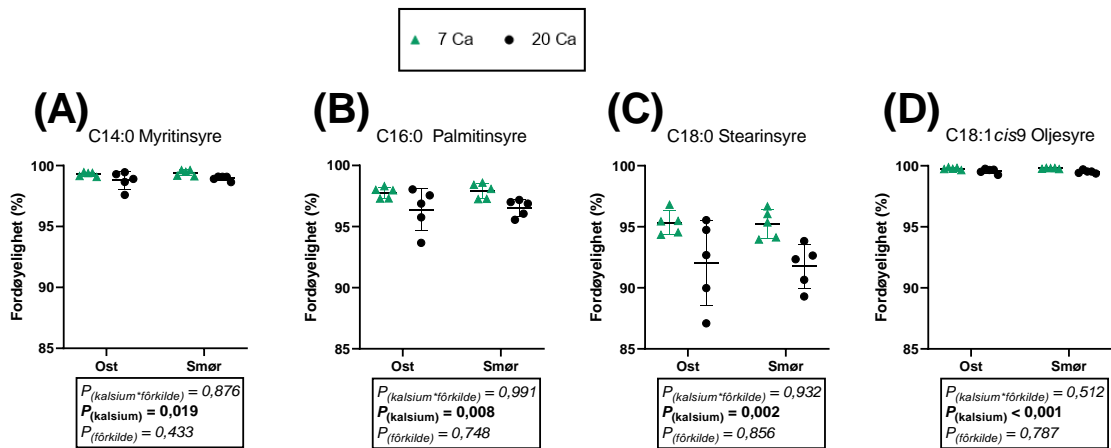
Tabell 4.3 Tilsynelatende fordøyelighet av noen fettsyrer i smør- og ostegruppene

	Smør2Ca n = 5	Ost7Ca n = 5	Smør7Ca n = 5	Ost20Ca n = 5	Smør20Ca n = 5	F	P
C14:0	99,7 ± 0,1 ^a	99,3 ± 0,2 ^{ab}	99,4 ± 0,3 ^{ab}	97,8 ± 0,7 ^b	99 ± 0,2 ^b	5,007	0,0058
C16:0	99,1 ± 0,5 ^a	97,8 ± 0,5 ^{5ab}	97,9 ± 0,6 ^{ab}	96,4 ± 1,8 ^b	96,5 ± 0,7 ^b	6,922	0,0011
C18:0	97,8 ± 1,4 ^a	95,3 ± 1 ^{ab}	95,2 ± 1,2 ^{ab}	92 ± 3,5 ^b	91,8 ± 1,8 ^b	8,133	0,0005
C18:1<i>cis</i>9	99,9 ± 0,1 ^a	99,8 ± 0,1 ^{ab}	99,8 ± 0,04 ^{ab}	99,6 ± 0,2 ^{bc}	99,5 ± 0,1 ^c	8,410	0,0004

Dataene ble analysert med en-veis ANOVA der grad av frihet var likt for alle fettsyrene (DFn = 4, DFd = 20). F = F-verdi etter en-veis ANOVA. P = p-verdi etter en-veis ANOVA. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt ± SD (n = 5), og verdier uten felles hevet skrift var signifikant forskjellig ($P < 0,05$) etter Tukeys test for flere sammenligninger som posttest.

For å undersøke om kalsium eller fôrkilde (ost eller smør) hadde en effekt på fordøyelighet av ulike fettsyrer ble det utført en to-veis ANOVA på dataene. Resultatene fra variansanalysen avslørte at kalsium hadde en effekt på fordøyelighet av samtlige analyserte fettsyrer (C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9) (figur 4.4), men fôrkilden (ost eller smør) hadde ingen betydning.

RESULTATER



Figur 4.4 Sammenligning av fordøyelighet i mellom- og høykalsium-gruppene. Figurene viser to-veis ANOVA av relativ genekspressjonsverdi normalisert til GAPDH. Dataene ble analysert med to-veis ANOVA og verdiene er presentert i gjennomsnitt \pm SD (n = 5).

Oppsummert viser resultatene fra fettsyreanalysen at diettene med mye kalsium (20 g Ca/kg fôr) førte til mindre fordøyelighet av samtlige analyserte fettsyrer i avføringen sammenlignet med lavkalsium-gruppen (Smør2Ca). To-veis ANOVA viste at kalsium og ikke fôrkilde hadde en effekt på fettsyreopptak. Den største effekten på redusert fordøyelighet ble observert for C18:0.

RESULTATER

4.5 GLUKOSE OG PLASMAKOLESTEROL

For å undersøke om musene viste tegn på glukose-dysregulering, ble det utført blodsuktermålinger etter fire timers faste på termineringsdagen. En-veis ANOVA ble utført for å sammenligne effekt av diett på fastende blodglukose. Analysen viste ingen signifikante forskjeller i fastende blodglukose mellom de ulike diettene ($P = 0,920$) (tabell 3.4).

Tabell 4.4 Fastende blodglukose etter 5 uker intervensjon

	Chow (n = 10)	Smør2Ca (n = 10)	Ost7Ca (n = 10)	Smør7Ca (n = 10)	Ost20Ca (n = 10)	Smør20Ca (n = 10)
Glukose (mmol/L)	9,03 ± 0,93	9,48 ± 2,76	9,44 ± 0,50	9,07 ± 0,48	9,76 ± 0,38	9,29 ± 0,39

Blodet ble samlet etter fire timers faste med et lite kutt i halen og en dråpe blod. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt ± SD, n = 10. Dataene ble analysert med en-veis ANOVA med Tukeys test for flere sammenligninger som posttest. Verdier uten felles hevet skrift var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

Videre ble det undersøkt om kolesterolnivåene i blodet ble påvirket av diett. En-veis ANOVA avslørte en signifikant forskjell mellom de ulike diettene ($P = 0,0023$) (tabell 4.5). Som forventet hadde Chow-gruppen lavest total kolesterol på grunn av det lave fettinnholdet i fôret, og hadde signifikant lavere kolesterolnivåer enn Smør2Ca, Ost7Ca og Smør7Ca (henholdsvis $P = 0,004$, $0,006$ og $0,011$). Imidlertid var det ingen signifikante forskjeller mellom Chow- og høykalsium-gruppene.

Tabell 4.5 Fastende total kolesterol i plasma etter 5 uker intervensjon.

	Chow (n = 7)	Smør2Ca (n = 7)	Ost7Ca (n = 7)	Smør7Ca (n = 7)	Ost20Ca (n = 7)	Smør20Ca (n = 7)
Total kolesterol (mmol/L)	2,25 ± 0,47 ^a	4,24 ± 1,03 ^b	4,17 ± 1,01 ^b	4,06 ± 0,62 ^b	3,42 ± 1,18 ^{ab}	3,33 ± 1,07 ^{ab}

Blodprøvene ble tatt ved hjertepunktering i full anestesi etter fire timers faste. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt ± SD, n = 7. Dataene ble analysert med en-veis ANOVA med Tukeys test for flere sammenligninger som posttest. Verdier uten felles hevet skrift var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

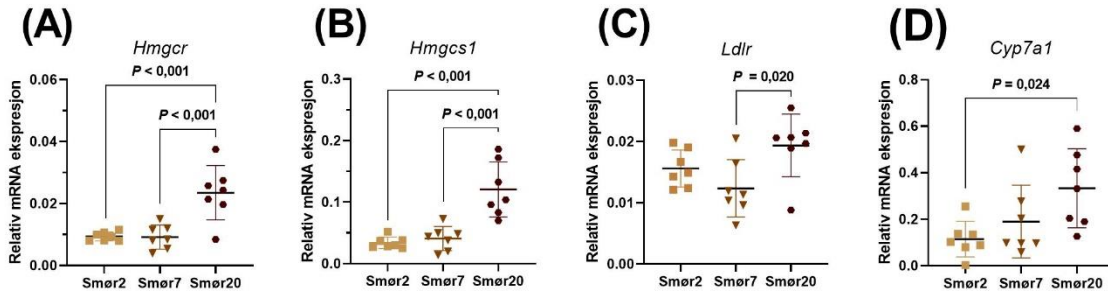
RESULTATER

Videre viste analysene at høykalsium-gruppene (Ost20Ca og Smør20Ca) tenderte til å ha lavere nivå av total kolesterol i plasma enn mellomkalsium-gruppene (Ost7Ca og Smør7Ca). Det ble gjort en to-veis ANOVA med disse gruppene for å undersøke om kalsium kunne ha en hovedeffekt på nivå av plasma-total kolesterol. Analysen avslørte en trend der kalsium mulig kan ha en effekt på total kolesterol ($P = 0,06$).

