

# Afslutningsrapport

Gangliosider fra vallefedt - potentiale som  
sundhedsgavnlig komponent i modermælkserstatninger

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2004-58

Marts 2004



**mejeri**foreningen

danish dairy board

# **Afslutningsrapport**

## **Gangliosider fra vallefedt; potentiale som sundhedsgavnlig komponent i modermælkserstatninger.**

**Projektperiode: 1. august 2001 – 30. november 2003**

### **Projektdeltagere**

Lektor Lars Hellgren, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet  
Lektor Hanne Frøkiær, BioCentrum-DTU, Danmarks Tekniske Universitet  
Forskningsassistent Susanne Brix Pedersen, BioCentrum-DTU, Danmarks  
Tekniske Universitet

### **Finansieringskilder:**

FØTEK 3, Direktoratet for FødevareErhverv  
Mejeribrugets ForskningsFond, Mejeriforeningen

## Sammendrag

*Mål:* Projektets formål har været at vise, om vallefedt kan bruges som kilde til isolering af biologisk aktive gangliosider, samt om der er biologisk grundlag for at bruge disse gangliosider som anti-allergene og patogenbeskyttende tilskud til modernælkserstatninger.

*Resultat.* Der er blevet benyttet et vallefedtkoncentrat (WFC) produceret af Arla Foods som udgangspunkt i projektet. Gangliosidkoncentrationen i WFC varierer noget i løbet af året, med den højeste koncentration om vinteren (0,11% gangliosid) og den laveste om sommeren (omkring 0,08%). Endvidere har vi påvist en procesrelateret variation i gangliosidindholdet, hvor en længere dreven mikrofiltrering giver en signifikant højere koncentration af gangliosider i produktet (0,17 % vs. 0,11%). I vallefedt, ligesom i komælk, domineres gangliosidsammensætningen af gangliosid  $G_{D3}$ , som udgør 92% af gangliosiderne i WFC,  $G_{M3}$  udgør omkring 6 % og  $G_{T3}$  udgør omkring 1-2 %. Forholdet mellem  $G_{D3}$  og  $G_{M3}$  svarer til det, der findes i human colostrum (råmælk).

Vi har vist, at lave koncentrationer (1  $\mu\text{M}$ ) af  $G_{D3}$  fra komælk mindsker antigen-præsenterende cellers (dendritiske celler) kapacitet til at aktivere T-celler med omkring 30 % samt produktionen af fire cytokiner (IL-6, IL-10, IL-12 og TNF- $\alpha$ ). Gangliosid  $G_{M3}$  fra mælk påvirkede hverken cytokinproduktionen eller T-celleaktivering ved tilsvarende lave koncentrationer.

Fodring af nyfødte museunger med modernælkserstatning beriget med 33  $\mu\text{M}$  vallefedtgangliosider (svarende til 1,5 gange den naturlige koncentration i human colostrum) én gang per dag, fem dage om ugen i tre uger, forårsager en tendens til mindskning i  $\beta$ -lactoglobulin stimuleret proliferation af miltceller, sammenlignet med miltceller fra mus, som har fået ikke-beriget modernælkserstatning. Dette tyder på, at gangliosidberigelsen kan modvirke et immunrespons mod fødevarerproteiner.

Mælkegangliosiders kapacitet til at modvirke infektion af patogene bakterier er blevet undersøgt ved brug af et modelsystem, hvor adhæsion af *Escherichia coli* til humane tarmceller er blevet kvantificeret. Ved at sammenligne effekten af mælkegangliosider på adhæsionen af bakterier med et intakt mælkeglykolipidbindende protein (*S-fimbriae*) med en isogen stamme, som mangler en funktionel *S-fimbriae*, kan den specifikke gangliosideffekt bestemmes. Resultaterne viser, at mælkegangliosider forårsager en uspecifik inhibering af adhæsionen til tarmcellerne ved relativt høje koncentrationer (10  $\mu\text{M}$ ), men ikke nogen signifikant effekt ved lavere koncentrationer (1  $\mu\text{M}$ ).

*Konklusion:* Resultaterne viser, at det dominerende gangliosid i vallefedt,  $G_{D3}$ , inhiberer dendritiske cellers evne til at aktivere T-celler, og at der er en tendens til, at indtagelse af mælkegangliosid beriget modernælkserstatning én gang per dag, fem dage om ugen i tre uger, kan modvirke et immunrespons imod mælkeprotein  $\beta$ -lactoglobulin. Dette indikerer, at berigelse af modernælkserstatninger med vallefedtgangliosider kan beskytte nyfødte børn mod at udvikle allergier overfor mælkeproteiner. Der kræves dog mere dybdegående undersøgelser af mælkegangliosiders effekt på immunrespons hos nyfødte, før en endelig konklusion kan foretages.

Resultaterne fra projektet viser også, at mælkegangliosider i fysiologisk relevante koncentrationer ikke modvirker infektion af enteropatogene bakterier.