4.6 GENEKSPRESJON

Ved å måle mengde mRNA av gener for kolesterolsyntese (*Hmgcr* og *Hmgcs1*), opptak av LDL fra sirkulasjonen (*Ldlr*) og syntese av gallesyrer (*Cyp7a1*) i levervev kan få en indikasjon på om kalsium og/eller fôrkilde påvirker kolesterolhomeostase i musene etter 5 uker intervensjon. For å undersøke om kalsium har en innvirkning på uttrykk av gener relatert til kolesterolmetabolisme, ble mRNA-ekspressjon av *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Ldlr* og *Cyp7a1* målt i levervev. Chow-musene ble ekskludert fra disse analysene da hensikten var å undersøke effekt av kalsium og fôrkilde. En en-veis ANOVA ble utført per gen for å sammenligne effekten av kalsium på relativ genekspressjon hos de ulike smørgruppene. Det var signifikant effekt av kalsium på uttrykk av alle genene (*Hmgcr*: $P < 0,001$; *Hmgcs1*: $P < 0,001$; *Ldlr*: $P = 0,026$, og *Cyp7a1*: $P = 0,028$). ANOVA-resultatene er presentert grafisk i figur 4.5. Uttrykk av gener involvert i kolesterolsyntese (*Hmgcr* og *Hmgcs1*), var oppregulert i Smør20 sammenlignet Smør2 og Smør7 (figur 4.5A og 4.5B). *Ldlr* var mer uttrykt i høykalsium-sammenlignet med mellomkalsium-gruppen (figur 4.5C). Smør20Ca hadde mer uttrykt *Cyp7a1* sammenlignet med de andre smørgruppene mer mindre mengde kalsium tilsatt i fôret, men kun signifikant forskjellig fra Smør2Ca (figur 4.5D).

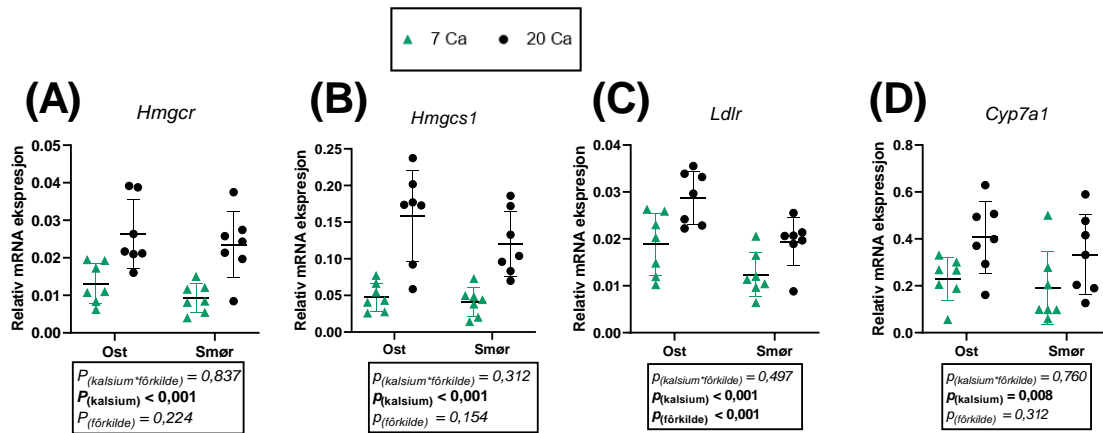
RESULTATER



Figur 4.5. Relativ mRNA ekspresjon av HMGCR (A), HMGCS1 (B), LDLR (C) og CYP7A1 (D) i smørgruppene. Leverprøvene ble høstet etter fire timer faste etter 5 uker intervensjon. Figurene viser relativ genekspresjonsverdi normalisert til GAPDH. Dataene ble analysert med en-veis-ANOVA med Tukeys test for flere sammenligninger ble brukt som posttest. Verdiene er oppgitt i gjennomsnitt \pm SD ($n = 7$), og verdier uten felles hevet skrift var signifikant forskjellig ($P < 0,05$).

En-veis ANOVA på smørgruppene avslørte signifikant effekt av kalsium på *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Ldlr* og *Cyp7a1*. For å undersøke hovedeffekt av fôrkilde i tillegg til deres interaksjonseffekt på de samme genene ble det derfor utført To-veis ANOVA på høy- og mellomkalsiumgruppene (Ost7Ca, Ost20Ca, Smør7Ca og Smør20Ca) (figur 4.6). Analysene avslørte signifikant hovedeffekt av kalsium på alle genene og i tillegg hadde fôrkilde en signifikant effekt på uttrykk av *Ldlr* ($P < 0,001$), der ostegruppene hadde høyere uttrykk enn smørgruppene (figur 4.6C). Det var ingen interaksjon mellom kalsium og fôrkilde på noen av genene, som indikerer at kalsium hadde har lik effekt på ekspresjon uavhengig av fôrkilde, og for *Ldlr* betyr det i tillegg av fôrkilde har samme effekt uavhengig av kalsium.

RESULTATER



Figur 4.6 Relativ mRNA ekspresjon av HMGCR (A), HMGCS1 (B), LDLR (C) og CYP7A1 (D) i mellom- og hykalsiumgruppene. Leverprovene ble høstet etter fire timer faste etter 5 uker intervensjon. Figurene viser to-veis ANOVA av relativ genekspressionsverdi normalisert til GAPDH. Dataene ble analysert med to-veis ANOVA der grad av frihet var lik ved alle analysene (DFn = 4, DFd = 20). Dataene er presentert i gjennomsnitt \pm SD (n = 7). Dataene ble analysert med to-veis ANOVA.

Oppsummert hadde kalsium en sterk effekt pa uttrykk av gener involvert i kolesterolhomeostase. Analysene viste at hykalsium-gruppene hadde mer uttrykk *Hmgcr*, *Hmgcs1*, *Ldlr* og *Cyp7a1* enn lav- og mellomkalsium-gruppene. Forkilde hadde effekt av uttrykk av *Ldlr*, og betyr at ostediettene (Ost7Ca og Ost20Ca) hadde mer uttrykk *Ldlr* enn smordiettene (Smor7Ca og Smor20Ca).

5 DISKUSJON

Hensikten med denne studien var å undersøke om kalsium fra ost kan ha en potensiell effekt på opptak av langkjedede SFA (> C14:0), utvikling av vekt og fettmasse, og genuttrykk av gener involvert i kolesterolhomeostase. Aterosklerose er den største årsaken til død blant alle HKS, og viktigheten av å finne matvarer eller komponenter i mat som kan ha gunstig effekt på helse og påvirke kjente risikofaktorer er store. En kjent risikofaktor for utvikling av aterosklerotisk plakk er forhøyede nivåer av LDL, som i de fleste studier er assosiert med høyt inntak av SFA. Til tross for store mengder SFA i ost, er det ikke funnet overbevisende sammenheng mellom ost og HKS. Studier har også funnet beskyttende effekt med fermenterte meieriprodukter (f.eks. ost). Mus ble valgt som modell, og matet med høyfett-fôr laget på norsk ost eller smør og syrefelt kasein med ulik mengde kalsium.

5.1 HOVEDFUNN

Gjennom dette masterprosjektet ble det vist at:

- I. Kalsium i store mengder kan ha en mindre vektøkende effekt av høyfettfôr sammenlignet med små mengder kalsium, uavhengig av fôrkilde.
- II. Kalsium har en effekt på fordøyelighet av C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1_{cis9}. Effekten var tydelig for fordøyelighet av C18:0 og C16:0, men for C14:0 og C18:1_{cis9} var det ubetydelige forskjeller.
- III. Kalsium har en mulig effekt på totalkolesterol i plasma ($P = 0,06$).
- IV. Kalsium hadde effekt på uttrykk av gener involvert i kolesterolhomeostase, der samtlige gener hadde høyere ekspresjon i mus fôret med 20 g kalsium sammenlignet med 7 g kalsium.

5.2 EFFEKT AV KALSIMUM PÅ VEKTUTVIKLING

Denne studien demonstrerte, som forventet at høyfett-diett førte til mer vektutvikling enn lavfett chow-diett, men at store mengder kalsium i høyfett-fôret viser en tendens til å motvirke denne effekten. Mus på høyfett-diett laget på smør og syrefelt kasein, tilsatt 2 g Ca/kg fôr (Smør2Ca) hadde ved siste dag oppnådd høyere prosent økning i kroppsvekt sammenlignet med tilsvarende diett med 20 g Ca/kg fôr (Smør20Ca) og lavfett Chow-diett.

Fordi resultater fra andre studier på effekt av kalsiuminntak på kroppsvekt i mennesker og gnagere er varierende (Alomaim et al., 2019; Davies et al., 2000; Jacqmain et al., 2003; Papakonstantinou et al., 2003; Zhang & Tordoff, 2004), var det splittede forventninger til hva vi ville finne. Noen studier finner ingen redusert vekt ved økt inntak av kalsium (Alomaim et al., 2019; Zhang et al., 2020), mens andre har funn som tyder på at kalsium kan bidra til vektreduksjon (Davies et al., 2000; Jacqmain et al., 2003; Papakonstantinou et al., 2003).

En mekanisme bak årsaken til vektforskjellen kan være negativ energibalanse grunnet dannelse av kalsiumsåper og dermed nedsatt absorpsjon av fett i tarmen (Gacs & Barltrop, 1977; Graham & Sackman, 1983; Jandacek, 1991; Mu & Høy, 2004; Soares & She-Ping-Delfos, 2010; Villarroel et al., 2014). Ved nedsatt absorpsjon av fett og økt utskillelse av fett i avføring, vil mengden energi tilført være mindre enn om fordøyeligheten var fullstendig. Smør20Ca-musene hadde dobbelt så mye avføring enn musene matet med små mengder kalsium (Smør2Ca) (figur 4.3B), som kan være en av forklaringene for vektforskjell mellom disse gruppene. Selv om det i dette prosjektet er vist at kalsium har hatt effekt på utskillelse av enkelte fettsyrer, er ikke dette nok til å forklare den store forskjellen i avføringsmengde. Flere studier har funnet økt utskillelse av steroler og gallesyrer i avføring ved høyt inntak av kalsium (Alomaim et al., 2019; Ditscheid et al., 2005; Ma et al., 2011). En grunn til økt utskillelse av steroler er foreslått av Ma og medarbeidere som fant redusert uttrykk av *NPC1L1* fra tarm i ovariektomerte hamstere matet med ulike mengder kalsium (Ma et al., 2011). NPC1L1 i tarm er et transportprotein for kolesterol, og har i hovedoppgave å transportere kolesterol fra tarmlumen inn til enterocytene. En nedregulering an *NPC1L1* sammen med økt mengde steroler i avføring tydet på at kalsium kan direkte eller indirekte påvirke genekspressjon av dette transportproteinet. Videre fant Ma og medarbeidere (Ma et al., 2011) økt utskillelse av gallesyrer i avføring, som også er observert av Alomaim og

DISKUSJON

medarbeidere (Alomaim et al., 2019). Dette kan forklares ved at kalsium kan binde gallesyrer slik at de ikke reabsorberes, og dermed øke utskillelse i avføring (Ditscheid et al., 2005; Ma et al., 2011). I dette prosjektet ble det funnet økt ekspresjon av *Cyp7a1* i musene på høykalsiumdiett sammenlignet med mus matet med mindre mengder kalsium. Dette kan bety økt biosyntese av gallesyrer, grunnet trolig av nedsatt reabsorpsjon i tarmen. Gallesyntese krever energi, og kan i tillegg ha bidratt til vektforskjellen mellom Smør2Ca og Smør20Ca.

Det ville vært interessant å måle genekspresjon av *NPC1L1* i tillegg til en analyse av steroler og gallesyrer i avføringen for å undersøke hva den ekstra avføringsmengden bestod av, og underbygge teorien om at fettsyrer, gallesyrer og steroler skilles ut i avføring i større grad ved høyt inntak av kalsium.

5.3 GLUKOSEKONSENTRASJON OG PLASMA-TOTALKOLESTEROLKOLESTEROL

Glukosekonsentrasjonen i blodet var ikke forskjellig mellom gruppene, og betyr at ingen av gruppene viste på tegn på unormal glukosemetabolisme eller insulinresistens. Dette stemmer over ens funn fra andre studier (Alomaim et al., 2019; Pilvi et al., 2007). Det er viktig å poengtere at det kun ble målt fastende glukosenivåer, og det kunne uansett ikke blitt konkludert med dysregulering av glukosenivåer ved disse målingene, dersom resultatene hadde vist signifikante forskjeller. Ideelt burde det vært målt insulinkonsentrasjoner i tillegg til glukose for å kunne si noe om hvor vidt musene økte insulinproduksjonen for å kompensere for svekket insulinfunksjon. Slike målinger ville derfor kunne gi mer informasjon om hvorvidt musene var i ferd med å utvikle insulinresistens og prediabetes. Typisk vil insulinnivåene reguleres i henhold til behov for å ha stabilt glukosenivå. Høyfett-dietter med mye SFA og TFA har blitt assosiert med insulinresistens (Wilcox, 2005).

Resultatene på totalkolesterol i plasma i dette masterprosjektet viste ingen signifikante forskjeller mellom høyfett-gruppene. Kun Chow-gruppen hadde signifikant lavere totalkolesterol i plasma enn gruppene med lite og middels mengde kalsium (Smør2Ca, Ost7Ca og Smør7Ca). Det ble observert en trend der kalsium mulig kunne ha en effekt på konsentrasjon av totalkolesterol i plasma ($P = 0,06$). Tre mus per gruppe ble ekskludert i

DISKUSJON

denne analysen på grunn av tidsbegrensninger. Tidligere studier har funnet forskjeller (Alomaim et al., 2019; Jacqumain et al., 2003; Kjølback et al., 2017; Pilvi et al., 2007). Det kan med det tenkes at tendensen til effekt observert i denne studien kunne blitt signifikant dersom alle individene var inkludert i analysen. Tidligere har kalsium vist seg å ha positiv effekt på lipidprofil hos gnagere og mennesker (Alomaim et al., 2019; Jacqumain et al., 2003; Kjølback et al., 2017).

Ma og medarbeidere observerte nedregulering av NPC1L1 og oppregulering i ATP-binding cassette (ABC) subfamily G5 (*ABCG5*) og *ABCG8* (Ma et al., 2011). Nedregulering av NPC1L1 tyder på redusert opptak av kolesterol under fordøyelse og kan bidra til lavere total kolesterol-nivåer i plasma. *ABCG5* og *ABCG8* fungerer som heterodimer utelukkende i tarm og lever der de skiller ut steroler i henholdsvis tarmlumen og galle. Oppregulering av *ABCG5/8* i tarm betydde økt utskillelse av steroler for ekskresjon i avføring. Dette fungerer som en alternativ mekanisme for å beskytte mot akkumulering av steroler i plasma (Ma et al., 2011; Wu et al., 2004). Uttrykk av *NPC1L1* og *ABCG5/8* ble ikke analysert i dette prosjektet, men det kan tenkes at vi også ville sett lignende endringer i regulering av disse genene. I dette prosjektet ble det observert mer avføringsmengde og tendens til lavere plasma total kolesterol, økt uttrykk av kolesterol syntese og gallesyresyntese i mus føret med høykalsium-diett. Dette kan tyde på økt utskillelse av kolesterol ved nedregulert *NPC1L1* og oppregulert *ABCG5/8*, og dermed mer avføring, økt behov for endogen kolesterol syntese og gallesyresyntese, samt lavere nivå av plasma total kolesterol.

5.4 FETTSYRER

Det er tidligere vist at kalsium bidrar til økt fett i avføring (Alomaim et al., 2019; Ayala-Bribiesca et al., 2018; Christensen et al., 2009). Som nevnt tidligere i oppgaven er høyt inntak av SFA assosiert med økte nivå av LDL i plasma. I denne studien ble det ekstrahert nøytrale lipider og frie fettsyrer fra avføring til musene. Disse ble derivatisert til FAME og analysert på GC-MS. Kromatogram fra fire FAME ble valgt ut (C14:0, C16:0, C18:0 og C18:1*cis*9), og arealene i kromatogrammene ble analysert for å undersøke om det var forskjell i fordøyelighet av disse fettsyrene mellom de ulike høyfett-gruppene (Smør2Ca, ost7Ca, Smør7Ca, Ost20Ca og Smør20Ca).

DISKUSJON

Denne studien viste at høykalsium-gruppene (20Ca) hadde mindre fordøyelighet av samtlige analyserte fettsyrer enn lavkalsium-gruppen (2Ca), men effekten var ikke like stor som forventet. Fordøyelighet av C18:0 var 6 prosentpoeng lavere ved høykalsium, enn ved lavkalsium fôr. Videre ble det observert for C16:0, en reduksjon på 2,6 prosentpoeng fra Smør2Ca- til høykalsium-musene. Det ble også observert en signifikant forskjell i fordøyelighet av C14:0 og C18:1*cis*9, men effekten var marginal. Videre ble det vist en hovedeffekt av kalsium på fordøyelighet der høykalsium-gruppene hadde mindre fordøyelighet av samtlige fettsyrer enn mellomkalsium-gruppene, uavhengig av fôrkilde.

Alomaim og medarbeidere har i et tilsvarende forsøk fôret rotter med høyfett-diett tilsatt ulike mengder kalsium. De rapporterer 30 prosentpoeng lavere fordøyelighet av C18:0 og 20 prosentpoeng reduksjon i C16:0, i rottene matet med 20 g Ca mot 2 g Ca (Alomaim et al., 2019).

Det ble observert en signifikant forskjell i fordøyelighet av C14:0 og C18:1*cis*9, men betydningen for forskjellen er liten. Fordøyelighet av C14:0 var 99,7 % i Smør2Ca, 97,8 % i Ost20Ca og 99 % i Smør20Ca, som tyder på høy fordøyelighet i alle gruppene. Forskjellen var enda mindre for C18:1*cis*9 med 0,4 prosentpoeng som den største forskjellen (Smør2ca vs. Smør20Ca). At C14:0 og C18:1*cis*9 påvirkes mindre av kalsium enn C16:0 og C18:0 støttes av tidligere observasjoner (Alomaim et al., 2019; Ayala-Bribiesca et al., 2018; Ye et al., 2013). Forklaringen skyldes mest sannsynlig ulik løselighet av kalsiumsåpene dannet i tynntarm under fordøyelse, der kjedelengde og grad av mettetthet påvirker løseligheten (Gacs & Barltrop, 1977; Graham & Sackman, 1983; Jandacek, 1991). Lenger kjedelengde, og mindre mettetthet betyr mindre løselighet og redusert absorpsjon. Dette passer med funn i denne studien der det ble vist at C18:0 hadde lavest fordøyelighet, etterfulgt av C16:0, deretter C14:0 og til slutt C18:1*cis*9.