## English resumé

*Project aim:* The aim of this project have been to determine if whey fat is a suitable source for isolation of gangliosides and if these gangliosides can be used as anti-allergenic and/or anti-enteropathogenic supplementation to normal milk formula.

*Results:* A whey fat concentrate (WFC), produced by Arla Foods, has been used as a source for gangliosides. The ganglioside concentration in this product varied slightly during the year, with highest concentration in February and March (0.11% gangliosides) and the lowest in the summer (about 0.08% gangliosides). The WFC ganglioside concentration also varied due to alterations in the production process, i.e. alteration in the microfiltration step of the process altered the concentration from 0.17 % to 0.11%. Ganglioside  $G_{D3}$  was the dominating ganglioside in whey fat, constituting about 92% of the gangliosides,  $G_{M3}$  constituted about 6 % and  $G_{T3}$  1-2%. The distribution between ganglioside  $G_{D3}$  and  $G_{M3}$  in whey fat is similar to what is found in human colostrum.

The immunosuppressive effect of milk gangliosides has also been studied. We show that low concentrations (1  $\mu$ M) of  $G_{D3}$  from milk, inhibits the production of certain cytokines (IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) in antigen-presenting cells (dendritic cells), and that it also decreases their ability to activate T-cells with about 30%. The same concentration of  $G_{M3}$  from milk had no effect on either the cytokine production or the ability of the dendritic cells to activate T-cells. Furthermore, feeding newborn mice a formula supplemented with 33  $\mu$ M milk gangliosides (1.5 times the concentration in human colostrum) once daily for three weeks, resulted in a tendency toward decreased immune cell response against the milk protein  $\beta$ -lactoglobulin, compared to mice fed the non-supplemented formula.

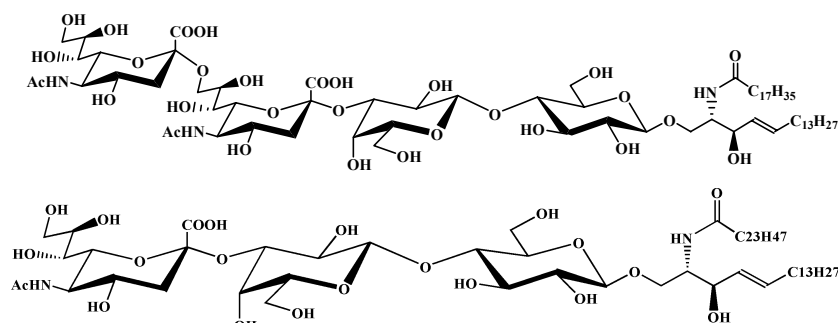
The ability of milk gangliosides to inhibit infection with enteropathogenic bacteria has been studied using a model system, in which the adhesion of *E. coli* to human intestinal cells is quantified. The specific effect of the gangliosides are determined by comparing the effect of milk gangliosides on adhesion of bacteria expressing a functional adhesion protein that bind to milk glycolipids (*S-fimbriae*), with the effect on isogenic bacteria expressing a non-functional *S-fimbria*. The results show that high concentrations (10  $\mu$ M) of gangliosides induce a non-specific inhibition of the adhesion, but at lower concentrations (1  $\mu$ M), ganglioside addition had no effects. Thus, physiological relevant concentrations of milk gangliosides do not protect against glycolipid-binding enteropathogens.

*Conclusions:* The dominating ganglioside in whey fat,  $G_{D3}$ , inhibits the capacity of dendritic cells to activate T-cells and intake of a whey fat ganglioside supplemented milk formulas, tends to decrease the immune response against  $\beta$ -lactoglobulin. This indicates that it might be possible to inhibit development of food-allergies in the newborns by supplementing formulas with milk gangliosides. However, further studies on the effect of milk gangliosides on the immune system in newborns are necessary before this can be finally established.

There was no effect of physiologically relevant concentrations of milk gangliosides on the adhesion of glycolipid binding bacteria to human intestinal cells.

## Projektets baggrund og mål

Gangliosider er en gruppe sialinsyre-holdige glykolipider, som findes i både bovin og human mælk. Koncentrationen i human mælk er dog betydeligt højere end i bovin, idet human colostrum (råmælk) indeholder omkring 22  $\mu\text{M}$  og bovin mælk omkring 2,6  $\mu\text{M}$ . Både hos køer og mennesker domineres gangliosidsammensætningen af disialylgangliosidet  $G_{D3}$  og monosialylgangliosidet  $G_{M3}$  (fig 1). Hos mennesker sker der en forandring i sammensætningen af gangliosider under ammeperioden, således at  $G_{D3}$  dominerer i den tidlige mælk (dag 0-5 fra fødslen), hvorefter andelen af  $G_{M3}$  stiger og bliver dominerende efter omkring dag 10 fra fødslen. Tilsvarende ændring sker ikke hos køer, hvor gangliosid  $G_{D3}$  altid er den dominerende og udgør omkring 80 % af den totale gangliosidmængde. Gangliosidsammensætningen i komælk svarer derfor ikke fuldstændigt til sammensætningen i den humane colostrum.