5.5 GENEKSPRESJON

Dette masterprosjektet har demonstrert at kalsium kan påvirke mRNA-ekspresjon av gener i lever involvert i kolesterolhomeostase. Smør20Ca hadde høyere uttrykk av *Hmgcs1* og *Hmgcr* enn de andre smør-gruppene med lavere dose kalsium (Smør2Ca og Smør7Ca). Kalsium hadde en hovedeffekt på uttrykk av disse genene, der høykalsiumgruppene (Ost20Ca og

DISKUSJON

Smør20Ca) sammen hadde høyere ekspresjon enn mellom-kalsiumgruppene (Ost7Ca og Smør7Ca). *Hmgcs1* og *Hmgcr* koder for proteinene i de to første trinnene i kolesterolsyntese: (1) *Hmgcs1* som initierer prosessen for syntese av kolesterol, og (2) *Hmgcr* som er det første hastighetsbegrensende enzymet i synteseprosessen. Økt ekspresjon av disse genene tyder på økt behov for kolesterol og lever reagerer dermed med å syntetisere mer.

Smør20Ca hadde høyere uttrykk av *Ldlr* enn Smør2Ca og Smør7Ca. Resultatene viste signifikans kun mellom Smør20Ca og Smør7Ca som, av de tre smørdiettene, hadde lavest ekspresjon av dette genet. I likhet med *Hmgcs1* og *Hmgcr* var det også sett en hovedeffekt av kalsium der høykalsiumgruppene (Ost20Ca og Smør20Ca) sammen hadde høyere ekspresjon enn mellom-kalsiumgruppene (Ost7Ca og Smør7Ca). Dette betyr at økt kalsium førte til økt produksjon av reseptoren som frakter LDL inn til cellene (LDLR) og dermed økt opptak av LDL i lever. Ved siden av hovedeffekt av kalsium var det i tillegg signifikant hovedeffekt av fôrkilde, der ostegruppene (Ost7Ca og Ost20Ca) hadde høyere uttrykk *Ldlr* enn smørgruppene (Smør7Ca og Smør20Ca). *Ldlr* var det eneste genet der resultatene viste en hovedeffekt av fôrkilde. Dette kan bety at naturlig kalsium fra ost kan bidra til økt uttrykk av *Ldlr* sammenlignet med tilsatt kalsiumfosfat.

Økt uttrykk av *Hmgcr*, *Hmgcs1* og *Ldlr* tyder på lave nivåer av kolesterol i ER-membranen og økt aktivitet av SREBP2 i lever. Kun ved lave nivåer av kolesterol pakkes SCAP/SREBP2 i vesikler, leveres til golgi-apparatet der N-enden til SREBP2 kuttes av og fraktes til cellekjernen for å oppregulere disse genene. Resultatene stemmer over ens med tidligere forskning er det ble observert økt uttrykk av *Hmgcr*, *Hmgcs1* og *Ldlr* i rotter matet med større mengde kalsium sammenlignet med mindre mengder kalsium (Alomaim et al., 2019). Det ble registrert en trend at kalsium reduserte totalkolesterol i plasma, men det hadde vært relevant og interessant å måle totalkolesterol i levervev for å se om kolesterolnivåene der kunne forklare den økte aktivitet av SREBP2. SREBP2 aktiverer transkripsjon av *Ldlr*, men også proprotein konvertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) som binder LDLR på plasmamembranen og pakkes i clathrin-vesikler (Luo et al., 2020). PCSK9-LDLR-komplekset føres til lysosomer der de degraderes og på den måten resirkuleres ikke LDLR. Det hadde vært interessant å måle sammenligne nivå av mRNA av PCSK9 i levervev i musene for å undersøke om dette kunne bidratt til ikke-signifikante forskjeller i totalkolesterol i plasma.

DISKUSJON

Smør²⁰Ca hadde høyere ekspresjon av *Cyp7a1* enn Smør²Ca og Smør⁷Ca, men kun forskjellen mellom lav- og høykalsium var signifikant. I tillegg var det også her en hovedeffekt av kalsium på uttrykk av *Cyp7a1*, der større mengde kalsium førte til høyere ekspresjon enn middels mengde kalsium. Dette tyder på at kalsium i høye doser i høyfettfôr fører til økt syntese av galle. Dette er i tråd med resultater observert tidligere hvor åde proteinnivåene og mRNA nivåene av *Cyp7a1* økte som følge av økt mengde kalsium gitt ovariektomerte hamstere (Ma et al., 2011).

Økt behov for kolesterol ved økt uttrykk av *Hmgcr*, *Hmgcs1* og *Ldlr*, ved siden av økt syntese av galle sett ved økt uttrykk av *Cyp7a1* tyder på redusert reopptak av gallesyrer. Ved redusert reopptak av gallesyrer oppstår det et behov for å syntetisere mer, og derfor er det behov for mer kolesterol i lever. Kalsium binder ikke bare fettsyrer, men også gallesyrer, som dermed skilles ut i avføring.

5.6 METODOLOGISKE BETRAKTNINGER

Mus som modell i forskning gir fordeler på mange områder. De er små i størrelse og kostnadene er relativt lave sammenlignet med andre forsøksdyr (f.eks. rotter). Vi valgte å huse musene i par av velferdsmessige årsaker. Argumentet for å ha mus i enebur er at det ville gitt mer presis informasjon om parameterne målt burvis (fôrinntak, avføringsmengde og fettsyreprofil i avføringen). Mus er sosiale dyr, og tiden i buret (5 uker) var for lang for at dette kunne utføres med god velferd. Vi var påpasselige med å sikre at alle dyrene fikk samme behandling og lik intervensjonstid. Det ble kun terminert 12 mus per dag, og terminering startet til samme tid hver dag, slik at alle dyr var i samme metabolske tidsrom under henting av prøvene.

Det ble tatt en avgjørelse om å ha med en Chow-gruppe som skulle fungere som en «sunn» referanse. I ettertid ble vi så vi at det var vanskelig å inkludere Chow-gruppen i analysene om effekt av kalsium eller fôrkilde, og det kan argumenteres med at denne gruppen kanskje var unødvendig å inkludere. Etske årsaker Hadde prosjektet blitt planlagt på nytt, hadde ikke Chow-gruppen vært med, ikke bare av forskningsmessige grunner, men også etiske. Det skal sies at Chow-gruppen ikke var bortkastet. Vi innså at det ble vanskelig å sammenligne Chow

DISKUSJON

med de andre gruppene, og innså at denne gruppen kunne blitt utelatt fra forøket av etiske grunner (minske antall forsøksdyr).

En svakhet ved studien er manglende lavkalsium-ostegruppe. På grunn av det høye naturlige innholdet av kalsium i ost var det ikke mulig å inkludere en slik gruppe. En lavkalsium-ostegruppe ville styrket studien ved at det kunne blitt utført to-veis ANOVA med data fra lavkalsium-grupper i tillegg til normal- og høykalsium.

Spørsmålet om 2 g Ca/kg fôr representerte tilstrekkelig inntak av kalsium var diskutert. At Smør2Ca hadde samme vektøkning som mellomkalsium-gruppene (Ost7Ca og Smør7Ca), i tillegg til samme mengde fettmasse, kan forsvarer argumentet om at 2 g Ca/kg fôr er tilstrekkelig daglig inntak for en voksen mus. Tegn på kalsiumunderskudd i mus inkluderer nedsatt vekt, beinaske og serum kalsium (National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, 1995). Det ble ikke testet serum kalsium, eller beinstruktur i denne studien, men faktum at Smør2Ca-musene ikke opplevde redusert vekt samtidig som fettmassen var den samme som for de andre musene, gir ingen indikasjon på dårlig benstruktur.

På grunn av tidsbegrensninger under masterprosjektet ble ikke analyse av fettsyrer utført med mer enn én ekstraksjon og analyse per fôrtype og bur. Ideelt sett burde det vært tatt ut flere prøver for å kvalitetssikre data.

Avføringsprøvene ble fraksjonert med SPE for å bekrefte at fettsyre i avføring hovedsakelig forekom i fri form, og ikke bundet til glyserol. Kalsium binder kun frie fettsyrer på overflaten av lipiddråpene i tarmen under fordøyelse, og en sammenligning av fraksjonen med nøytrale lipider kunne trolig bekrefte dette. På grunn av tidsbegrensninger ble ikke analyser av disse dataene utført.

5.7 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID

På grunn av tidsbegrensninger ble ikke fettsyreanalysen like omfattende som først tiltenkt. Fettekstraksjon, fast fase ekstraksjon og GC-MS, bearbeiding av rådata i Chromeleon og omregning til mg og prosent tilsynelatende fordøyelighet i Microsoft Excel er stort og tidskrevende arbeid. Videre arbeid vil naturligvis inkludere full fettsyreprofil i fôr og avføring, inndeling i fettsyrekategorier (SFA, MUFA, PUFA og TFA), og til slutt tilsynelatende fordøyelighet av alle fettsyrer. Fordi TFA ved siden av SFA har vist å virke negativt på helse og risiko for sykdom, ville analyser av TFA kunne gi nyttig informasjon om kalsiums effekt på opptak av TFA. I tillegg kunne det blitt utviklet en ratio-kalkulert opptak av PUFA:SFA, som videre kunne blitt sammenlignet med en eventuell totalkolesterol:HDL- og LDL:HDL-ratio. Ratio av total kolesterol til HDL er mer informativt som mål på risiko for iskemisk hjertesykdom, enn totalkolesterol, HDL eller LDL alene (Lewington et al., 2007). I dette masterprosjektet ble det målt totalkolesterol i plasma, men totalkolesterol sier ingen ting om fordelingen av de ulike lipoproteinene (LDL og HDL). For bedre å undersøke om høy-kalsium-gruppene hadde bedre forutsetninger vil en naturlig analyse for videre arbeid være et mål på HDL i tillegg til totalkolesterol. Ideelt hadde det vært interessant å måle størrelsen på LDL-molekylene, for å finne ut av om det var forskjell i konsentrasjon av små, tette LDL-molekyler blant gruppene. Det skal sies at gnagere har en annen lipidprofil enn mennesker, der HDL i tillegg til revers kolesteroltransport også har i oppgave å levere kolesterol til enkelte perifere vev. En full kolesterolanalyse i plasma til mus kan derfor ikke overføres direkte til mennesker, men det kan bidra til større forståelse av lipoproteinmetabolisme.

Som nevnt tidligere ble det målt fastende glukosekonsentrasjon, men ikke insulinnivåer i blodet til musene. På grunn av tidsbegrensninger under lockdown ved Covid-19-pandemien, ble det tatt en avgjørelse om å ikke gjøre en slik analyse. For å undersøke om musene viste tegn på insulinresistens eller prediabetes ville det vært relevant å utføre en insulin-analyse.

6 KONKLUSJON

HKS er den ledende dødsårsaken verden over, med aterosklerotiske sykdommer som de helt klart viktigste grunnene til mortalitet. Lipider er viktige molekyler i kroppen og inngår i en rekke metabolske prosesser, men for høye nivåer av spesielt er forbundet med økt risiko for HKS.

Gjennom dette masterprosjektet har det blitt vist at kalsium har effekt på vektutvikling, men ingen eller marginal effekt av kalsium på fettmasse. Kalsium førte til store forskjeller i avføringsmengder, som trolig henger sammen med kalsiums påvirkning på opptak av langkjedede SFA i tynntarm samt økt produksjon av galle. Dette kan ha betydning for energiregnskapet ved at fett blir dårligere tatt opp og at musene bruker mer energi på å produsere galle som ender opp i avføringen som «overflødig» energi. Videre ble det vist at kalsium kan påvirke faktorer for høye nivåer av LDL i plasma. Mye tilsier at kalsium bidrar til redusert nivå av plasma totalkolesterol. I dette prosjektet er det kun sett en svak trend, men med støtte fra tidligere forskning er det grunn til å mene at kalsium reduserer plasma totalkolesterol. Mekanismene bak redusert plasmakolesterol kan innebære redusert opptak av SFA og redusert reopptak av gallesyrer.

Det ble ikke observert en klar effekt av fôrkilde i dette prosjektet. Videre forskning er nødvendig for å undersøke om kalsium fra meieriprodukter kan motvirke de mulige negative helseeffektene av langkjedede SFA og TFA på HKS.

REFERANSER

- Alexander, D. D., Bylsma, L. C., Vargas, A. J., Cohen, S. S., Doucette, A., Mohamed, M., Irvin, S. R., Miller, P. E., Watson, H. & Fryzek, J. P. (2016). Dairy consumption and CVD: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr*, 115 (4): 737-50. doi: 10.1017/s0007114515005000.
- Alomaim, H., Griffin, P., Swist, E., Plouffe, L. J., Vandelloo, M., Demonty, I., Kumar, A. & Bertinato, J. (2019). Dietary calcium affects body composition and lipid metabolism in rats. *PLoS One*, 14 (1): e0210760. doi: 10.1371/journal.pone.0210760.
- Ayala-Bribiesca, E., Turgeon, S. L., Pilon, G., Marette, A. & Britten, M. (2018). Postprandial lipemia and fecal fat excretion in rats is affected by the calcium content and type of milk fat present in Cheddar-type cheeses. *Food Res Int*, 107: 589-595. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.058.
- Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal physiology*. 2nd edition.. utg.: New York : McGraw-Hill Education.
- Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of lipid research*, 50 (10): 1955-1966. doi: 10.1194/jlr.R900010-JLR200.
- Chiang, J. Y. L. & Ferrell, J. M. (2020). Up to date on cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis. *Liver Research*, 4 (2): 47-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.05.001>.
- Christensen, R., Lorenzen, J. K., Svith, C. R., Bartels, E. M., Melanson, E. L., Saris, W. H., Tremblay, A. & Astrup, A. (2009). Effect of calcium from dairy and dietary supplements on faecal fat excretion: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obes Rev*, 10 (4): 475-86. doi: 10.1111/j.1467-789X.2009.00599.x.
- Damodaran, S. & Parkin, K. L. (red.). (2017). *Fennema's Food Chemistry*. 5. utg.: CRC Press.
- Davies, K. M., Heaney, R. P., Recker, R. R., Lappe, J. M., Barger-Lux, M. J., Rafferty, K. & Hinders, S. (2000). Calcium Intake and Body Weight. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85 (12): 4635-4638. doi: 10.1210/jcem.85.12.7063.
- Ditscheid, B., Keller, S. & Jahreis, G. (2005). Cholesterol metabolism is affected by calcium phosphate supplementation in humans. *J Nutr*, 135 (7): 1678-82. doi: 10.1093/jn/135.7.1678.
- Drevon, C. A. & Blomhoff, R. (2014). *Mat og medisin*. Oslo: Cappelen Damm Høyskoleforlaget.
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226 (1): 497-509.
- Gacs, G. & Barltrop, D. (1977). Significance of Ca-soap formation for calcium absorption in the rat. *Gut*, 18 (1): 64-8. doi: 10.1136/gut.18.1.64.
- Geissler, C. & Powers, H. (2011). *Human Nutrition*, b. 12. utgave. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone.
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (2009). The LDL receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29 (4): 431-438. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179564.
- Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell*, 161 (1): 161-172. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.036.
- Graham, D. Y. & Sackman, J. W. (1983). Solubility of calcium soaps of long-chain fatty acids in simulated intestinal environment. *Digestive Diseases and Sciences*, 28 (8): 733-736. doi: 10.1007/BF01312564.

REFERANSER

- Guo, J., Astrup, A., Lovegrove, J. A., Gijbbers, L., Givens, D. I. & Soedamah-Muthu, S. S. (2017). Milk and dairy consumption and risk of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Epidemiol*, 32 (4): 269-287. doi: 10.1007/s10654-017-0243-1.
- Iqbal, J. & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296 (6): E1183-E1194. doi: 10.1152/ajpendo.90899.2008.
- Jacqmain, M., Doucet, E., Després, J.-P., Bouchard, C. & Tremblay, A. (2003). Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (6): 1448-1452. doi: 10.1093/ajcn/77.6.1448.
- Jandacek, R. J. (1991). The solubilization of calcium soaps by fatty acids. *Lipids*, 26 (3): 250-253. doi: 10.1007/BF02543981.
- Kjølbæk, L., Lorenzen, J. K., Larsen, L. H. & Astrup, A. (2017). Calcium intake and the associations with faecal fat and energy excretion, and lipid profile in a free-living population. *J Nutr Sci*, 6: e50. doi: 10.1017/jns.2017.55.
- Kraus, D., Yang, Q. & Kahn, B. B. (2015). Lipid Extraction from Mouse Feces. *Bio Protoc*, 5 (1). doi: 10.21769/bioprotoc.1375.
- Larsson, S. C., Crippa, A., Orsini, N., Wolk, A. & Michaëlsson, K. (2015). Milk Consumption and Mortality from All Causes, Cardiovascular Disease, and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 7 (9): 7749-63. doi: 10.3390/nu7095363.
- Lewington, S., Whitlock, G., Clarke, R., Sherliker, P., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Peto, R. & Collins, R. (2007). Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*, 370 (9602): 1829-39. doi: 10.1016/s0140-6736(07)61778-4.
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L. & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (1): 56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.
- Luo, J., Yang, H. & Song, B. L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21 (4): 225-245. doi: 10.1038/s41580-019-0190-7.
- Ma, K. Y., Yang, N., Jiao, R., Peng, C., Guan, L., Huang, Y. & Chen, Z. Y. (2011). Dietary calcium decreases plasma cholesterol by down-regulation of intestinal Niemann-Pick C1 like 1 and microsomal triacylglycerol transport protein and up-regulation of CYP7A1 and ABCG 5/8 in hamsters. *Mol Nutr Food Res*, 55 (2): 247-58. doi: 10.1002/mnfr.201000161.
- Macherey-Nagel. (2019). *RNA and protein purification - User manual: Macherey-Nagel*. Tilgjengelig fra: <https://www.mn-net.com/media/pdf/e2/e8/67/Instruction-NucleoSpin-RNA-Protein.pdf> (lest 19.03.21).
- McCarron, D. A., Morris, C. D., Henry, H. J. & Stanton, J. L. (1984). Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science*, 224 (4656): 1392-8. doi: 10.1126/science.6729459.
- Morris, S. M. & Cooper, J. A. (2001). Disabled-2 colocalizes with the LDLR in clathrin-coated pits and interacts with AP-2. *Traffic*, 2 (2): 111-23. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.020206.x.