**Figur 1.** Strukturer for gangliosid  $G_{D3}$  (øverst) og  $G_{M3}$ .

Den højere koncentration af gangliosider i human mælk i forhold til bovin mælk kan være af stor betydning, da det er blevet vist, at gangliosider kan nedregulere immunresponsen ved blandt andet at modvirke T-celle-aktivering. Da det nyfødte barns tarmsystem ikke er fuldt udviklet, er der en forøget risiko for, at kostkomponenter uspecifikt transporteres over tarmepitelet. Derfor er risikoen for at udvikle et uønsket immunrespons størst i de første dage efter fødslen. Vores hypotese er derfor, at  $G_{D3}$  i mælk har en immunsuppressiv funktion, som  $G_{M3}$  mangler.

Det høje indhold af  $G_{D3}$  i den tidlige mælk vil herved beskytte det nyfødte barn mod at udvikle et immunrespons over for uspecifikt optagne antigener fra kosten. Forandringen fra en dominans af  $G_{D3}$  til  $G_{M3}$  i modermælken kan da forklares ved, at der ikke er brug for suppression af immunresponsen overfor kostkomponenter når barnets tarmsystem er så udviklet, at der ikke længere er risiko for, at potentielle antigener optages uspecifikt. Ifølge denne hypotese vil en berigelse af modermælkserstatninger rettet mod nyfødte, og ikke mindst for præmature børn, med en  $G_{D3}$ -rig fraktion baseret på f.eks. vallefedt, mindske risikoen for at barnet udvikler allergier overfor komponenter i den tidlige kost.

Et af formålene i projektet har derfor været at efterprøve hypoteserne om, at  $G_{D3}$  fra mælk har større immunsuppressiv aktivitet end  $G_{M3}$ , og at man ved at forøge koncentrationen af gangliosider i modermælkserstatninger til et niveau svarende til det, man finder i human colostrum, kan mindske risikoen for, at det nyfødte barn udvikler fødevarerallergier.

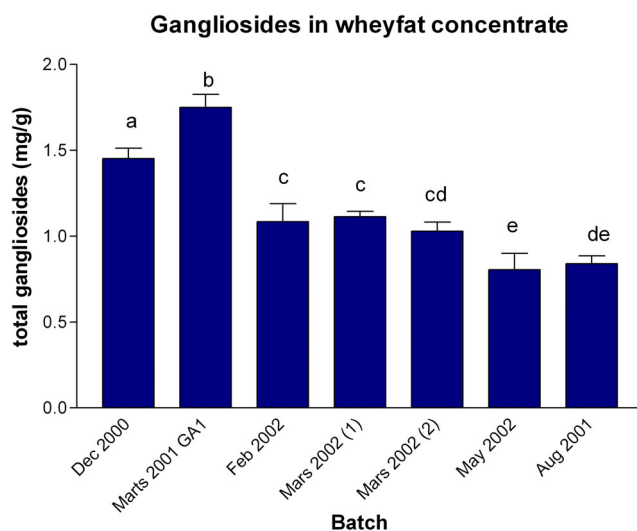
Det vides også, at mange patogene bakterier (blandt andet *E. coli*) inficerer tarmen ved at binde specifikt til gangliosider og andre glykolipider i tarmepitelet. Der er derfor blevet foreslået, at gangliosider i føden kan beskytte imod infektion med disse bakterier ved at binde til og blokere bindingssitet på bakterierne, så at disse ikke kan binde til tarmcellerne. Et af projektmålene har derfor været at undersøge, hvorvidt gangliosider fra mælk kan forhindre denne type af bakterier i at binde til humane tarmceller.

Da gangliosider findes i fedtkuglemembranen i mælk kan det formodes, at mælkefraktioner som er berigede på disse, vil være egnede som udgangspunkt til oprensning af gangliosidberigede fraktioner. Vallefedtkoncentrat udgør en sådan fraktion, og det tredje projektmål har været at bestemme indhold og sammensætning af gangliosider i vallefedtkoncentrat, samt dens årstidsbestemte variation.

## Resultater

### Gangliosidindhold og sammensætning i vallefedtkoncentrat

Vallefedtkoncentrat (WFC) er blevet produceret af Arla Foods. Analyser af gangliosidindholdet i WFC viser, at det er afhængigt af mikrofiltrerings-processen i produktionen. I batchene fra december 2000 og marts 2001 blev mikrofiltreringen kørt betydeligt længere end i de senere batcher. Den længerevarende filtrering giver en signifikant højere gangliosidkoncentration (omkring 1,7 mg/g i marts 2001) end den proces, som blev brugt i den senere produktion (1,1 mg/g i marts 2002) (fig 2).



**Figur 2.** Årstidsvariation af indhold af gangliosider i vallefedtkoncentrat (WFC).

Indholdet af gangliosider i WFC, som er produceret på forskellige tidspunkter af året, er også blevet analyseret. Resultaterne viser, at gangliosid-koncentrationen er højere om vinteren end i sommeren (omkring 1,1 g/kg i februar og marts og 0,8-0,9 g/kg i maj til august) (fig 2). Disse resultater er i overensstemmelse med et studium af årstidsvariation i gangliosidindhold i mælk fra spansk kvæg. Sammensætningen af vallefedt-gangliosider var ikke påvirket af forskellen i produktionsprocessen eller af årstidsvariationen. WFC indeholder omkring 92 %  $G_{D3}$ , omkring 6 %  $G_{M3}$  og 1-2 % trisialyl gangliosiden  $GT_3$ . Forholdet mellem  $G_{D3}$  og  $G_{M3}$  svarer til sammensætningen (forholdet) i den humane råmælk.

### Mælkegangliosiders effekt på immunfunktion.

De fleste tidligere studier af gangliosiders effekt på immunfunktion er blevet udført på T-celler eller B-celler. Vores undersøgelser har dog fokuseret på virkninger på dendritiske celler, som er de vigtigste antigen-præsenterende celler i immunsystemet. Årsagen til dette er, at gangliosider ikke absorberes intakte, og nyere forskning har vist, at hverken T- eller B-celler kommer i kontakt med indholdet i tarmlumen. Det er derfor meget usandsynligt, at gangliosider fra kosten vil kunne påvirke funktionen af disse celler direkte. Dendritiske celler kan derimod åbne 'tight junctions' mellem enterocytter i tarmepithelet, og derved nå ind til tarmlumen hvor de kan optage

kostkomponenter. Dendritiske cellers funktion er at optage antigener i væv, hvorefter det bearbejdes, og de dendritiske celler transporterer det til lymfevævet, hvor antigenet eksponeres på de dendritiske cellers overflade, samtidigt som de secernerer cytokiner som regulerer T-cellers udvikling. Herved aktiveres T-celler mod det specifikke antigen.

Vores hypotese har været, at det høje niveau af  $G_{D3}$  i den tidlige mælk kan beskytte imod udvikling af immunrespons over for kostkomponenter, ved at forårsage en nedregulering af de dendritiske cellers evne at aktive til et T-cellerespons imod antigen som optages fra tarmen. Dette har vi efterprøvet ved at undersøge effekten af gangliosid  $G_{D3}$  og  $G_{M3}$  fra mælk på cytokinproduktionen hos dendritiske celler, samt de dendritiske cellers evne til at aktivere T-celler *in vitro*. Endvidere har vi undersøgt, om det specifikke immunrespons nedreguleres hos mus, som er blevet fodret med en modernælkserstatning beriget med mælkegangliosider til et niveau der svarer til 1,5 gange koncentrationen i modernælk.

## Studier på dendritiske celler

### Cytokininproduktion

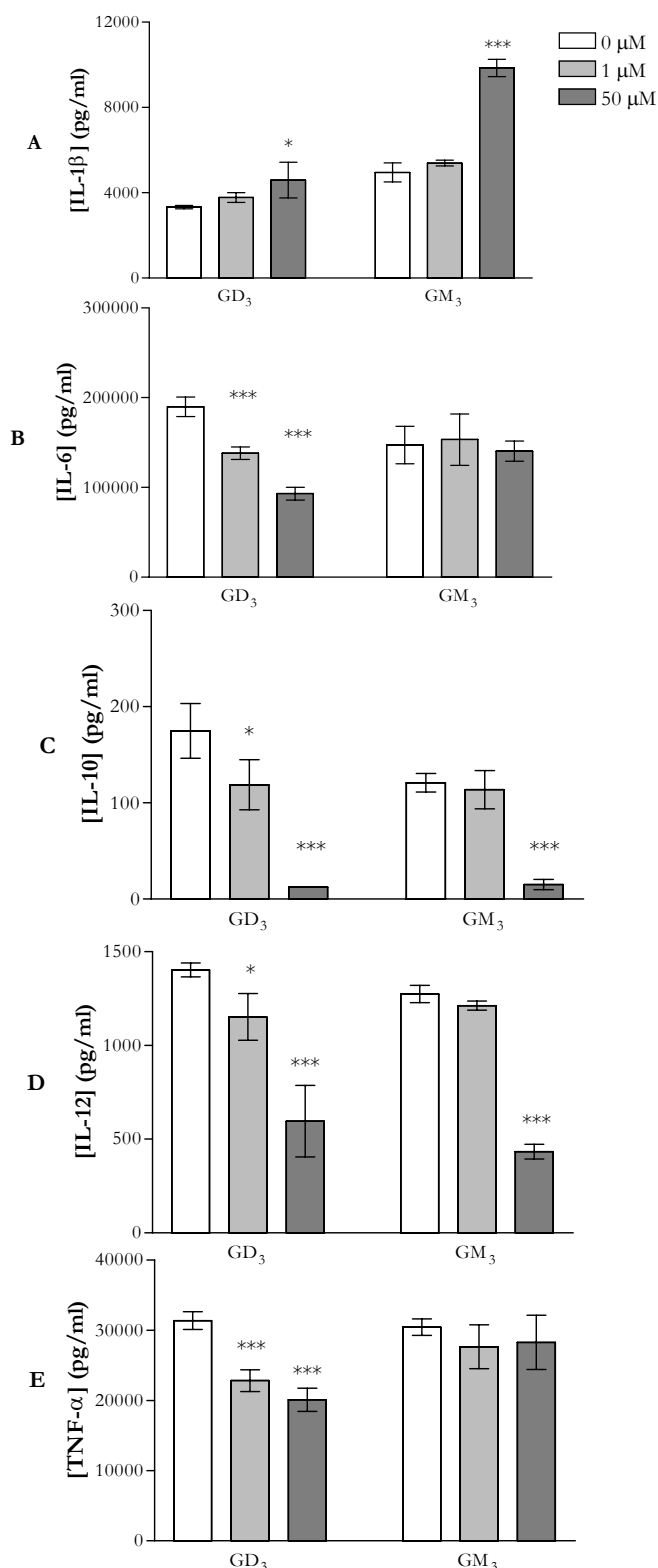
Figur 3 viser resultaterne fra studierne af cytokininproduktionen hos dendritiske celler, som er blevet eksponeret for 1 eller 50  $\mu\text{M}$  mælkegangliosid  $G_{D3}$  eller  $G_{M3}$ . Cellerne er blevet behandlet med gangliosider i tre timer, hvorefter lipopolysakkarid (LPS) tilsættes for at inducere modning. De inkuberes sammen med gangliosider og LPS i 20 timer, hvorefter mængden af secernerede cytokiner bestemmes.

Resultaterne viser, at 1  $\mu\text{M}$   $G_{D3}$  fra mælk nedregulerer produktionen af IL-6, IL-10, IL-12 og TNF- $\alpha$ , hvorimod produktionen af IL-1 $\beta$  er upåvirket af denne koncentration. Inhiberingen af cytokinproduktionen er tydeligt dosisafhængig.  $G_{M3}$  påvirker derimod ikke produktionen af nogen af de analyserede cytokiner ved behandling med 1  $\mu\text{M}$ , hvorimod 50  $\mu\text{M}$  inhiberer produktionen af IL-10 og IL-12.

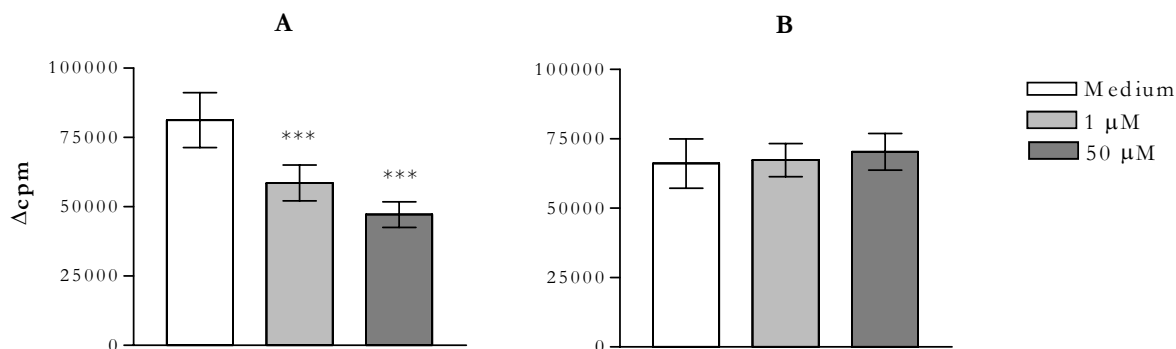
### Aktivering af T-celler

Dendritiske celler, som blev eksponeret for 1  $\mu\text{M}$   $G_{D3}$ , har også en markant mindsket kapacitet til at aktivere T-celler, sammenlignet med kontrolbehandling eller behandling med samme mængde  $G_{M3}$ .

**Figur 3.** Effekten af 1 og 50  $\mu\text{M}$  mælkegangliosiderne  $G_{D3}$  og  $G_{M3}$  på produktionen af forskellige cytokiner i dendritiske celler. IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-12 (D) and TNF- $\alpha$  (E). Effekten af gangliosidbehandlingen er testet imod respektive kontrol ved Dunnett's test. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ;  $n=4$ .



Figur 4 viser effekten af  $G_{D3}$  og  $G_{M3}$  i en såkaldt "mixed leukocyte reaction" (MLR). I dette forsøg er modne, gangliosidbehandlede, dendritiske celler blevet inkuberet sammen med  $CD4^+$  T-celler samt radioaktivt thymidin. De dendritiske celler stimulerer T-celle proliferationen, og størrelsen af denne proliferation er et mål på de dendritiske cellers effektorfunktion. Sammenlignet med kontrolbehandlingen, mindskes T-celle proliferationen med næsten 30%, når dendritiske celler er behandlet med  $1 \mu M G_{D3}$  ( $p < 0.001$ ) før assayet,  $G_{M3}$  påvirker derimod ikke proliferations-hastigheden.



**Figur 4.** Effekten af  $1$  og  $50 \mu M$  mælkegangliosid  $G_{D3}$  (A) samt  $G_{M3}$  (B) på dendritiske cellers kapacitet at aktivere  $CD4^+$  T-celler. Modne dendritiske celler, som eksponeres for gangliosider i 23 timer, er blevet inkuberet sammen med  $CD4^+$  T-celler og  $^3H$ -thymidin.  $\Delta cpm$  viser inkorporering af  $^3H$ -thymidin i T-cellerne. Figuren viser et repræsentativt forsøg som er gentaget tre gange. Gangliosideffekten er blevet testet imod mediumkontrollen ved hjælp af Dunnett's test. \*\*\*,  $p < 0.001$ ;  $n = 4$ .

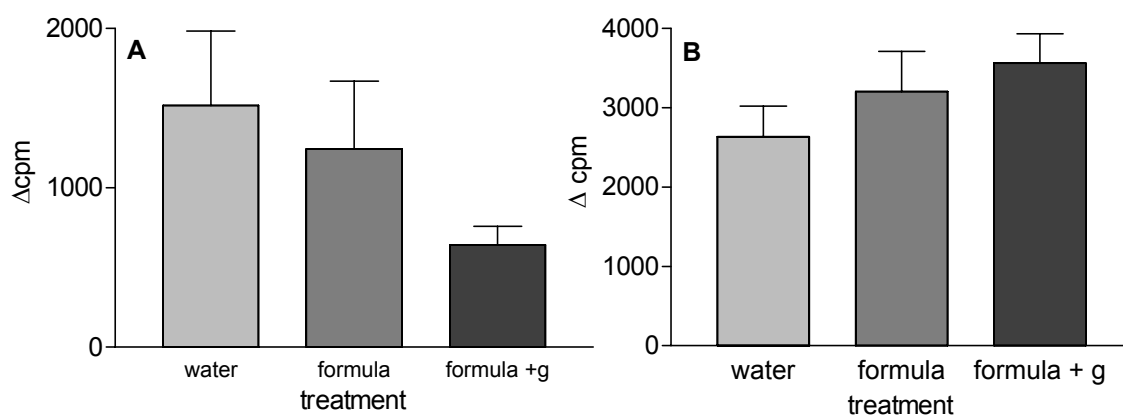
Disse resultater støtter hypotesen om, at den høje koncentration  $G_{D3}$  i human colostrum kan beskytte imod immunreaktioner rettet mod fødevarerkomponenter hos nyfødte børn. Indenfor dette projekts rammer, har det dog ikke været muligt at bestemme den laveste virksomme koncentration af  $G_{D3}$ , da dette kræver udvikling af et assay med lavere indhold af føtal kalveserum end det nuværende.

### Studier på nyfødte mus

Effekten af gangliosidberigelse af modernælkserstatninger er blevet undersøgt *in vivo* ved, at nyfødte BALB/c mus i tre uger er blevet fodret én gang per dag, fem dage om ugen, med vand, modernælkserstatning eller modernælkserstatning tilsat mælkegangliosider. Den totale gangliosidkoncentration i den gangliosidberigede modernælkserstatning var  $33 \mu M$ , og i den ikke-berigede omkring  $2 \mu M$ . Indholdet af  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) i den indgivne mængde modernælkserstatning (omkring  $300 \mu g$ ) vil inducere oral tolerance mod  $\beta$ -lg. Efter endt fodring immuniseres musene to gange med  $\beta$ -lg samt æggeprotein ovalbumin med fjorten dages mellemrum. Tre uger efter første immunisering aflives dyrene og milten udtages.



Det specifikke respons mod  $\beta$ -lactoglobulin, respektive ovalbumin, blev målt ved at bestemme proliferationshastigheden i miltceller, som er blevet stimuleret med de to antigener *in vitro*. Figur 5 viser inkorporering af  $^3\text{H}$ -thymidin i miltceller, som er blevet stimuleret med 200  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -lg eller 100  $\mu\text{g/ml}$  ovalbumin. Miltceller fra mus, som har fået den gangliosidberigede modernælkserstatning har et statistisk ikke-signifikant ( $p=0.09$ ) lavere respons på stimulering med  $\beta$ -lg, end miltceller fra dyrene, som enten har fået ikke-beriget modernælkserstatning eller vand. Tendensen til forskel i immunrespons mellem mus, som har fået den gangliosidberigede modernælkserstatning og de, som har fået den ikke-berigede, er specifik for mælkeproteinet, da der ikke er nogen forskel mellem disse gruppers respons imod ovalbumin. Der er derimod en tendens til at begge grupper som har fået modernælkserstatning, responderer kraftigere imod ovalbumin (fig 4 B). Da museungerne kun har fået modernælkserstatning én gang dagligt, fem dage om ugen, kan det formodes, at effekten af gangliosidberigelsen vil være større, hvis de kun var blevet opfodret på den gangliosidberigede modernælkserstatning.



**Figur 5.** Effekten af fodring af nyfødte mus med mælkegangliosidberiget modernælkserstatning på den specifikke miltcelle proliferation efter stimulering med  $\beta$ -lg (A) samt ovalbumin (B). Nyfødte museunger er blevet fodret med vand, modernælkserstatning eller mælkegangliosidberiget modernælkserstatning (gangliosidkoncentration 33  $\mu\text{M}$ ) i tre uger, hvorefter de blev immuniseret med  $\beta$ -lg samt ovalbumin. Miltceller fra dyrene er blevet stimuleret med 200  $\mu\text{g/ml}$   $\beta$ -lg eller 100  $\mu\text{g/ml}$  ovalbumin.  $\Delta\text{cpm}$  = antigen stimuleret thymidin indkorporering. Water = museunger fodret med vand. Formula = museunger fodret med modernælkserstatning. Formula+g = museunger fodret med gangliosidberiget modernælkserstatning.  $n=8$ .

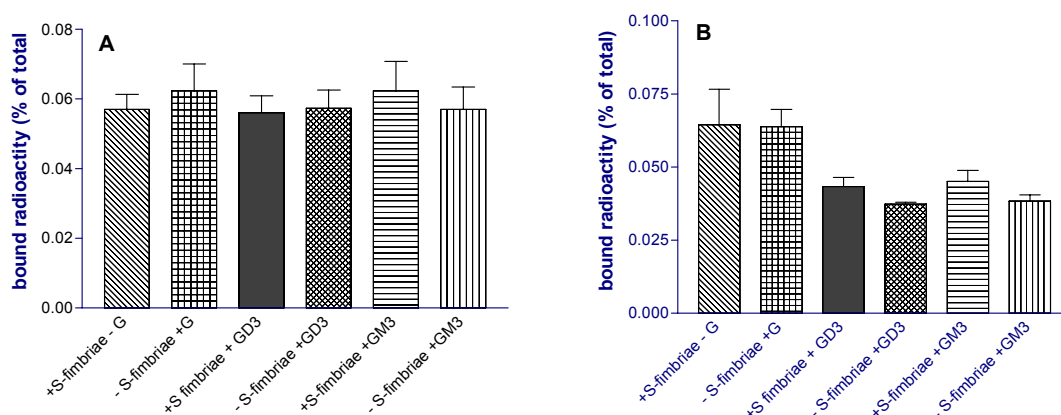
### Mælkegangliosiders effekt på bakterieadhæsion til humane tarmceller

Vallefedtgangliosiders evne at modvirke infektion med enteropatogene bakterier er blevet undersøgt ved at bestemme deres evne at modvirke adhæsionen af en *E. coli*-stamme, der udtrykker et adhæsionsprotein, som binder til mælkegangliosider til dyrkede humantarmceller.

Et isogent par af *E. coli*-stammer (PAZZ 50 LE 392 samt PAZZ 50-67 Le392), som kun adskiller sig ved at PAZZ 50-67 Le392 mangler et funktionelt adhæsionsprotein (S-fimbriae) som binder til mælkegangliosider, er blevet radioaktivt mærkede ved at dyrke dem i  $^3\text{H}$ -thymidin-beriget medium. Den humane tarmcellelinie CaCo-2 er blevet dyrket til et monolag, hvorefter de radioaktive bakterier sammen med 1 eller 10  $\mu\text{M}$  mælkegangliosider er blevet tilsat. Tarmceller og bakterier blev inkuberet sammen ved 37°C i en time, hvorefter bakterieopløsningen blev fjernet og tarmcellerne vaskedes omhyggeligt. Efter solubilisering af CaCo-2 cellerne, blev mængden af adhærerende bakterier bestemt som radioaktivitet i den solubilerede prøve.

Resultaterne viser, at 1  $\mu\text{M}$  gangliosider ikke påvirker adhæsionen af *E. coli* til tarmcellerne, 10  $\mu\text{M}$  gangliosider mindsker derimod adhæsionen af både de bakterier, som har et funktionelt gangliosidbindende adhæsionsprotein og de, som mangler dette protein. Dette formodes derfor at være en uspecifik effekt, eventuelt forårsaget af, at den høje gangliosidkoncentration er toksisk for bakterierne.

Disse resultater viser, at fysiologisk relevante koncentrationer af mælkegangliosider ikke påvirker adhæsionen af glycolipidbindende bakterier til tarmceller, og det kan derfor ikke forventes, at de kan modvirke infektion af denne type af bakterier *in vivo*.



**Figur 6.** Mælkegangliosiders effekt på adhæsion af glycolipidbindende *E. coli* til humane tarmceller. + *S-fimbriae* = bakterie med funktionelt *S-fimbriae*; - *S-fimbriae* = bakterie der mangler funktionelt *S-fimbriae*; +  $G_{D3}$  ( $G_{M3}$ ) = tilsat  $G_{D3}$  ( $G_{M3}$ ); - *G* = kontrolbehandling uden gangliosider. Gennemsnit  $\pm$  s.e.m ( $n=4$ ).

## Konklusion

### *Gangliosidindhold i vallefedtkoncentrat*

Afhængigt af mikrofiltreringsprocessen i produktionen samt årstiden, varierer indholdet i vallefedtskoncentrat mellem 0,8 og 1,7 g/kg.

### *Mælkegangliosiders immunmodulerende egenskaber*

Det dominerende gangliosid i vallefedt,  $G_{D3}$ , inhiberer produktionen af cytokinerne IL-6, IL-10, IL-12 og TNF- $\alpha$  i antigen-præsenterende celler (dendritiske celler), hvorimod gangliosid  $G_{M3}$ , ikke har denne effekt ved lave koncentrationer. I nyfødte museunger, som fodres med en gangliosidberiget modernælkserstatning én gang dagligt, er der en tendens til, at det specifikke immunrespons imod mælkeprotein  $\beta$ -lactoglobulin mindskes, sammenlignet med museunger som fodres med en ikke-beriget modernælkserstatning. Disse resultater tyder på, at man kan opnå en mindsket risiko for immunrespons overfor kostfaktorer hos nyfødte, ved at berige modernælkserstatninger med mælkegangliosider, f. eks fra vallefedt.

### *Mælkegangliosiders effekt på bakterieadhæsion til humane tarmceller*

Mælkegangliosider kan, i fysiologisk relevante koncentrationer, ikke beskytte imod enteropatogene infektioner ved at inhibere adhæsion af glycolipidbindende bakterier til humane tarmceller.

## Publikationer

### *Manuskripter*

Torben S. Johansen, Hasse B. Jensen, Susanne Brix Pedersen, Lars I. Hellgren & Hanne Frøkiær: Dairy Di- and Monosialoganglioside Differently Impair Dendritic Cell cytokine production and proliferation of CD4<sup>+</sup> cells (Indsendes til Journal of Immunological Methods august 2004)

Hasse B. Jensen, Torben S. Johansen, Hanne R. Christensen, Lars I. Hellgren & Hanne Frøkiær: Presence of fetal bovine serum during cultivation of murine dendritic cells affects cytokine production and subsequent detection (Indsendes til Journal of Immunology, september 2004)

Gangliosider fra vallefedt: potentiale som sundhedsgavnlig komponent i modernælkserstatninger. Artikel i Mælkeritidende 12/2002.

### *Specialerapport*

Hasse Brønnum Jensen & Torben Seestedt Johansen: Susceptibility of murine dendritic cells to dairy mono- and disialogangliosides.

## **Samarbejdsrelationer**

I forbindelse med produktion af vallefedtskoncentrat er der blevet etableret samarbejde med Hans Burling, Arla Foods Innovation, Lund. *E. coli*-stammerne, som er blevet brugt i adhæsionsforsøgene, er doneret som led i et samarbejde med prof. Timo Korhonen, Dept. of Biosciences, Helsinki Universitet.

## **Videnskabelig betydning af projektet**

I projektet er det for første gang vist at  $G_{D3}$ , men ikke  $G_{M3}$ , fra mælk inhiberer antigen-præsenterende cellers cytokinproduktion samt deres evne til at aktivere T-celler. Dette er en betydningsfuld viden, da den kan forklare den tidligere uforklarlige ændring, som sker i gangliosidsammensætningen i human modermælk mellem 5 – 10 dage efter fødslen. Vores resultat viser, at gangliosidsammensætningen går fra at være immunsupprimerende til ikke at påvirke immunresponset overfor kostkomponenter. Sammen med resultaterne fra undersøgelserne med gangliosidberiget modermælksstatning peger det på, at der kan være grundlag for at berige modermælksstatninger til nyfødte, ikke mindst til for tidligt fødte (præmature) børn, med mælkegangliosider. Det er dog behov for mere dybdegående studier før dette endelig kan fastlægges.