REFERANSER

- Moss, G. P. (2013). *Nomenclature of Organic Chemistry. IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013*. Blue Book. London, UK: Queen Mary University of London. Tilgjengelig fra: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/BlueBook/>.
- Mu, H. & Høy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43 (2): 105-133. doi: [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00050-X).
- Mullie, P., Pizot, C. & Autier, P. (2016). Daily milk consumption and all-cause mortality, coronary heart disease and stroke: a systematic review and meta-analysis of observational cohort studies. *BMC Public Health*, 16 (1): 1236. doi: 10.1186/s12889-016-3889-9.
- Müller, H., Kirkhus, B. & Pedersen, J. I. (2001). Serum cholesterol predictive equations with special emphasis on trans and saturated fatty acids. an analysis from designed controlled studies. *Lipids*, 36 (8): 783-91. doi: 10.1007/s11745-001-0785-6.
- Nasjonalt råd for ernæring. (2011). *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer*. Oslo: Helsedirektoratet.
- National Research Council Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. (1995). Nutrient Requirements of the Mouse. doi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK231918/>.
- NCBI. (2021). *National Center for Biotechnology Information*. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (lest mars 2021).
- Nordic Council of Ministers. (2014). *Nordic Nutrition Recommendations 2012: Integrating Nutrition and Physical Activity*: Nordic Council of Ministers.
- Papakonstantinou, E., Flatt, W. P., Huth, P. J. & Harris, R. B. (2003). High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes Res*, 11 (3): 387-94. doi: 10.1038/oby.2003.52.
- Pilvi, T. K., Korpela, R., Huttunen, M., Vapaatalo, H. & Mervaala, E. M. (2007). High-calcium diet with whey protein attenuates body-weight gain in high-fat-fed C57Bl/6J mice. *British Journal of Nutrition*, 98 (5): 900-907. doi: 10.1017/S0007114507764760.
- PrimerBiosoft. (2021). *NetPrimer*. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/> (lest mai 2021).
- Rader, D. J. (2006). Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest*, 116 (12): 3090-100. doi: 10.1172/jci30163.
- Ross, A. C., Caballero, B., Cousins, R. J., Tucker, K. L. & Ziegler, T. R. (2014). *Modern nutrition in health and disease*. 11. utgave utg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Sigma-Aldrich. (2020). *Cholesterol Quantification Kit*. Technical bulletin. Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/420/556/mak043bul.pdf> (lest 28.06.2021).
- Soares, M. J. & She-Ping-Delfos, W. L. (2010). Postprandial energy metabolism in the regulation of body weight: is there a mechanistic role for dietary calcium? *Nutrients*, 2 (6): 586-98. doi: 10.3390/nu2060586.
- Statistikkbanken. (2021). *Dødsårsaksregisteret*: Folkehelseinstituttet. Tilgjengelig fra: <http://statistikkbank.fhi.no/dar/>.
- Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L. & Tall, A. R. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (38): 15093-15098. doi: 10.1073/pnas.0704602104.

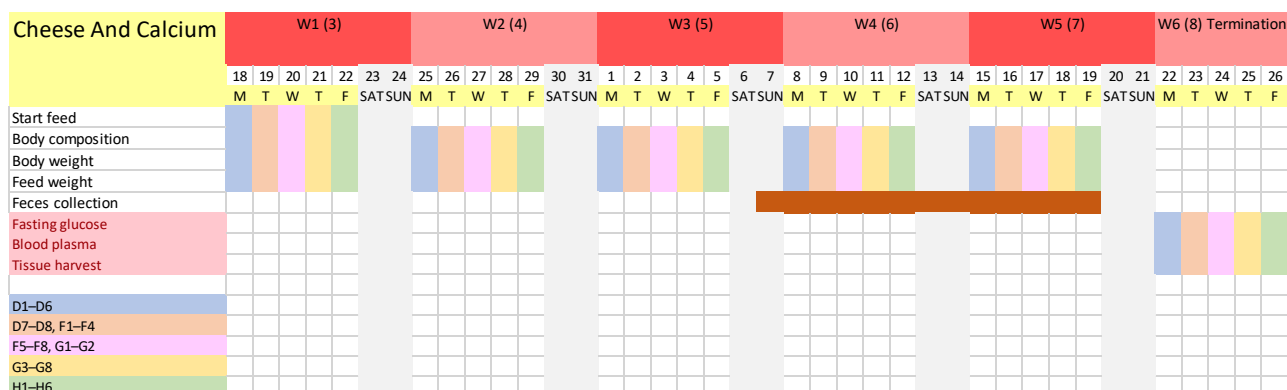
REFERANSER

- Thermo Fisher Scientific. (2021). *Value Oligos*. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/order/custom-oligo/enterSequences#> (lest 16.04.2021).
- Thorning, T. K., Bertram, H. C., Bonjour, J. P., de Groot, L., Dupont, D., Feeney, E., Ipsen, R., Lecerf, J. M., Mackie, A., McKinley, M. C., et al. (2017). Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps. *Am J Clin Nutr*, 105 (5): 1033-1045. doi: 10.3945/ajcn.116.151548.
- Torcello-Gómez, A., Boudard, C. & Mackie, A. R. (2018). Calcium Alters the Interfacial Organization of Hydrolyzed Lipids during Intestinal Digestion. *Langmuir*, 34 (25): 7536-7544. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b00841.
- Totland, T. H., Melnæs, B. K., Lundberg-Hallén, N., Helland-Kigen, K. M., Lund-Blix, N. A., Myhre, J. B., Johansen, A. M. W., Løken, E. B. & Andersen, L. F. (2012). *NORKOST 3: En landsomfattende kostholdsundersøkelse blant menn og kvinner i Norge i alderen 18-70 år, 2010-11*. Oslo.
- Villarroel, P., Villalobos, E., Reyes, M. & Cifuentes, M. (2014). Calcium, obesity, and the role of the calcium-sensing receptor. *Nutr Rev*, 72 (10): 627-37. doi: 10.1111/nure.12135.
- Wang, T. Y., Liu, M., Portincasa, P. & Wang, D. Q. (2013). New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur J Clin Invest*, 43 (11): 1203-23. doi: 10.1111/eci.12161.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*, 26 (2): 19-39.
- World Health Organization. (2020). *Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age Sex, by country and by Region, 2000-2019*. Geneva: World Health Organization. Tilgjengelig fra: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death> (lest 27.07.2021).
- Wu, J. E., Basso, F., Shamburek, R. D., Amar, M. J., Vaisman, B., Szakacs, G., Joyce, C., Tansey, T., Freeman, L., Paigen, B. J., et al. (2004). Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem*, 279 (22): 22913-25. doi: 10.1074/jbc.M402838200.
- Ye, A., Cui, J., Zhu, X. & Singh, H. (2013). Effect of calcium on the kinetics of free fatty acid release during in vitro lipid digestion in model emulsions. *Food Chem*, 139 (1-4): 681-8. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.02.014.
- Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E. & menevse, s. (2012). Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. I, s. 229-254.
- Zhang, K., Chen, X., Zhang, L. & Deng, Z. (2020). Fermented dairy foods intake and risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of cohort studies. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60 (7): 1189-1194. doi: 10.1080/10408398.2018.1564019.
- Zhang, Q. & Tordoff, M. G. (2004). No effect of dietary calcium on body weight of lean and obese mice and rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286 (4): R669-77. doi: 10.1152/ajpregu.00655.2003.

BILAG

BILAG


BILAG A – DETALJERT TIDSPLAN OVER MUSEPROSJEKT



Figur A Detaljert tidsplan over museprosjektet. Figuren viser på hvilke dager musene ble håndtert (vekt av mus og fôr, kroppskomposisjon osv.) Dette ble gjort for at intervensjonstiden skulle bli lik for hver eneste mus.

BILAG B – DIETTER

Tabell B.1 RM1 (E)

Produktnavn	Leverandør	PDF	URL
Rat and Mouse No.1	Special Diets		https://sdsdiets.com/wp-content/uploads/2021/02/rm1p-e-fg.pdf
Maintenance Expanded (RM1 (E))	Services	rm1 sds.pdf	

BILAG

Tabell B.2 Diettkomposisjon av de tillagde diettene

	Smør 2 g ca/kg (Smør2)		Ost 7 g ca/kg (Ost7)		Smør 7 g ca/kg (Smør7)		Ost 20 g ca/kg (Ost20)		Smør 20 g ca/kg (Smør20)	
	Gram%	Kcal%	Gram%	Kcal%	Gram%	Kcal%	Gram%	Kcal%	Gram%	Kcal%
Protein	23	20,2	20,6	20	22,6	20,2	21,8	20	21,6	20,2
Karbohydrat	39,4	34,5	39,4	34,5	38,8	34,5	37,7	34,5	37	34,5
Fett	23	45,2	23,1	45,4	22,6	45,2	22,1	45,4	21,3	45,2
Annet (vitaminmix)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Total		100		100		100		100		100
Kcal/gram	4,6		4,6		4,5		4,4		4,3	

Ingredienser	Gram	Kcal	Gram	Kcal	Gram	Kcal	Gram	Kcal	Gram	Kcal
Ost			451,7	2638			431	2521		
Smør	242,9	1818			239	1787			228	1705
Kasein	225,7	903	22,5	90	222	888	21,5	86	211,5	847
L-Cystine	3,4	14	3,4	16	3,3	13	3,2	13	3,2	13
Sukrose	199,5	798	199,9	799	196	785	190,5	762	187	749
Dyetrose	112,8	452	112,9	452	111	444	107,7	431	106	424
Stivelse	82,2	329	82,2	329	80,8	323	78,4	314	77,1	308
Cellulose	56,4		56,4		55,5		53,8		52,9	
Soyabønne-olje	28,2	254	28,2	254	27,7	250	26,9	242	26,5	238
Mineral-mix uten kalsium	39,5		39,5		38,8		37,7		37,1	
Vitamin-mix	1,1	1,1	1,1	4	1,1	4	1,1	4	1,1	4
Cholin-bitrat	2,3		2,2		2,2		2,2		2,1	
Kalsium-fostat	6				22,6		46		67,5	
Total	1000	4569	1000	4582	1000	4494	1000	4373	1000	4288

BILAG

BILAG C – INSTRUMENTER, ROBOTER OG ANNET ELEKTRONISK UTSTYR

Tabell C Instrumenter, roboter og annet elektronisk utstyr

Produktnavn	Leverandør
Accu-Chek Aviva glukoseapparat og teststrimler	Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland
Agilent RNA 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
C1000 Thermal Cycler with Dual 48/48 Fast Reaction Module	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Crypto Peerless TRS	Crypto Peerless, Birmingham, England
Dosimat plus 876	Metrohm, Høvik, Norge
Gel Doc EZ Imager	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Glødeovn	Carbolite, Sheffield, England
Grindomix GM 200 (prod. 2001)	Retch, Haan, Tyskland
GX-274 ASPEC System	Gilson Inc., Middleton, WI, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Discovery DSC-NH₂ SPE Tube, 3 mL, 52637-U Lot # 12546801 	<ul style="list-style-type: none"> • Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Heto DryWinner 6-85	Heto-Holten, Danmark
IKA A11 basic analytical mill	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland
LightCycler 480 Instrument II Roche	Applied Science, Indianapolis, IN, USA
Minispec LF50 mq 7.5	Bruker Corporation, MA, USA
NanoDrop 2000	NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Ori-Block DB-3	Techne, Staffordshire, UK
PTC-200 Thermal Cycler	MJ research, Waltham, MA, USA
Reacti-Vap III #18826 Evaporation Unit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Stuart Block Heater SBH130D/3	Cole-Parmer, Staffordshire, UK
Stuart Sample Concentrator, SBHCONC/1	Cole-Parmer, Staffordshire, UK
SpectraMax M2 microplate reader	Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA
TRACE 1310 med AI/AS 1310 Series Autosampler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"> • Rtx-2330 60 m x 0,25 mm x 0,2 um capillary coloumn 	<ul style="list-style-type: none"> • Restek, Bellefonte, PA, USA
VENTI-Line	VWR International, Oslo, Norge

Materialer med punktmerke og innrykk er kolonner brukt til analysen med tilhørende robot/maskin

BILAG

BILAG D – PROGRAMVARE

Tabell D Programvarer benyttet til ulike analyser

Programvare	Leverandør/utvikler
2100 Expert Software	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA. Tilgjengelig fra: https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-software/2100-expert-software-228259
Chromeleon v7.2.9	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Excel	Microsoft Corporation, https://office.microsoft.com/excel
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Tilgjengelig fra: https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
LightCycler 480 Software	Idaho Technology
LinRegPCR	Dr. Jan Ruijter, Academic Medical Centre, Amsterdam, Nederland
SoftMax Pro 6,5	Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA
Trilution	Gilson, Middleton, WI, USA

BILAG E – NETTSIDER

Tabell E Nettsider

Nettside	URL
Biorender	https://biorender.com/
ChemDraw	https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html
GenBank – NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
NetPrimer – Primer Biosoft	http://www.premierbiosoft.com/netprimer/
Primer-BLAST – NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi
Value Oligos – Thermo Fisher Scientific	https://www.thermofisher.com/order/custom-oligo/enterSequences#

BILAG

BILAG F – ZRF-COCKTAIL

Tabell F Sammensetning av ZRF-cocktail

Veterinærmiddel	Virkestoff	Mengde per mL 0,9 % Steril isotonisk NaCl
Fentadon vet. 545281 (50 mg/mL)	Fentanyl	2,6 µg
Rompun vet. 023446 (20 mg/mL)	Xylazine	0,45 mg
Zoletil Forte 485292 (250 mg/mL)	Zolazepam	3,3 mg
	Tiletamine	3,3 mg

BILAG G – KIT

Tabell G Diverse kit

Produktnavn	Leverandør
5x HOT FIREPol Blend Master Mix Ready to Load	Solis BioDyne, Tartu, Estland
5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix	Solis BioDyne, Tartu, Estland
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Cholesterol Quantification Kit (MAK043)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA Ladder Ready to Load	Solis Biodyne, Tartu, Estland
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
NucleoSpin® RNA/Protein: RNA and protein purification	Macherey-Nagel, Düren, Tyskland

BILAG H – FETTSYRER

Tabell H Kjente fettsyrer benyttet i analyse av fettsyrer i fôr og avføring

Produktnavn	Leverandør
A 37-component fatty acid methyl ester (FAME) mix	Food Industry Fame Mix, Restek, Bellefonte, PA, USA
Nonadecanoic acid 10-1900 (C19:0 FFA)	Larodan, Monroe, MI, USA
Trininadecanoic acid 33-1900 (C19:0 TAG)	Larodan, Monroe, MI, USA

BILAG

BILAG I – ANNET

Tabell I Annet utstyr

Materialer	Leverandør
Bur og burtilbehør	Innovive, San Diego, CA https://www.innovive.com/products/mouse-products/
LightCycler 480 Multiwell Plate 96w, white	Life science Roche
Millex-FG PTFE membrane Syringe Filter, SLFG025, 0,20 µm	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland

BILAG

BILAG J – KJEMIKALIER OG REAGENSER

Tabell J Kjemikalier og reagenser utenom kit

Produktnavn	Leverandør
BF3: Bortrifluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dietyl eter $\geq 99,9$ %, CHROMASOLV for HPLC, 309966-1L, Lot # SHBG4300V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dietyl eter 100 %, AnalaR NORMAPUR, 23811.292, Lot # 21A214127	VWR International, Leuven, Belgia
Eddiksyre $\geq 99,8$ %, 33209-2,5L, Lot # SZBG2240	Fluka: Honeywell, Charlotte, NC, USA
Etylendiaminetetraacetate acid disodium salt solution (EDTA), E7889	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eichrome Black T, A.C.S. reagent, indicator grade, 858390-100G, Lot # MKBB7511	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fentadon vet (545281) (50 mg/mL)	Dechra Veterinary Products AS, Oslo, Norge
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10 000x in Water	Biotium, Hayward, CA
Hydrochloric acid (HCl) fuming 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Heptan ≥ 99 %, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, 24539.320, Lot # 200213A006	VWR International, Gliwice, Polen
Kloroform stabilisert med rundt 0,6 % etanol 99 – 99,4 %, AnalaR NORMAPUR, 22711.324, Lot # 20K122375	VWR International, Saint-Prix, Frankrike
SeaKem LE Agarose, Lonza	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Metanol $\geq 99,9$ %, HiPerSolv CHROMANORM for HPLC, 83638.320, Lot # 191115C001	VWR International, Gliwice, Polen
Molecular Biology Grade Water, 46-000-CV 500 mL, Lot # 27017005	Corning, Glendale, AZ, USA
Natrium, metallisk	Purum, Merck, Dramstadt, Tyskland
PBS: Fosfate buffered saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNA ^{later} Tissue Collection: RNA stabilization Solution (R0901-500ML-PW)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RnaseZAP (R2020-250ML), Lot # SLBW8968	Sigma-Aldrich, ST- Louis, MO, USA
Rompun vet (023446) (20 mg/mL)	Bayer Animal Health
Svovelsyre 95–97%, EMSURE ISO for analyse, Supelco, 1.00731.2500, Lot # K52430731 020	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
TE-buffer, 12090-015, Lot # 1900991	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zoletil Forte (485292) (250 mg/mL)	Virbac, Sollihøgda, Norge

BILAG K – SPESIFIKKE SØKSBETINGELSER VED DESIGN AV PRIMERE

PCR Template Retrieve recent results Publication Tips for finding specific

Enter accessions, FASTA sequences or a Gene ID (A refseq record is preferred)

Or, upload FASTA file Ingen fil valgt

Query exclusion Exclude predicted transcripts (XM_ accessions)

Range

Forward primer From To

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand)

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand)

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (T_m) Min Opt Max Max T_m difference

Exon/intron selection A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Min 5' match Min 3' match Max 3' match

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min Max

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Specificity check Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template

Search mode

Database

Exclusion Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/environmental sample sequences

Organism

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end.

Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target amplicon size

Show results in a new window Use new graphic view

Figur K.1 Innstillinger ved primerBLØST del 1/3. Bokser med gul ring indikerer endring fra standard innstillinger.

BILAG

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Advanced parameters

Primer Pair Specificity Checking Parameters

Max number of sequences returned by Blast	50000	?
Blast expect (E) value	30000	?
Blast word size	7	?
Max primer pairs to screen	500	?
Max targets to show (for designing new primers)	20	?
Max targets to show (for pre-designed primers)	1000	?
Max targets per sequence	100	?

Primer Parameters

PCR Product Tm	Min	Opt	Max
Primer Size	Min: 18	Opt: 20	Max: 25
Primer GC content (%)	Min: 20.0	Max: 80.0	
GC clamp	0	?	
Max Poly-X	5	?	
Max 3' Stability	9	?	
Max GC in primer 3' end	5	?	
Secondary Structure Alignment Methods	<input type="checkbox"/> Use Thermodynamic Oligo Alignment <input type="checkbox"/> Use Thermodynamic Template Alignment (warning: search may be very slow with this option on) ?		
TH: Max Template Mispriming	Primer: 40.00	Pair: 70.00	(For thermodynamic alignment model only)
TH: Max Self Complementarity	Any: 45.0	3': 35.0	(For thermodynamic alignment model only)
TH: Max Pair Complementarity	Any: 45.0	3': 35.0	(For thermodynamic alignment model only)
TH: Max Primer Hairpin	24.0 (For thermodynamic alignment model only)		
Max Template Mispriming	Primer: 12.00	Pair: 24.00	(For old secondary structure alignment model only)

Figur K.2 Innstillinger for primerBLAST del 2/3. Bokser med gul ring indikerer endring fra standard innstillinger.

BILAG

Max Template Mispriming	<input type="text" value="12.00"/>	<input type="text" value="24.00"/> (For old secondary structure alignment model only)
Max Self Complementarity	<input type="text" value="8.00"/>	<input type="text" value="3.00"/> (For old secondary structure alignment model only)
Max Pair Complementarity	<input type="text" value="8.00"/>	<input type="text" value="3.00"/> (For old secondary structure alignment model only)
Excluded regions	<input type="text"/> ?	
Overlap junctions	<input type="text"/> ?	
	<input type="text" value="7"/>	<input type="text" value="4"/>
	Minimal number of nucleotides that the left or the right primer must have at the 5' or 3' side of the junctions	
Concentration of monovalent cations	<input type="text" value="50.0"/> ?	
Concentration of divalent cations	<input style="border: 2px solid yellow;" type="text" value="2.5"/> ?	
Concentration of dNTPs	<input style="border: 2px solid yellow;" type="text" value="0.8"/> ?	
Salt correction formula	<input type="text" value="SantaLucia 1998"/> ?	
Table of thermodynamic parameters	<input type="text" value="SantaLucia 1998"/> ?	
Annealing Oligo Concentration	<input style="border: 2px solid yellow;" type="text" value="150.0"/> ?	
SNP handling	<input type="checkbox"/> Primer binding site may not contain known SNP ?	
Repeat filter	<input type="text" value="Automatic"/> ?	
	Avoid repeat region for primer selection by filtering with repeat database	
Low complexity filter	<input checked="" type="checkbox"/> Avoid low complexity region for primer selection ?	

Internal hybridization oligo parameters

Pick internal hybridization oligo

	Min	Opt	Max
Hyb Oligo Size	<input type="text" value="18"/>	<input type="text" value="20"/>	<input type="text" value="27"/>
Hyb Oligo tm	<input type="text" value="57.0"/>	<input type="text" value="60.0"/>	<input type="text" value="63.0"/>
Hyb Oligo GC%	<input type="text" value="20.0"/>	<input type="text" value="50"/>	<input type="text" value="80.0"/>

Show results in a new window

 Use new graphic view ?

Tabell K.3 Innstillinger for primerBLAST del 3/3. Bokser med gul ring indikerer endring fra standard innstillinger.

BILAG

BILAG L – PRIMERE

Tabell L Oversikt over alle designede, bestilte, testede og brukte primere

Primer	Sequence (5'-3')	Length	Start	Stop	GC %	Prod. Length	Rating
Cyp7a1_1Fw	CTACCCAGACCCTTIGACTT	20	1261	1280	50	65	100
Cyp7a1_1Rv	TGGTCTTTGCTTTCCCACTT	20	1325	1306	45		87
Cyp7a1_2Fw	GTGAATGGAGCATTACAGAGT	21	1004	1024	43	191	90
Cyp7a1_2Rv	GAACCATCCTCAAGGTGTAGA	21	1194	1174	48		99
Cyp7a1_3Fw	TGGGCATCTCAAGCAAACAC	20	911	930	50	76	100
Cyp7a1_3Rv	TCATTGCTTCAGGGCTCCTG	20	986	967	55		82
hmgr_1Fw	CTTGACGCTCTTGTGGAATG	20	1067	1086	50	169	100
hmgr_1Rv	TTTCACGAGAAAGCTCTAGGA	21	1235	1215	43		87
hmgr_2Fw	CAGCCATTTTGCCAGAGTTT	20	1264	1283	45	93	100
hmgr_2Rv	AGGACCAAGCCTAAAGACATA	21	1356	1336	43		99
hmgr_3Fw	GACCAACCTTCTACCTCAGC	20	2570	2589	55	54	100
hmgr_3Rv	GCTCCTTGAACACCTAGCAT	20	2623	2604	50		88
hmgr_Fw	ACGCAACCTCTATATCCGTTT	21	2429	2449	43	171	88
hmgr_Rv	TTTATGGCAGCAGGCTTCTT	20	2599	2580	45		100
hmgr_Fw	CAACCTCTATATCCGTTTCCAG	22	2432	2453	45	83	92
hmgr_Rv	GCAGTGCTTTCTCCGTACC	18	2514	2496	58		91
hmgr_Fw	ATCCAGGAGCGAACCAAGAG	20	1675	1694	55	101	100
hmgr_Rv	TACAGAAGCCCCAAGCACAA	20	1775	1756	50		100
ldlr_1Fw	GGGCAATCGGAAAACCATTT	20	1978	1997	45	88	90
ldlr_1Rv	TGTCCAATACACTTTGTCCTCA	22	2065	2044	41		100

BILAG

ldlr_3Fw	GCCGTCTCTATTGGGTTGAT	20	1920	1939	50	145	100
ldlr_3Rv	GTCCAATACACTTTGTCCTCA	21	2064	2044	43		100
ldlr_2Fw	GGCATCACACTAGATCTTTCC	21	1895	1915	48	103	85
ldlr_2Rv	AAATGGTTTTCCGATTGCC	20	1997	1978	45		100
ldlr_3Fw	GCCGTCTCTATTGGGTTGAT	20	1920	1939	50	186	100
ldlr_3Rv	TGAGTCGATTGGCACTGAAA	20	2105	2086	45		87
hmgcs1_1Fw	ACACACATCACTTAGCCAAC	20	1527	1546	45	82	100
hmgcs1_1Rv	TCCACTCTGACCAGATACCA	20	1608	1589	50		86
hmgcs1_2Fw	TCGGATGTTCTGAATGACT	20	1060	1079	45	91	100
hmgcs1_2Rv	TAATTTAACGTCCCAAAGGC	21	1150	1130	43		87
hmgcs1_3Fw	AAGAGGGTTGGAGTGTTC	20	1334	1353	50	100	92
hmgcs1_3Rv	TTTTATCAAGGGCAGATCCTGG	22	1433	1412	45		87
hmgcs1_4Fw	CTACCGCAAAAAGATCCGTG	20	937	956	50	141	91
hmgcs1_4Rv	TCATTCAGGAACATCCGAGC	20	1077	1058	50		100
hmgcs1_5Fw	AAAAGATCCGTGCCAGTG	19	945	963	53	134	91
hmgcs1_5Rv	GTCATTCAGGAACATCCGAGC	21	1078	1058	52		100

Rød: Designet, men ikke bestilt

Gul: Designet og bestilt, og testet, men ikke brukt i qPCR

Grønn: Designet, bestilt, testet og brukt i qPCR



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway