

Kaffe og hjerte-karsykdom:

Fra epidemiologisk til etiologisk perspektiv:

**De underliggende mekanismer for
kaffediterpenenes effekt på serum LDL-kolesterol.**



Hilde Ulsaker

Det medisinske fakultet – Universitetet i Oslo

**Kaffe og hjerte-karsykdom: Fra epidemiologisk til etiologisk perspektiv:
De underliggende mekanismer for kaffediterpenenes effekt på serum LDL-
kolesterol.**

Hilde Ulsaker
Profesjonsstudiet i medisin
Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo

Veiledere:
Kerstin U. Trygg, Avdeling for ernæringsvitenskap, Institutt for medisinske basalfag
Dag S. Thelle, Avdeling for biostatistikk, Institutt for medisinske basalfag

Høsten 2008

English abstract

Title: *Coffee and cardiovascular disease: From epidemiological to aethiological perspective: The underlying mechanisms behind the coffee diterpenes effect on LDL-cholesterol.*

Author: *Hilde Ulsaker, University of Oslo, Norway*

Supervisors: *Kerstin Ulla Trygg and Dag Steinar Thelle*

This paper summarizes current knowledge on possible mechanisms behind the LDL-cholesterol increasing effect of the coffee diterpenes cafestol and kahweol. While epidemiological studies clearly have established the relationship between intake of boiled coffee and increase in LDL-cholesterol, the underlying mechanisms are not yet fully understood. Important hypotheses include effects on intracellular cholesterol metabolism, with down regulation of LDL-receptor activity or lowered bile acid synthesis in the liver. In the blood, the enzyme cholesteryl ester transfer protein (CETP) has been the most targeted study item. This paper mainly focuses on in vitro studies of cell cultures, both human and animal of origin. Possible effects of diterpenes on bile acid production, enzyme activities of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG CoA reductase), LDL-receptor activity or synthesis and the blood enzyme CETP are discussed. This paper proposes the following further studies in this field: A study on human hepatocytes measuring cholesterol-7 α -hydroxylase enzyme activity and mRNA after incubation with cafestol. In vivo measurements of bile acid synthesis in humans – on volunteer ileostomy patients given diterpenes. Quantification of the number of LDL-particles before and after cafestol exposure. Discrepancies between human and animal research models has been a great mystery in this research field. Possible explanations include different mechanisms of action in human and animal cells – or that cafestol acts on a common denominator (such as the intracellular concentration of cholesterol) that induces changes in the other, measured parameters, and that these parameters differ in humans and animals. In the first case, this paper holds CETP affection as the strongest candidate in humans, in the latter – intracellular cholesterol concentration in general, or bile acid synthesis in the liver.

Innhold

Anvendte forkortelser	s6
1 Introduksjon	s7
2 Metode	s9
3 Resultater	s10
3.1 Diterpenenes kjemi.....	s10
3.2 Effekten av cafestol og kahweol på blodlipidene.....	s10
3.3 Generelle mekanismer for kolesteroløkning.....	s11
3.4 Intracellulær kolesterolmetabolisme og dennes regulering.....	s12
3.5 Lipoproteinmetabolismen.....	s13
3.6 Diterpenenes affeksjon av intracellulær kolesterolmetabolisme.....	s14
3.6.1 Effekter på gallesyresyntese	s14
3.6.2 HMG CoA reduktase.....	s17
3.6.3 ACAT	s18
3.6.4 LDL-opptak, LDL-reseptoraktivitet og LDL-reseptorsyntese	s19
3.7 Kolesteryl ester transfer protein	s21
4 Diskusjon	s22
4.1 Intracellulær kolesterolmetabolisme.....	s22
4.1.1 Gallesyresyntese.....	s22
4.1.2 HMG CoA reduktase.....	s23
4.1.3 ACAT	s24
4.1.4 LDL-opptak, LDL-reseptoraktivitet og LDL-reseptorsyntese.....	s24
4.2 Kolesteryl ester transfer protein.....	s25
4.3 Generell diskusjon.....	s25
4.4 Noen forslag til ytterligere studier.....	s27
4.5 Konklusjon.....	s28
5 Tabeller og figurer	s29
6 Referanser	s36

Anvendte forkortelser

ACAT	acyl-coenzym A:kolesterol acyltransferase
Apo B	apolipoprotein B
CETP	kolesteryl ester transfer protein
FXR	farnesoid X reseptor
FGF15	fibroblast vekstfaktor 15
HDL	high density lipoprotein
HMG CoA	hydroksy-3-metylglutaryl coenzym A
IBABP	intestinalt gallesyrebindende protein
IDL	intermediate density lipoprotein
LCAT	lechitin:kolesterol acyl transferase
LDL	low density lipoprotein
PLTP	fosfolipid transfer protein
PXR	pregnan X reseptor
SRE-1	sterol regulatory element 1
SREBP	sterol regulatory element binding proteins
VLDL	vey low density lipoprotein

1 Introduksjon

Kaffe drikkes av omlag 1/3 av verdens befolkning (1) og er således en av verdens mest populære drikker. Dens popularitet tilskrives i hovedsak dens innhold av koffein. Koffein stimulerer bl.a. basalstoffskiftet, adrenalinfrigjøring (med tilhørende kardiovaskulære effekter) og sentralnervesystemet og gir våkenhet, godt humør og energi (2). Kaffen ble oppdaget ved at ville kaffeplanter fra Kefa i Etiopia, ble importert til Sør-Arabia på 1400-tallet – hvor den raskt ble populær (1). På 15- og 1600-tallet spredte kaffen seg gradvis til Europa, hvor den i dag er i utstrakt bruk spesielt i Nederland og i de skandinaviske landene (3) – Figur 1.

Fordi den inntas i så store mengder verden over, er kaffe en viktig drikk i et ernærings- og helsemessig perspektiv. Dette gjenspeiles i at kaffen og dens virkestoffer har vært gjenstand for utallige studier av dens effekter på ulike helseaspekter. Innvirkning på store sykdomsgrupper som kardiovaskulær sykdom, diabetes mellitus og kreft har i så måte vært sentrale. Kardiovaskulær sykdom – som en av vårt velferdssamfunns viktigste årsaker til morbiditet og mortalitet – har en lang rekke velkjente risikofaktorer. Deriblant hypertensjon, høyt LDL-kolesterol, lavt HDL-kolesterol og forøkede triglyseridverdier i serum, overvekt (spesielt sentral fedme), forøket fastebloksukker og forhøyet homocysteinnivå i serum. Noen av disse variable har tilleggfunksjon som sykdomstegn. I tillegg kommer eksponeringsvariable som sedentær livsstil, røking og et stort inntak av mettet fett og transfett.

Tallrike epidemiologiske studier omkring kaffekonsum og forekomst av hjerte-karsykdom har konkludert i alle retninger og vært spesielt preget av vansker med å standardisere betingelsene – blant annet fordi kaffen er en svært uensartet drikk. Dette både med tanke på type, tilberedningsmetode, innholdsstoffer og deres mengdeforhold, og å problemer med å justere for mulige konfunderende variable. Pasientkontrollstudier har i hovedsak konkludert med øket risiko for hjerte-karsykdom ved stort kaffeinntak, mens kohortstudiene viser ingen sammenheng (4). Dette kommer blant annet fram i en stor metaanalyse av sammenheng mellom kaffe og koronar hjertesykdom (5). Analysen tar for seg 13 pasientkontrollstudier bestående av tilsammen 9487 tilfeller med koronar hjertesykdom og 27 747 kontroller, samt 10 kohorter med til sammen 403 631 mennesker fulgt over 3-44 år. Analyse av pasientkontrollstudiene konkluderer med en statistisk signifikant sammenheng mellom kaffe og koronar hjertesykdom ved kaffeinntak på 3 kopper kaffe eller mer per dag. En stor norsk kohortstudie som ble publisert i 1990 viste likevel en sammenheng mellom kaffeinntak og dødelighet av koronar hjertesykdom, også når man hadde korrigert for

røyking og kolesterol (6).

Tatt i betraktning de usikre og varierende resultatene ved epidemiologiske studier, vil det være nyttig å se på kaffens innholdsstoffer, deres virkningsmekanismer og hvordan disse kan tenkes å påvirke utvikling av kardiovaskulær sykdom. Veletablerte og foreslåtte sammenhenger mellom virkestoffer i kaffen og ulike helseaspekter er summert i tabell 1 (basert på 2, 3, 4, 7, 8).

Blant annet er koffein kjent for sine mange effekter på det kardiovaskulære systemet. Koffein er en kompetitiv antagonist av adenosinreseptorene A1 og A2A (2), og kan affisere alle vev med adenosinreseptorer. Effekter inkluderer diurese, stimulans av sentralnervesystemet, dilatasjon av koronarkarene, fettsyreoksidasjon i muskel, økt basalmetabolisme m.m.(2) Koffeinet stimulerer sekresjon av adrenalin, som hemmer insulinsensitiviteten i muskel (9). Høy blodglukose er en av risikofaktorene for kardiovaskulær sykdom. Det er også publisert studier som indikerer at koffein øker blodtrykket og senker hjerterefrekvensen noe (7).

Kaffe har også et høyt innhold av polyfenoler – hvorav klorogensyre og en ester av koffeinsyre og quininsyre er de viktigste (8). Disse er vist å ha antioksidantegenskaper in vitro (4), og er den viktigste enkeltkilde til antioksidanter i vårt kosthold (10). Dog metaboliseres de i kroppen i stor grad (4) – betydningen in vivo er derfor usikker. En italiensk forskergruppe fant imidlertid at plasma antioksidantkapasiteten økte med opptil 7% etter inntak av 200 mL kaffe (11). Kaffekonsum har også vært assosiert med økt plasma homocysteinnivå – noe som er en av risikofaktorene for kardiovaskulær sykdom. Den sterkeste årsakskandidat til homocysteinøkningen er koffein (12). Kaffens potensielle pro- eller antiinflammatoriske egenskaper har også vært studert. ATTICA-studien (13) fant et lineært dose-responsforhold mellom kaffekonsum og flere inflammasjonsmarkører, deriblant CRP. Andre fremhever antioksidantenes potensielt antiinflammatoriske effekter (10).

Kaffe inneholder også diterpener – i hovedsak cafestol og kahweol. At det var en sammenheng mellom kaffe og kolesterolnivå er først beskrevet for 25 år tilbake av Thelle og medarbeidere i "The Tromsø Heart study" (14). 4 år senere fant en finsk forskergruppe ved Aro og medarbeidere en assosiasjon med kaffens tilberedningsmetode – nærmere bestemt en kolesteroløkende effekt av kokekaffe (15). Disse resultatene ble bekreftet i senere studier. Forskjellen mellom ulike tilberedningsmetoder ble sammenfattet i en metaanalyse av 21 i studier i en avhandling av Bak (16). Denne metaanalysen viser at kokekaffe, espresso og tyrkisk kaffe (i stigende rekkefølge) øker serum totalkolesterol, mens filter-, perkolator- og pulverkaffe i liten eller ingen grad påvirker

totalkolesterolnivå. Tendensen var mindre uttalt hos kvinner – men i alle fall for kokekaffens vedkommende fremdeles signifikant.

Hva som forårsaket denne kolesteroløkende effekten var på dette tidspunktet ukjent. Noe senere oppdaget nederlandske forskere at kokekaffe var dekket av en lipidoverflate. De konsentrerte denne lipidfraksjonen 10 ganger. Den oppkonsentrerte kaffen ga de deretter til 5 kvinner og 5 menn i 6 uker. Mengdene tilsvarte omlag 1 liter (8 kopper) kokekaffe daglig. Samtidig overvåket de blodlipidverdiene. I 1990 publiserte de resultatene (17) – som viste en overbevisende, kraftig økning i triglyseridnivå, total- og LDL-kolesterol, men ingen endring i HDL-kolesterol – Figur 2. Økningen i LDL-kolesterol var på slående 29.1%. Heckers og medarbeidere viste senere at inntak av 148 mg diterpenalkoholer daglig ga en kolesteroløkning på 32% (18) - og de kolesteroløkende substansene var identifisert som de to kaffespesifikke diterpenene cafestol og kahweol.

I etterkant av disse oppdagelsene har man søkt flere mulige bakenforliggende mekanismer som forklaring på den kolesteroløkende effekten av diterpenene, med hovedvekt på cafestol. Cafestol er samtidig et nyttig utgangspunkt for å tilegne seg generell kunnskap om hvordan kostholds faktorer kan virke inn på blodlipidnivå. I denne oppgaven vil jeg ta for meg eksisterende kunnskap om de bakenforliggende mekanismer for diterpenenes effekt på LDL-kolesterol.

2 Metode

Litteraturen er i hovedsak innhentet gjennom søk i tidskriftdatabaser. I tillegg er det slått opp i leksikon (1, 19), og en doktorgradsavhandling(16) er lånt etter råd fra veileder.

Søk i PubMed på “coffee AND cardiovascular disease”, januar 2008, ga 699 treff. For å finne en relevant problemstilling innunder temaet, ble oversiktsartiklene lest. De med titler og sammendrag relevante for aktuelle problemstilling, ble utvalgt. Søk på “coffee AND CHD”, PubMed januar 2007, ga 35 treff. Noen oversiktsartikler er også hentet herfra (2). Her er bakgrunnsinformasjon innhentet, og mekanismen bak diterpenenes innvirkning på blodlipidene ble valgt ut som tema – spesielt LDL-kolesterol.

Ved søk i PubMed med søkeordene “cafestol AND cholesterol”, fantes 43 treff. De artiklene

relevante for aktuelle problemstilling ble valgt ut gjennom studium av tittel og sammendrag. Artikler som omhandler cafestol/kahweol og cancer er utelukket, likeledes epidemiologiske studier som ikke belyser bakenforliggende mekanismer. Endel artikler dreide seg også om økning i levertransaminaser, disse er heller ikke inkludert. Søk på “kahweol AND kolesterol” ga 33 treff, men ingen aktuelle artikler som ikke var dekket av første søkestreng.

Videre ble det søkt med samme søkeord i tidskriftdatabasen Biosis, noe som heller ikke ga noen tilleggsartikler til utgangsmaterialet for studiet. De oppdrevne artiklene ble så vurdert utfra alder, størrelse og relevans for problemstillingen. Bakgrunnsstoff om kolesterolregulering er hentet fra lærebok i biokjemi (20) og ved søk på “LDL-kolesterol AND metabolism AND regulation” i PubMed. I tillegg er referanser fra overnevnte artikler brukt, der dette har blitt funnet hensiktsmessig.

3 Resultater

3.1 Diterpenenes kjemi

Kaffeoljen som ekstraheres fra kaffebønner består i hovedsak av triglyserider. Omlag 15% av oljen består i diterpenester (21). I kaffebønnene finnes diterpenene som frie alkoholer, eller esterifisert til fettsyrer i C17-posisjon (22). Cafestol og kahweols kjemiske struktur kan ses i figur 3. Utfra figuren er det tydelig at diterpenenes kjemiske struktur likner sterolers. Kahweol skiller seg fra cafestol ved en ekstra dobbeltbinding mellom karbonatom 1 og 2.

3.2 Effekten av cafestol og kahweol på blodlipidene

Diterpeninnholdet i kaffe tilberedt ved ulike metoder er altså bestemmende for innvirkning på kolesterolet. To viktige analyser av dette forholdet ble publisert på midten av 1990-tallet (23, 24). Hovedkonklusjonene fra studien ved Urgert og medarbeidere (23) er at tyrkisk kaffe har høyest cafestolinnhold med 3.9 mg per kopp, presskannekaffe 3.5 mg per kopp og kokekaffe 3.0 mg per kopp. Espresso ble målt til 1.5 mg cafestol per kopp – relativt lite på grunn det lille volumet per kopp (25 mL). Trekketid hadde liten effekt på innholdet av diterpener, heller ei hvor lenge kaffebønnene ble brent/ristet. Sterkere kaffe (i mengde kaffe/L vann) økte diterpeninnholdet i koke-

og presskannekaffe og espresso. Dette indikerer en dose-responseeffekt. Diterpeninnholdet i pulverkaffe og filterkaffe var neglisjerbare. Koffeinfri kaffe tilsvarte koffeinholdig kaffe i diterpeninnhold. Gross og medarbeidere (24) konkluderte med noe høyere nivåer av både cafestol og kahweol i tyrkisk og kokekaffe, og lavere verdier for espresso. Funnene stemmer godt overens med Baks metaanalyse av sammenheng mellom kaffens tilberedningsmetode og kolesterolnivå (16), som er referert ovenfor.

Urgert og medarbeidere publiserte samtidig en metaanalyse av 11 eksperimentelle studier hvor mennesker var gitt diterpener over 4 uker (25). Det samlede materialet omfatter 262 forsøkspersoner. Kombinert økte serum totalkolesterol med 0.13 mmol/L (5.0 mg/dL) for hver 10 mg cafestol, og med 0.02 mmol/L (0.9 mg/dL) for hver 10 mg kahweol per dag. Forfatterne konkluderer med at cafestol er mer potent kolesteroløkende enn kahweol. Mange påfølgende studier konsentrerer seg derfor om cafestol. Forfatterne angir videre at 80% av økningen i totalkolesterol skyldtes LDL-kolesterol, og resten skyldtes VLDL lipoproteiner. Samtidig fant forfatterne at cafestol også var den sterkeste triglyseridøkende av de to diterpenene. Tabell 3 viser kolesterol- og triglyseridnivå sammenholdt med cafestolinntak i mg/dag. Grafen viser en tilnærmet lineær sammenheng mellom kolesterol-/triglyseridnivå og cafestolinntak. Cafestol er med dette den mest potente kolesteroløkende substans man kjenner til (22).

3.3 Generelle mekanismer for kolesteroløkning

Kolesterolhomeostasen er en fin balanse mellom absorpsjon fra kosten, endogen syntese og utskillelse i gallen. En omfattende oversiktsartikkel ved Grundy et al (27) tar for seg de generelle årsaker til høyt kolesterol i blod. Hovedpoengene fra artikkelen er sammenfattet i det følgende. Det er 3 kjente hovedmekanismer for økning i LDL-kolesterol: Redusert fjerning av LDL fra blodbanen, øket produksjon av LDL, og økt beriking av LDL med kolesterolrestere – sistnevnte gir få, meget kolesterolholdige LDL-partikler. Redusert fjerning av LDL fra blodbanen forekommer ved genetiske defekter i LDL-reseptor (som ved familiær hyperkolesterolemi), nedsatt LDL-reseptoraktivitet – herunder nedsatt LDL-reseptorsyntese, og ved nedsatt affinitet til LDL-reseptor. Overproduksjon av LDL kan forekomme i samband med forøket VLDL-nivå, da VLDL er en forgjenger for LDL. Opphopning av VLDL vil medføre en øket konversjon til LDL, som derved stiger. Forøket VLDL ses ved øket produksjon av VLDL fra lever, nedsatt LDL-reseptoraktivitet – og derved nedsatt fjerning av VLDL fra blod, og eventuelt ved andre mekanismer som hemmer fjerning av VLDL fra blodbanen. Forøket beriking av LDL med kolesterolrestere skjer ved

overførsel fra HDL (ved CETP), fra IDL og ved enzymet LCAT (lecitin:cholesterol acyl transferase), som esterifiserer uesterifisert kolesterol på overflaten av LDL-partikkelen. Alle 3 hovedmekanismer er hypotetiske virkningssteder for kaffediterpenene.

3.4 Intracellulær kolesterolmetabolisme og dennes regulering

Det henvises til figur 4. Kroppens kolesterol stammer delvis fra tarmen, delvis fra de novo syntese i kroppen. Noe befinner seg ekstracellulært – hovedsaklig i blodbanen, bundet i lipoproteiner. Det resterende befinner seg intracellulært i alle kroppens celler. Den intracellulære kolesterolbeholdningen er nøye regulert. På alle nivåer er ulike enzymer, med sine respektive gener, involvert i reguleringen. Det er sammensatte og kompliserte mekanismer til grunn for reguleringen - og i det følgende vil det kun gis et kort sammendrag av de viktigste faktorer i kaffediterpensammenheng. En økning av intracellulær kolesterolkonsentrasjon kan blant annet oppnås ved å:

- hemme gallesyresyntesen i hepatocytter, nøkkelenzymer i reguleringen er kolesterol-7 α -hydroksylase og sterol-27-hydroksylase
- hemme esterifisering av kolesterol (lagring som kolesterol ester - medieres av enzymet ACAT)
- øke de novo kolesterolsyntese (ved enzymet HMG CoA reduktase)
- hemme produksjon av steroidhormoner i organer som produserer disse
- øke opptaket av LDL (dette sistnevnte stemmer dårlig overens med funn i senere refererte studier, samt det faktum at serum LDL øker)

Tilsvarende kan kolesterolkonsentrasjonen senkes ved å påvirke de nevnte faktorer i motsatt retning.

Enzymenes aktivitet og transkripsjon av deres respektive gener hovedsaklig regulert ved negativ tilbakekobling basert på intracellulær kolesterolkonsentrasjon. Som eksempel er SREBP nevnt. SREBP er membranbundne transkripsjonsfaktorer, og modulerer transkripsjon av viktige gener involvert i kolesterolmetabolismen. Dette gjør de ved å binde SRE (sterolregulatorisk element) i promotorregionen av genene, og derved øke deres transkripsjon. Eksempler inkluderer bl.a. gener for overnevnte HMG CoA reduktase, lipoprotein lipase og LDL-reseptor (28). For leverceller er det vist at når fritt, intracellulært kolesterol øker, hemmes aktiviteten av SREBP (28). Derved hemmes

bl.a. LDL-opptak i og med at syntesen av LDL-reseptorer synker. Dette er en hensiktsmessig tilbakekoblingsmekanisme for å opprettholde et stabilt intracellulært kolesterolnivå. LDL-reseptorer står for 2/3 av LDL-opptak i plasma. Samtidig hemmes lipoprotein lipase, og nedbrytningen av triacylglyserol i VLDL hemmes (jfr kapittel 3.5). Innvirkning på SREBP-tilbakekoblingssystemet kan forklare økningen av VLDL observert av Urgert og medarbeidere (25), referert ovenfor. En hovedhypotese i forskningen omkring diterpenenes virkningsmekanismer, har vært at de påvirker SREBP, i leverceller eller andre vev. Enten direkte, eller indirekte ved å endre intracellulær kolesterolkonsentrasjon (26).

3.5 Lipoproteinmetabolismen

I det følgende skal det gis en kort gjennomgang av hovedtrekk ved lipoproteinmetabolismen. Avsnittet baserer seg på lærebok i biokjemi (20) og referanse (19). Det henvises også til figur 4. Apolipoproteiner er proteinbestanddelen av lipoproteinene og produseres i lever. Disse binder lipidene i blodbanen - kolesterol og triglyserider, i ulike mengder. Proteinbærer er nødvendig da lipidene er uløselige i vann (plasma). Komplekset av lipid og protein, sammen med et overflatelag fosfolipider, utgjør et lipoprotein. Chylomikroner er lipoproteiner som transporterer lipider fra tarmen, og vil ikke bli omtalt nærmere. VLDL (very low density lipoprotein) syntetiseres i lever. Dens hovedoppgave er transport av triglyserider i blodbanen. VLDL består derfor hovedsaklig av triglyserider, og er forstadiet for IDL(intermediate density lipoprotein) og LDL(low density lipoprotein). VLDL, IDL og LDLs viktigste strukturelle protein er Apo B100, som bl.a. binder LDL-reseptor. Alle tre overnevnte lipoproteiner tas altså opp via LDL-reseptor.

Triglyserider i VLDL hydrolyseres ved endotelbunden lipoprotein lipase. Dette etterlater en restpartikkel hovedsaklig med kolesteryl ester – IDL (VLDL restpartikkel). IDL prosesseres videre til LDL. LDLs hovedfunksjon er å bringe kolesterol til lever og perifere vev gjennom opptak via LDL-reseptor. LDL bærer hovedtyngden av kolesterol i blod. Hyperlipidemi forekommer ved innvirkning på en eller flere av fire hovedpunkter i kaskaden fra VLDL til LDL (jfr 19):

- Økt sekresjon av VLDL fra lever.
- Nedsatt aktivitet av lipoprotein lipase medfører akkumulasjon av triglyseridrike lipoproteiner, og derved hypertriglyseridemi.
- Nedsatt opptak og nedbrytning av IDL medfører opphopning av denne.
- Defekt binding av LDL i LDL-reseptor (genetisk, erhvervet eller en kombinasjon) vil gi nedsatt opptak av LDL.

HDL (high density lipoprotein) har som hovedrolle å fjerne vevskolesterol og bringe dette tilbake til lever. Blant annet overfører HDL kolesteryl ester til VLDL, ved hjelp av blodbaneenzymet kolesteryl ester transfer protein (CETP). VLDL omdannes i prosessen til LDL, som så bringer kolesteryl ester til lever. En økning i aktiviteten til CETP vil altså medføre en økt omdannelse av VLDL til LDL. I kaffediterpensammenheng er det særlig fokusert på nedsatt opptak av LDL via LDL-reseptor, og økt omdannelse av VLDL til LDL ved kolesteryl ester tilførsel mediert av CETP (30, 31).

3.6 Diterpenenes affeksjon av intracellulær kolesterolmetabolisme

Spørsmålet om diterpenene, spesielt cafestol, påvirker intracellulær kolesterolhomeostase har vært sentralt i forsøkene på å forklare økningen av blodkolesterol. Økning i intracellulært kolesterol vil teoretisk medføre at cellen tar opp mindre kolesterol fra blodbanen (jfr. ovenfor), hvorav LDL er viktigste forsyner. Hemmet opptak vil føre til at LDL øker. Ulike mekanismer hvorved cafestol kan øke intracellulær kolesterolkonsentrasjon er derfor studert.

3.6.1 Effekter på gallesyresyntese

Det er en klar sammenheng mellom gallesyresyntese og serum LDL-konsentrasjon (35). Konversjon av kolesterol til gallesyrer er hovedruten for ekskresjon av kolesterol fra kroppen. Spørsmålet om diterpenene påvirker gallesyresyntesen i lever er grundig studert. En hemning av gallesyresyntesen vil medføre en opphopning av intracellulært kolesterol, nedsatt SREBP-aktivitet og derved øket LDL-kolesterol.

3.6.1.1 Cafestol hemmer gallesyresyntesen i rottehepatocytter

I 1997 publiserte Post og medarbeidere (36) en in vitrostudie av rottehepatocytter. Studien viste at cafestol hemmet gallesyresyntesen ved å virke inn på enzymene kolesterol-7 α -hydroksylase og sterol-27-hydroksylase. Kolesterol-7 α -hydroksylase er det hastighetsbegrensende enzym i gallesyresyntesen hos rotter og mennesker. Sterol-27-hydroksylase initierer en alternativ synteserute, som gir et betydelig bidrag til den totale gallesyresyntesen (37). Studien (36) viste

doseavhengig nedsatt gallesyresyntese ved inkubasjon av hepatocytene med cafestol. Maksimal reduksjon var slående 91% nedgang i total gallesyresyntese, - 79% kolesterol-7 α -hydroksylaseaktivitet og - 49% sterol-27-hydroksylaseaktivitet, etter 24 timers inkubasjon med 20 μ g/mL cafestol. Årsaken til enzymhemningen var en nedgang i begge enzymers gentranskripsjon og derved mRNA-nivå, samt en direkte inhibitorisk effekt på kolesterol-7 α -hydroksylase. Forskerne inkuberte også cellene med en blanding av cafestol og kahweol, som viste seg å være mindre potent. Dette stemmer godt overens med resultatene fra Urgert og medarbeideres metaanalyse (25), referert ovenfor. Nedgangen i enzymaktiviteten tilsvarte nedgangen i enzym-mRNA. Konklusjonen fra studen var at cafestol hemmer gallesyresyntesen i rottehepatocytter - ved nedregulering av disse enzymenes transkripsjon.

3.6.1.2 Ikkesignifikant reduksjon av gallesyresyntesen hos humane hepatomceller

Samtidig viste en in vitro studie ved Rustan og medarbeidere (38) på humane HepG2-celler (en type hepatomceller) en ikke-signifikant nedgang i gallesyresyntesen, 5-10%. Dette ved inkubasjon med ulike konsentrasjoner (10-30 μ g/mL) cafestol og cafestol-kahweol (20 μ g/mL) blanding. Cafestolkonsentrasjonen var altså tilsvarende det som ble brukt i rottehepatocytstuden. Enzymnivåer ble ikke målt. Inkubasjonstiden var her 11 timer. Cellenes evne til å senke gallesyreproduksjonen ble vist ved reaksjon på tilsetning av HMG CoA-reduktasehemmer (det mye brukte kolesterolsenkende medikamentet Simvastatin).

*3.6.1.3 Hemning av gallesyresyntesen hos Apo E*3 Leiden mus*

Manglende reproduksjon av rottestuden hos mennesker sådde tvil om innvirkning på gallesyresyntesen var en (sentral) virkningsmekanisme for den kolesteroløkende effekten av diterpener hos mennesker. Samtidig manglet bekræftelse på funnene in vitro ved in vivo-studier. Passende dyremodeller hadde vært vanskelig å oppdrive, i og med at mange dyrearter ikke viser de samme effektene på serum lipoproteiner som mennesket.

I 1999 kom en in vivo studie av Apo E*3-Leiden transgene mus (32). Musene ble valgt fordi de er svært følsomme for diettinduserte lipoproteinendringer. ApoE-isoform er bestemmende for bindingsaffinitet til LDL-reseptor og derved opptak av lipoproteiner (33). I Apo E*3-Leiden-mus er dette opptaket delvis defekt. Musene ble foret med placebo, lav- eller høy-cafestolholdig diett i 8

uker. Cafestolmengene tilsvarte 8 eller 40 kopper kokekaffe per dag hos et menneske med normalt energiinntak (2500 kcal/dag). Serumkolesterol økte med 31% hos musene foret med lav-cafestol-diett og 61% med høy-cafestol-diett. Kolesteroløkningen skyldtes i hovedsak økning i VLDL og IDL-kolesterol. Dette i motsetning til hos menneske, hvor LDL-kolesterol øker mest (ref. ovenfor). Forfatterne foreslår at dette kan skyldes ulikheter i absorpsjon/metabolisme av kaffediterpenene, eller diterpenenes ulike effekt på lipoproteinmetabolismen hos ulike arter.

For å undersøke virkningsmekanismer bak kolesteroløkningen ble samme musestamme foret med høydose cafestol eller placebo-diett i 3 uker. Resultatene viste at cafestol hemmet enzymaktivitet og mRNA-nivåer av kolesterol-7 α -hydroksylase med henholdsvis 57 og 58%. Sterol-27-hydroksylase mRNA var redusert med 32%. Totalt fekal gallesyremengde var nedsatt med 41%.

*3.6.1.4 Cafestoleffekter på kjernereseptorene FXR og PXR hos ApoE*3 Leiden mus*

Ricketts og medarbeidere undersøkte effekter av cafestol på kjernereseptorene farnesoid X reseptor (FXR) og pregnan X reseptor (PXR) (34). FXR og PXR regulerer transkripsjon av flere viktige gener involvert i kolesterolmetabolismen. In vitrostudier viste at cafestol er en agonist for FXR og PXR hos mus og menneske (34). Det ble gjort in vivo forsøk ved å gi cafestol til villtype-, FXR- og FXR/PXR-knockoutmus (34). Villtypemusene responderte på cafestol med en nedregulert ekspresjon av gallesyresyntesegener, deriblant kolesterol-7 α -hydroksylase. Denne effekten manglet hos FXR-knockoutmusene. Altså skjer nedregulering av gallesyresyntesegenene via effekter på FXR. Ved nærmere undersøkelser fant man varierende effekter av cafestol på FXR-regulerte gener i villtypemusenes lever. Gener hvis transkripsjon nedreguleres av FXR, deriblant kolesterol-7 α -hydroksylase, ble nedregulert av cafestol. Man fant imidlertid ingen effekt på transkripsjon av gener som oppreguleres av FXR. Det antas at cafestolkonsentrasjonen i levervevet ikke blir høy nok til å affisere FXR direkte. Forfatterne foreslår derfor at nedreguleringen av FXR-regulerte gener i lever skjer indirekte:

Cafestol øker transkripsjon av intestinalt gallesyrebindende protein (IBABP) og fibroblast vekstfaktor 15 (FGF15) i tarmceller. Transkripsjonsøkningen skjer via effekter på både FXR og PXR i tarmcellene. IBABP absorberer gallesyrer fra tarm til blod. Gallesyrer er fysiologiske aktivatorer av FXR, og kan derfor når de resirkuleres i den enterohepatiske sirkulasjon gi negativ tilbakekobling på produksjonen av gallesyrer (39). FGF15 fra tarmceller er vist å hemme kolesterol-7 α -hydroksylasetranskripsjon i lever (40). Med andre ord fører cafestol, via effekter på

tarmceller, til øket gallesyre- og FGF15-konsentrasjon i levervevet. Dette foreslås å medføre en nedregulering av FXR-regulerte gener i lever (34).

3.6.1.5 Indikasjoner på at gallesyresyntesen ikke hemmes hos menneske

Den første studien av om cafestol virker inn på kolesterol-7 α -hydroksylaseaktivitet hos menneske kom i 2005 (41). Enzymaktiviteten ble målt indirekte, ved måling av 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one i plasma. Denne er en intermediærmolekyl i gallesyresyntesen, som er rapportert å gjenspeile kolesterol-7 α -hydroksylaseaktivitet i lever (42). Over to 5-ukersperioder ble henholdsvis 38 og 31 forsøkspersoner gitt cafestol og kahweol tilsvarende omlag 10 kopper kaffe daglig. Før forsøksperiodene var det 3-ukers placeboperioder for sammenlikning. Plasmanivå av 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one økte i begge forsøksperiodene. 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one er lipofilt, og en økning kunne delvis forklares ved økningen i serum lipider under cafestolbehandlingen. Etter korreksjon for dette var økningen i 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one 24% i første forsøksperiode, mens det ikke var noen signifikant effekt i andre forsøksperiode. Man fant altså indikasjoner for en økning i gallesyresyntesen – stikk i strid med hva man hadde forventet utfra dyrestudiene.

3.6.2 HMG CoA reduktase

HMG CoA reduktase er et intracellulært enzym, og nøkkelen til cellenes egen de novo syntese av kolesterol. En økning i enzymaktiviteten vil derved øke intracellulær kolesterolkonsentrasjon. Det er tidligere redegjort for at SREBP modulerer transkripsjonen av HMG CoA reduktase, og at enzymet derfor er underlagt en negativ tilbakekobling. I kaffediterpensammenheng er enzymet således interessant i to sammenhenger: Dersom diterpenene hemmer SREBP, vil man forvente en nedgang i transkripsjon og aktivitet av enzymet. Alternativt kan diterpenenes stimulering av enzymet eller dets transkripsjon være mekanismen for økt intracellulært kolesterolnivå og sekundær hemning av SREBP. Flere studier har tatt tak i spørsmålet.

I rottehepatocytstuden ble HMG CoA-reduktase mRNA målt nedsatt 20% av 24 timers 20 μ g/mL cafestol (36). Forfatterne konkluderer med at dette er kompensatoriske forandringer mediert av SREBP - for å vedlikeholde intracellulær kolesterolhomeostase samtidig med nedsatt gallesyresyntese. De påpeker samtidig at endringen alternativt kan skyldes at cafestol direkte

hemmer SREBP. Dette kan i så fall forklare den tilsynelatende manglende effekten av cafestol på gallesyresyntese i humane studier. En studie av humane hudfibroblaster viste 40% nedsatt inkorporasjon av radiomerket acetat i kolesterol. Dette tolkes som indikasjon på nedsatt HMG CoA reductaseaktivitet. Hudfibroblastene ble inkubert med 20µg/mL cafestol i 24 timer (43).

Hudfibroblaster ble valgt fordi de har en godt studert og kjent kolesterolmetabolisme. HMG CoA reductaseaktivitet var altså nedsatt både i rottehepatocytter og humane hudfibroblaster – og i alle fall hos førstnevnte på grunn av redusert gentranskripsjon.

I studien av humane hepatocytter ble HMG CoA reductaseaktivitet og -mRNA nivå også målt (38). Hepatocytene viste ingen reaksjon på 20µg/mL cafestol-kahweol blanding inntil 48 timer, eller 5µg/mL cafestol i 24 timer – enzymaktiviteten forble den samme. Imidlertid førte inkubasjon med 20µg/mL cafestol til at enzym-mRNA økte med 35% etter 24 timer.

En studie ved Ranheim og medarbeidere (44) på en type humane cancer coli-celler (CaCo2-celler) viste ingen endring i inkorporasjon av radiomerket acetat i kolesterol under påvirkning av 20µg/mL cafestol. Det ble dog observert en dobbelt sekresjon av radiomerket uesterifisert kolesterol etter 24 timer. Dette kan tyde på øket HMG CoA reductaseaktivitet.

3.6.3 ACAT

ACAT er et intracellulært enzym som esterifiserer fritt kolesterol til lagringsformen kolesteryl ester. Enzymet fungerer som en buffer, og aktiviteten øker ved økt intracellulært kolesterol (29). En mulig effekt av cafestol kan være ved en hemning av ACAT – og derved en opphopning av fritt intracellulært kolesterol, med en påfølgende nedregulering av LDL-reseptortranskripsjon.

Den første indikasjonen på at dette finner sted, kom fra CaCo2-cellestudien, som viste en hemmet esterifisering (44). Effekten var dog liten, men statistisk signifikant. Esterifiseringen var derimot kraftig økt i humane hudfibroblaster – en 2.3-dobling sammenliknet med kontrollceller etter 24 timers inkubasjon med cafestol (43). Konsentrasjon av intracellulær kolesteryl ester var uendret i hepatocytene til ApoE*3 Leiden musene fra artikkelen beskrevet tidligere (32). Man fant dog en dobling av kolesteryl esterinnholdet sektrert i VLDL-lipoproteiner. Dette er muligens en indikasjon på øket ACAT-aktivitet. I studien av humane hepatocytter (38) fant man en usignifikant og liten økning i kolesteryl esterdannelse. Sekresjon av kolesteryl ester fra cellene var uendret. I rottehepatocytstudien (36) fant man også uendret nivå av intracellulær kolesteryl ester. Man fant

heller ikke øket sekresjon av apolipoprotein B (som markør for VLDL) etter inkubasjon med cafestol.

3.6.4 LDL-opptak, LDL-reseptoraktivitet og LDL-reseptorsyntese

La oss ta utgangspunkt i hypotesen om at cafestol øker konsentrasjonen av intracellulært, fritt kolesterol. Da ville man forvente en nedregulering av LDL-opptak, LDL-reseptor-aktivitet og -syntese ved tilsetning av cafestol. Negativ tilbakekobling av LDL-reseptortranskripsjon ved øket intracellulærnivå av kolesterol er vist i flere studier (45). LDL-reseptors funksjon er å mediere endocytose av apo B- og apo E-holdige lipoproteiner. Regulering av dennes aktivitet er en viktig metode for cellen å regulere intracellulær kolesterolkonsentrasjon. Samtidig vil en nedsatt reseptoraktivitet medføre opphopning av LDL-kolesterol i blod. Opptak av LDL i leverceller er spesielt sentralt for regulering av LDL-kolesterol hos menneske. Normalt skjer over 70% av dette opptaket via LDL-reseptor (46).

3.6.4.1 Nedsatt LDL-reseptor mRNA i rottehepatocytter

Det har derfor vært foreslått at cafestol kan ha effekt på LDL-reseptoraktivitet som en mulig mekanisme for økningen av serum-LDL-kolesterol. Flere studier har tatt tak i spørsmålet. Rottehepatocytstuden (36) var den første av disse, og funnene var oppløftende. Man fant LDL-reseptor-mRNA signifikant nedsatt 18% ved inkubasjon med 20µg/mL cafestol i 24 timer. Forfatterne påpeker samtidig at LDL-reseptors rolle som regulator av kolesterolbalanse er liten hos rotter sammenliknet med mennesker. De påpeker også at liknende inhibisjon av LDL-reseptortranskripsjon er funnet in vivo ved å øke kolesterolinholdet i kosten hos rotter (47).

3.6.4.2 Redusert LDL-opptak hos humane hudfibroblaster

Studien på humane hudfibroblaster (43) viste at cafestoltilførsel nedsatte cellenes opptak av radiomerket LDL. Cafestol-kahweolblanding i tilsvarende konsentrasjon, var signifikant mer potent enn rent cafestol i inhibisjon av LDL-opptak. Dette i motsetning til at man i andre sammenhenger har funnet kahweol som et mindre potent diterpen. Etter 6 timers inkubasjon var celleassosiert LDL 9% nedsatt ved cafestolkonsentrasjon 10µg/mL, og 18% nedsatt ved dobbelt cafestolkonsentrasjon. Etter 18 timer var nedgangen ved et maksimum, idet celleassosiert LDL var redusert med 26% og

55% for henholdsvis 10 og 20µg/mL cafestol. Med andre ord var altså nedgangen i celleassosiert LDL både konsentrasjons- og inkubasjonstidsavhengig. Antall LDL-reseptorer på celleoverflaten ble så målt. Cafestol reduserte spesifikk binding (altså i LDL-reseptor) av radiomerket LDL med inntil 54%.

Bindingsaffiniteten mellom LDL og dens reseptor var uaffisert. Kvantifisering av antall LDL-reseptorer ved hjelp av immunoblotting viste en reduksjon av antall LDL-reseptorer med ca 25% etter 24 timers inkubasjon med 20µg/mL cafestol. Forskerne undersøkte videre om de observerte effekter kunne skyldes hemmet transkripsjon av LDL-reseptorgenet. LDL-reseptor-mRNA var imidlertid uendret etter 23 timers inkubasjon med 20µg/mLcafestol. Ved å sette SRE-1, regulator av LDL-reseptortranskripsjon, i promotorregionen for et reporter-gen og måle konsentrasjonen av genprodukt, fant man også denne uendret etter tilsetning av cafestol. Begge forsøk på å vise en endring i LDL-reseptortranskripsjon hadde mislyktes.

3.6.4.3 Økning i LDL-reseptortranskripsjon hos CaCo2-celler

Studien på humane cancer coli-celler (44) ga ganske andre resultater enn hudfibroblastforsøkene. Inkubasjon med 20µg/mL cafestol i 24 timer, ga en økning i radiomerket LDL-opptak på 50% (25% etter 12 timer). Samtidig fant man en noe lavere effekt av cafestol/kahweol blanding. Det var en 3-dobling av LDL-reseptor-mRNA i de 20 µg/mLcafestolinkuberte cellene sammenliknet med kontroll. Transfeksjon av SRE-1 promotor gav en 20% oppregulering av aktiviteten til reporter-genprodukt. Denne studien tyder altså på at cafestol stimulerer til LDL-reseptor-gentranskripsjon, i alle fall delvis via aktivering av SRE-1 promotor, i CaCo2-celler.

3.6.4.4 Posttranskripsjonell hemning av LDL-reseptor hos humane hepatoceller

Det ville også være meget intreressant å undersøke om humane hepatocytter endrer sin aktivitet/transkripsjon av LDL-reseptor. Dette er gjort i hepatomstudien (38). Inkubasjon med 20µg/mL cafestol i 18 timer gav en nedgang i LDL-opptak på 15-20%. Under samme forhold var LDL-nedbrytning i cellen 20-30% redusert. Effektene var konsentrasjonsavhengige, og ble først signifikant ved 10µg/mLcafestol. Antall bindeseter (kapasitet) for LDL på celleoverflaten var redusert med maksimalt 35% (etter 6 og 10 timer), mens affinitet mellom LDL og reseptor var uendret. Opptak og nedbrytning av LDL korrelerte med inkubasjonstid og konsentrasjon av

cafestol. Videre fant man ingen endring i LDL-reseptor mRNA, heller ingen aktivisering av SRE-1 promoter. Konklusjonen fra forfatterne er at cafestol medfører nedsatt aktivitet i hepatiske LDL-reseptorer og derved ekstracellulær akkumulasjon av LDL. Siden man ikke påviste noen endring i LDL-reseptortranskripsjon, foreslår forfatterne at mekanismen for hemning av LDL-reseptor hos mennesket er posttranskripsjonell.

3.7 Kolesteryl ester transfer protein

Det er tidligere i oppgaven redegjort for observasjonen at diterpenene endrer lipoproteinnivåer i blod – med økning i LDL/VLDL-kolesterol og en nedgang i HDL-kolesterol. Affeksjon av blodbaneenzymet kolesteryl ester transfer protein (CETP) er en teoretisk mulig mekanisme for hvorledes denne effekten kan finne sted. Enzymet overfører kolesteryl ester fra HDL til LDL/VLDL (også kjent som ApoB-holdige lipoproteiner). Den eksakte funksjon til fosfolipid transfer protein (PLTP) er ukjent, men enzymet antas å assistere CETP i overføringen (48).

Den første studien som tok for seg spørsmålet om påvirkning av CETP ga lovende resultater. I 1997 kom en artikkel som sa at kaffediterpenene øket serum lipid transferaktivitet hos menneske (30). Artikkelen var basert på en dobbeltblind overkrysningsstudie involverende 10 friske frivillige menn. Over 2 forsøksperioder fikk de h.h.v. 61 mg cafestol daglig, og 60 mg cafestol med 48 mg kahweol, i begge tilfelle som kapsler. Diterpenmengdene er stipulert å tilsvare 10-20 kopper ufiltrert kaffe daglig, altså i rikelig monn. Hver forsøksperiode strakk seg over 28 dager, med 9 ukers utvaskingsperiode imellom. Totalt 3 forsøkspersoner ble overført til placebo halvveis i perioden, da de utviklet forhøyede leverenzymverdier i blod. Hos disse ble data 2 uker ut i testperioden brukt som slutt mål. Sammenliknet med utgangsverdier, viste studien at cafestoltilskudd ga en økning i CETP-aktivitet i blodbanen med 18 %. For PLTPs vedkommende var økningen 21 %. Tilskudd av kahweol ga ingen ekstra effekt.

Forfatterne påpeker samtidig at øket CETP-nivå (og korrelert økt aktivitet) kan være en årsak til så vel som en konsekvens av økt plasma LDL-kolesterol. Dette er blant annet vist ved at LDL-reseptor knockoutmus (med påfølgende høyt LDL-kolesterol) har økede nivåer av CETP (49).

Samme forskergruppe fulgte derfor opp CETP-hypotesen i en ny studie i 2000 (31). Studien omfattet 46 friske mennesker, hvorav halvparten ble servert 0.9L presskannekaffe (stipulert å tilsvare 38 mg cafestol og 33 mg kahweol) og halvparten filterkaffe i 24 uker. Underveis ble

aktiviteten til CETP og PLTP monitorert samtidig med LDL-kolesterol. Forskerne fant her en signifikant øket CETP-aktivitet, 12%, hos de som fikk presskannekaffe, 2 uker ut i forsøksperioden. Økningen fortsatte til 18% etter 12 uker og var 9% etter 24 uker. Maksimal økning var ved 12 uker, mens økningen i LDL-kolesterol kun ble signifikant etter dette tidspunktet. Man fant altså at økningen i CETP-aktivitet kom forut for økningen i LDL-kolesterol. Dette svekker hypotesen om at øket CETP-aktivitet kan være en følge av økning i LDL-kolesterol, og styrker teorien om diterpenindusert øket CETP-aktivitet.

4 Diskusjon

Epidemiologiske forskningsresultater etterlater liten tvil om at diterpenene øker LDL-kolesterol. Likevel er virkningsmekanismen bak dette fenomenet i stor grad ukjent. Denne oppgaven er et forsøk på å belyse noen mulige svar på gåten - resultatene for intracellulær kolesterolmetabolisme er oppsummert i tabell 2, som grunnlag for følgende diskusjon. Problematikken har fått ny relevans ved oppblomstringen av kaffebarkulturen, hvor espresso er i utstrakt bruk, og den nye populariteten av presskannekaffe. Den neste utfordringen på agendaen blir derfor å finne ut av hvilke(n) av de fremsatte hypoteser som er mest plausible.

4.1 *Intracellulær kolesterolmetabolisme*

4.1.1 *Gallesyresyntese*

Mulig cafestolindusert reduksjon av gallesyresyntesen er grundig studert. Det er funnet overbevisende holdepunkter for reduksjon både hos rottehepatocytter (36) – senere bekreftet in vivo hos Apo E*3-Leiden mus (34). Funnene har ikke latt seg reproducere i humane hepatocytter (38). Kolesterol-7 α -hydroksylaseaktivitet eller -mRNA er ikke målt i den humane studien, noe som kunne vært meget interessant.

I den humane studien var dog inkubasjonstiden, 11 timer, vesentlig kortere enn ved rottehepatocyttestudien, 24 timer. Den lille responsen fra de humane cellene, kan tenkes å være en start på et større utslag – dersom inkubasjonstiden hadde blitt forlenget. Dog viste rottehepatocyttestudien en rask hemmende effekt av cafestol på kolesterol-7 α -hydroksylase-mRNA,

detektabel etter 4 timers inkubasjon. Det er også et spørsmål om rottehepatocytter og humane hepatocytter kan tenkes å ha behov for ulike konsentrasjoner av cafestol for å respondere med gallesyresynteseendringer.

Den humane in vivo-studien (41) hvor en metabolitt av kolesterol-7 α -hydroksylase, 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one, ble målt i plasma og funnet forøket, kan heller ikke anses som slående bevis for at diterpenene ikke reduserer gallesyresyntesen hos mennesket. Dette fordi man her benytter seg av et indirekte mål. Studien støtter ikke hypotesen om at nedsatt gallesyresyntese er en av virkningsmekanismene hvorved cafestol øker serum kolesterol hos menneske. Forfatterne diskuterer selv grundig problematikken omkring å benytte en metabolitt for å måle enzymaktivitet. Her fremheves særlig spørsmålene om 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one reflekterer kostholdsinduserte endringer i kolesterol-7 α -hydroksylaseaktivitet hos menneske og hvorvidt cafestol kan tenkes å hemme videre metabolisme av 7 α -hydroksy-4-cholesten-3-one og derved føre til en opphopning.

I tillegg gjenstår spørsmålet om humane hepatocellers kolesterolmetabolisme fullt ut er sammenliknbar med normale hepatocytters. Som en siste faktor kommer eventuelle artsforskjeller mellom gnagere og menneske inn som mulig forklaring på diskrepansen.

Det er dog ikke i foreliggende studier vist uforenelige resultater i forsøkene på å undersøke om diterpenene reduserer gallesyresyntesen. Denne mulige forklaringsmekanismen kan derfor ikke forkastes, og ytterligere studier på dette området vil være ønskelig.

4.1.2 HMG CoA reduktase

Forsøk på å belyse en eventuell sammenheng mellom aktivitet/transkripsjon av HMG CoA reduktase ga svært uforenelige resultater. Rottehepatocytter (36) viste en nedgang i HMG CoA reduktase mRNA. Humane hudfibroblaster (43) viste en 40% reduksjon i enzymproduktet kolesteryl ester, som indikasjon på redusert enzymaktivitet.

Under samme betingelser viste humane hepatoceller (38) en økning i HMG CoA reduktase-mRNA. Samtidig var det i den humane studien ingen endring i enzymets aktivitet. Man kan spørre seg om et øket mRNA-nivå sammenholdt med en uforandret enzymaktivitet kan bety posttranskripsjonell enzymhemning. Humane CaCo2-celler (44) viste som hepatocellene tegn til økt HMG CoA reduktaseaktivitet, her indirekte målt ved en dobling av sekresjonen av kolesteryl

ester. Alle fire cellekulturstudier brukte samme inkubasjonstid og cafestolkonsentrasjon.

Med disse svært sprikende funnene er det få holdepunkter for påvirkning av HMG CoA reduktase som sentral virkningsmekanisme for diterpenene. Dog kan man se for seg de observerte effekter som kompensatoriske justeringer i cellene på endret intracellulær kolesterolkonsentrasjon. Det bør også problematiseres å bruke hudfibroblaster og tykktarmskreftceller som rettesnor for hvordan kroppens celler håndterer diterpener. Disse celletypenes innvirkning på serum LDL-kolesterol er i tillegg av underordnet betydning (29).

4.1.3 ACAT

ACAT-aktiviteten var uendret både i rottehepatocytter (36) og humane hepatocytter (38) – leverceller er som tidligere redegjort for viktige i kolesterolhomeostasen. Det ble dog funnet en massiv økning, 230%, av enzymaktiviteten i humane hudfibroblaster (43). I humane CaCo2-celler (44) ble det vist en nedgang. Disse svært sprikende resultatene etterlater ingen klare indikasjoner på at innvirkning på ACAT er en sentral forklaringsmodell.

4.1.4 LDL-opptak, LDL-reseptoraktivitet og LDL-reseptorsyntese

De ulike cellekulturstudiene har som referert ovenfor vist svært varierende funn ved undersøkelser på om cafestol påvirker LDL-reseptor. I humane hepatocytter (38) og hudfibroblaster (43) er det funnet velkorrelerende resultater. Cellene reduserte sitt opptak av LDL, samtidig med at man fant et redusert antall LDL-reseptorer på overflaten. I begge cellekulturstudiene var LDL-reseptor mRNA dog uendret. Sammenholdt med en nedgang i LDL-reseptor mRNA i rottehepatocytter(36) er disse funnene forvirrende. Forfatterne av de humane studiene (38, 43) hypotiserer at nedgangen i LDL-reseptoraktivitet skyldes inhibisjon av posttranskripsjonell modifikasjon av LDL-reseptor. De foreslår 3 alternative metoder hvorved denne inhibisjonen kan finne sted:

- Nedsatt transport av nysyntetisert LDL-reseptor til celleoverflaten.
- Intracellulær akkumulasjon av nysyntetisert LDL-reseptor.
- Økt nedbrytning/nedsatt resirkulering av nysyntetisert LDL-reseptor.

Humane CaCo2-celler (44) på sin side ga resultater stikk i strid med de to andre humane studiene –

med en økning både i LDL-opptak, LDL-reseptorantall på overflaten og transkripsjon av LDL-reseptorgenet. Med andre ord må det være forskjellige mekanismer til grunn for endringen i LDL-opptak i cellene hos menneske og dyr – i tillegg til markante forskjeller mellom de ulike humane celletypene. Dette gjør påvirkning av LDL-reseptor til en lite trolig mekanisme for hvorledes cafestol øker serum LDL-kolesterol – vel å merke dersom man er ute etter en felles forklaring for menneske og dyr.

4.2 Kolesteryl ester transfer protein

Økning i aktiviteten av CETP gir en elegant forklaring på stigningen i LDL-kolesterol og nedgangen i HDL-kolesterol ved inntak av diterpener. Forklaringen er dog ikke overførbar til andre dyrearter. Som tidligere referert svarer disse med en annen lipidprofil ved tilførsel av diterpener – og foreliggende studier kan ikke sies å gi et overbevisende klart svar på spørsmålet. De største ankepunktene til de foreliggende CETP-studienes resultater, er det lille antalle forsøkspersoner, den urealistisk store dosen kaffediterpener, og det at apolipoproteinkonsentrasjoner ikke ble målt. Dersom cafestol påvirker CETP vil man forvente en endret sammensetning av de eksisterende lipoproteiner. Økning i LDL-kolesterol kan skyldes øket antall LDL-partikler, eller øket kolesteryl esterinnhold i hver enkelt LDL-partikkel. Ved en CETP-indusert endring vil man forvente det sistnevnte. Dette fordi enzymet endrer konfigurasjonen av allerede eksisterende LDL-partikler, og ikke antallet partikler.

Spørsmålet om det er antallet eller konfigurasjonen av lipoproteinene som endres, er dog fremdeles ubesvart. To andre studier har vist en signifikant økning i apolipoprotein B100 etter inntak av kokekaffe (50, 51). Apolipoprotein B100 er en proteinbestanddel i LDL. Det er derfor holdepunkter for at økningen i LDL-kolesterol, i alle fall delvis, skyldes endret antall LDL-partikler. Dette svekker hypotesen om affeksjon av CETP som sentral virkningsmekanisme for diterpenene. Det kan dog med nåværende kunnskap ikke utelukkes at denne mulige mekanismen er en medvirkende faktor.

4.3 Generell diskusjon

Ut fra foreliggende studier er det vanskelig å trekke noen entydig konklusjon om underliggende mekanisme(r) bak diterpenenes påvirkning på LDL-kolesterol. Det er flere mulige årsaker til dette.

Diterpenene kan tenkes å affisere kolesterolmetabolismen i ulike celler og hos ulike dyrearter på ulik måte. Eventuelt kan det tenkes at ulike dyrearter/celletyper trenger ulike konsentrasjoner av diterpener. I begge tilfelle bør validiteten ved bruk av dyrestudier revurderes sterkt. Dersom ulike celletypers kolesterolmetabolisme affiseres forskjellig, vil det også være problematisk å trekke konklusjoner fra studier på celler fra vev som ikke har den store innvirkning på blodkolesterol.

Diterpenene kan også tenkes å påvirke et annet ledd i kolesterolhomeostasen enn de hittil studerte, som induserer endringer i de observerte parametre. Noen av de observerte effekter kan da forklares som kompensatoriske - som et ledd i opprettholdelse av intracellulær kolesterolhomeostase. I tillegg kan det tenkes at balansefaktorene vektet ulikt hos menneske og andre dyrearter. Hva denne eventuelle fellesnevneren består i må overlates til de som kjenner kolesterolmetabolismen bedre.

Et tredje alternativ til forskjellene bør også tas med i betraktningen. Studiene har forskjeller i sine design – det være seg cellekulturbetaingelser, inkubasjonstid, konsentrasjon av diterpener, hvorledes de ulike parametre måles – som kan medføre at resultatene ikke samsvarer. Dette punktet anses som mindre sannsynlig, da resultatene er tildels totalt motstridende. Designforskjeller kan dog ikke utelukkes som medvirkende faktor – spesielt for de undersøkte parametre hvor diskrepansen er mindre uttalt.

Overførbarheten av cellekulturstudiene til in vivo forhold bør det også settes spørsmålstejn ved. Deriblant i hvilken grad inkubasjonstid og diterpenkonsentrasjon samsvarer med realiteten in vivo. Ytterligere studier må til dersom dette skal kartlegges nøyere. Denne problematikken kan også videreføres til fortolkning/sammenliknbarhet av funn i humane in vivo- kontra in vitro-studier.

Etter en gjennomgang av foreliggende cellekulturstudier, er det ingen tvil om at diterpenene affiserer intracellulær kolesterolmetabolisme. Om dette er det uslagsgivende for de observerte endringene i LDL-kolesterol hos menneske er foreløpig noe usikkert. Det er også holdepunkter for at blodbaneanzymer CETP har en finger med i spillet – men i så tilfelle som et humant fenomen. CETP (og andre hypotetiske blodbaneanzymer hos visse andre dyr) som forklaring kan også bidra til å oppklare den manglende kolesteroløkende effekten av diterpener observert hos en rekke andre dyrearter.

Validiteten ved bruk av dyremodeller for å undersøke kolesteroløkende effekt av kaffediterpener er gjennomgått i en studie ved de Roos og medarbeidere (52). De påpeker de store forskjellene mellom

dyrearter. Blant annet fant de annerledes lipidprofil hos afrikanske grønne aper, cebus- og rhesusaper, hamstere og rotter ved tilførsel av diterpener. Eksempelvis viste de grønne afrikanske apene en mindre uttalt kolesteroløkning, og hovedsaklig en økning i HDL-kolesterol. Forfatterne fant ingen dyremodell med tilsvarende lipidprofil som mennesket – og fraråder bruk av dyremodeller til denne problematikken. Ved et tilbakeblikk på rottehepatocytstudien (36) som eksempel, kan man fastslå at dette forholdet ikke er diskutert i artikkelen. Det er dog påpekt at LDL-reseptors rolle som kontroll av kolesterolbalanse er liten hos rotte i forhold til menneske. Det refereres til en artikkel som omhandler leverens rolle som vedlikeholder av kolesterol og LDL-homeostase hos ulike dyrearter, inkludert menneske (53). Denne artikkelen vil være interessant materiale både når man skal vurdere hvorvidt de observerte forhold er forenelige med en felles mekanisme – og for å kunne forstå hva denne fellesfaktoren kan gå ut på.

Det bør også nevnes at kaffediterpenene har en rekke andre effekter enn den LDL-kolesteroløkende. Eksempelvis er det vist DNA-beskyttende effekter av diterpener, antakelig grunnet induksjon av DNA-reparasjonsgener (54). Disse effektene er vist ved signifikant lavere konsentrasjoner enn nødvendig for å fremkalle lipidøkende effekt (54). I tillegg har en sørkoreansk studie vist at kahweol supprimerer induserbar NO syntaseekspressjon i makrofager – og derved virker antiinflammatorisk (55).

4.4 Noen forslag til ytterligere studier

Interessante studier for å komme videre i denne problematikken kan bl.a. innebære:

- Måling av enzymaktivitet og mRNA for kolesterol-7 α -hydroksylase i cafestolinkuberte humane hepatocytter
- Måling av cafestoleffekter på gallesyntese in vivo hos mennesker. Frivillige ileostomipasienter vil i så måte være velegnet, da man unngår videre metabolisme og reabsorpsjon av gallesyrene i tarmen.
- Cellekulturstudier med observasjon av cafestoleffekter på kjernereseptorene PXR og FXR på humane celler - som referert for ApoE*3-Leiden mus (34). Dette vil kunne bidra til å kartlegge om det er felles virkningsmekanisme til grunn hos menneske og andre dyrearter.
- Kvantifisering av antallet LDL-partikler før og etter cafestoleksponering vil gi en idé om det er antallet og/eller størrelsen av LDL-partiklene som øker. Dette vil kunne kartlegge CETPs rolle.

4.5 Konklusjon

Denne oppgaven har tatt for seg mulige mekanismer for diterpenenes påvirkning av serum LDL-kolesterol. Oppgaven peker på endel mekanismer som vi alle har svært begrensede kunnskaper om. Påvirkning av intracellulær kolesterolkonsentrasjon, eventuelt spesifisert ved effekter på gallesyresyntese i lever - eller affeksjon av CETP, fremstår som de sterkeste kandidatene etter denne gjennomgangen. Videre studier er dog nødvendig for sikrere kunnskap omkring tema.

Kaffen har som tidligere redegjort for flere innholdsstoffer med mangeartede effekter. Mange er vist å virke inn på faktorer av betydning for kardiovaskulær sykdom, og andre viktige sykdomsgrupper – som diabetes mellitus og cancer. De kan også tenkes å interagere med hverandre. Kaffe inneholder blant annet fenoler, med en velkjent antioksidativ effekt. Denne kan tenkes å direkte motvirke den aterogene effekten av økt LDL-kolesterol ved å hemme oksidasjon av LDL, som er nødvendig for opptaket i skumcellemakrofagene.

De epidemiologiske studiene etterlater ingen tvil om den LDL-kolesteroløkende effekten av kaffediterpenene. Betydningen av dette i et overordnet helseperspektiv vil avhenge av befolkningens konsum, som nok har blitt betydelig redusert de siste årene med en overgang til større bruk av filterkaffe. Likevel er forskningen omkring dette interessant – da diterpenene utgjør et spennende og unikt utgangspunkt for å studere regulering av kolesterol gjennom kosthold.

Temaet kaffe og helse er stort og sammensatt, med svært mange faktorer å ta i betraktning – både epidemiologisk (standardisering, confoundere), kjemisk(virkestoffer), ulike virkningsmekanismer, risikofaktorer og sykdomsgrupper. Den foreløpige konklusjonen fra metaanalyser omkring kaffekonsum og helse er at vi ikke kan se noen skadelig effekt av kaffe i moderate mengder på sykkelighet og dødelighet. Med nåværende kunnskap er det med andre ord ingen sikre holdepunkter for at kaffekonsum har effekt på folkehelsen. For kokekaffens vedkommende er det ikke vist nevneverdige fordelaktige sider ved diterpenene, tilstrekkelig til å oppveie for deres kolesteroløkende effekt. Det er derfor, med nåværende kunnskap, grunn til å råde befolkningen til å velge kaffetyper uten diterpener.

5 Tabeller og figurer

Tabell 1

Tabellen er en oversikt over noen av kaffens innholdsstoffer med tilhørende foreslåtte og/eller veletablerte positive og negative effekter (basert på 2, 3, 4, 7, 8). Som det fremgår av tabellen har kaffen svært mange virkestoffer, som påvirker et bredt repertoar av helseaspekter.

Innholdsstoff	Positive effekter	Negative effekter
<i>Koffein</i>	Koronaråredilatasjon CNS-stimulasjon Økt betaoksidasjon av fettsyrer Økt basalstoffskifte Langsiktig – økt insulinsensitivitet Nedsatt hjertefrekvens Nedsatt risiko for Parkinsons sykdom Antiinflammatorisk effekt	Kortsiktig – blodtrykksøkning Kortsiktig – neds glukosemetabolisme Supraventrikulær takykardi, atrieflimmer og ventrikkelflimmer (koffeintoksisitet)
<i>Diterpener</i>	Hemmet karsinogenese i colon	Øket total- og LDL-kolesterol
<i>Polyfenoler (klorogensyre m.fl)</i>	Antioksidanteffekter	Hemmet intestinal absorpsjon av fritt jern
<i>Mineraler/sporstoffer (kalium, magnesium, niacin, vitamin E)</i>	Antiinflammatorisk effekt	
<i>Ukjent</i>	Langsiktig – blodtrykksenkning Hemmet hepatisk karsinogenese?	Økt homocystein Fibrinolysehemning Noe økt osteoporose Nedsatt fertilitet (kvinner)

Tabell 2

Neste side. Affeksjon av ulike aspekter ved intracellulær kolesterolmetabolisme – en oppsummering av funn fra ulike studier.

Studie /Parameter	Cafestolkonsentrasjon /kafemengde og eksponeringstid	Gallesyresyntese	Kolest.-7 α -hydroksylase		HMG CoA reduktase		ACAT-aktivitet	Opptak av LDL	LDL-reseptor på celleoverflaten	LDL-reseptor mRNA
			Aktivitet	mRNA	Aktivitet	mRNA				
Rottehepatocytter (36)	20 μ g/mL 24 timer	↓ 91 %	↓ 79%	↓		↓ 20%	↔			↓ 18%
Humane HepG2-celler (38)	10-30 μ g/mL 24 timer	↓ 5-10% (ikke signifikant)					↔			
	5 μ g/mL 24 timer			↔	↔					
	20 μ g/mL 24 timer				↑ 35%			↓ 15-20% (18 timer)	↓ 35% (6 og 10 timer)	↔ (18 timer)
Humane hud-fibroblaster (43)	20 μ g/mL 24 timer				↓ 40% (mengde enzymprodukt)		↑ 230%	↓ 55% (18 timer)	↓ 25%	↔ *
Humane CaCo2-celler (44)	20 μ g/mL 24 timer				↑ 100% (sekr av kol. ester)		↓	↑ 50%	↑ 300%	↑ 20% *
Mennesker in vivo (41)	Tilsv 10-20 kaffekopper dgl i 5 uker		↑ 24% (indirekte mål)							
Apo Eϵ3-Leiden mus (34)	Tilsv 40 kaffekopper dgl hos menneske i 3 uker	↓ 41 %	↓ 57%	↓ 58%			(muligens ↑)			

* = via reportergen

Tabell 3

Diterpeninnhold og innvirkning på kolesterolnivå ved kaffe tilberedt på ulike metoder (25).

Tabellen oppsummerer tre studier av cafestol/kahweolinnhold ved kaffe tilberedt på ulike metoder, og regner ut en gjennomsnittsmengde cafestol/kahweol for de ulike kaffene. Deretter er effekter på serum kolesterol beregnet – med forutsetning om at det drikkes fem kopper kaffe daglig, og gitt at 10mg cafestol øker serum totalkolesterol 0.13 mmol/L, og 10mg kahweol tilsvarende øker kolesterol 0.02 mmol/L.

Table 2 Reported levels of coffee diterpenes in various coffee brews, and the estimated effect on serum cholesterol of consumption of five cups of coffee per day^a

Coffee type	Ratnayake et al (64)		Urgert et al (85)		Gross et al (28)		MEAN		Effect on serum cholesterol with five cups/day ^b (mmol/liter)
	Cafestol or kahweol ^c (mg/cup)	Cafestol (mg/cup)	Kahweol (mg/cup)	Cafestol (mg/cup)	Kahweol (mg/cup)	Cafestol (mg/cup)	Kahweol (mg/cup)		
Paper filtered	0.1	0.1	0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	<0.01	
Instant	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	
Percolator	—	0.3	0.3	—	—	0.3	0.3	0.02	
Mocha	—	1.1	1.4	2.3	2.3	1.7	1.9	0.13	
Espresso	3.6	1.5	1.8	1.0	1.0	2.0	2.1	0.15	
Cafetiere	1.6	3.5	4.4	—	—	2.6	3.0	0.20	
Turkish	3.4	3.9	3.9	5.3	5.4	4.2	4.2	0.32	
Boiled	8.4	3.0	3.9	7.2	7.2	6.2	6.5	0.47	

^aCup sizes are 150 ml for filtered, instant, cafetiere, and boiled coffees; 60 ml for Turkish and mocha coffees; and 25–50 ml for espresso coffees.

^bEstimations are based on the assumption that each 10 mg of cafestol consumed per day raises cholesterol by 0.13 mmol/liter, and each 10 mg of kahweol per day raises it by 0.02 mmol/liter (cf Figure 2).

^cRatnayake et al (64) reported total diterpene content; values are calculated assuming that levels of kahweol and cafestol were equal.

Reprinted, with kind permission, from the *Annual Review of Nutrition*, Volume 17, (c) 1997 by Annual Reviews. www.annualreviews.org

Figur 1

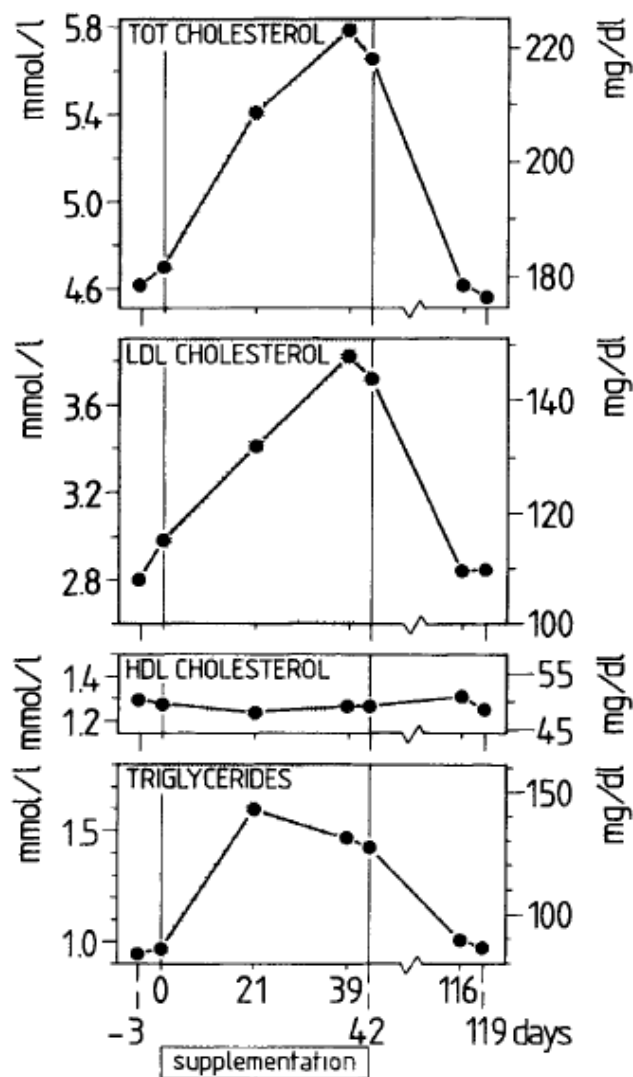
Koffeininntak i mg/person/dag i ulike land verden over. Som det fremgår av figuren er Nederland landet med høyest koffeininntak per person per dag - i overkant av 400 mg/person/dag. Sverige og Norge har h.h.v. 2. og 3.størst koffeininntak. Bildet er hentet fra referanse (3), og basert på data fra referanse (56). Kaffekonsum i ulike land.

(Fjernet av hensyn til kopirettigheter)

Figur 2

Triglyserid-, LDL-, HDL- og total kolesterol-reaksjoner på lipidfraksjonen av kokekaffe (17).

Grafen viser endringer i de nevnte parametre over en forsøksperiode med kaffelipidtilskudd i 42 dager. For ytterligere detaljer fra forsøket, se side 9. Det ses en overbevisende økning i triglyserid-, LDL- og total kolesterolverdier. HDL-kolesterol er nærmest uendret. Som det fremgår av figuren er blodverdiene tilbake til utgangsverdier på dag 119, 77 dager etter avsluttet tilførsel av kaffelipid. Grafene viser funnene i både mmol/L (til venstre) og mg/dL (til høyre).



Mean serum total, LDL, and HDL cholesterol, and triglyceride levels before, during, and after supplementation of lipid-rich coffee fraction.

Reprinted from *The Lancet*, Volume 335., pages 1235-7. Zock PL, Katan MB, Merkus MP, Dusseldorp M, Harryvan JL, Effect of a lipid-rich fraction from boiled coffee on serum cholesterol. With kind permission from Elsevier, (c) 1990.

Figur 3

Den kjemiske struktur av cafestol og kahweol (4). Bemerk strukturell likhet med kolesterol.

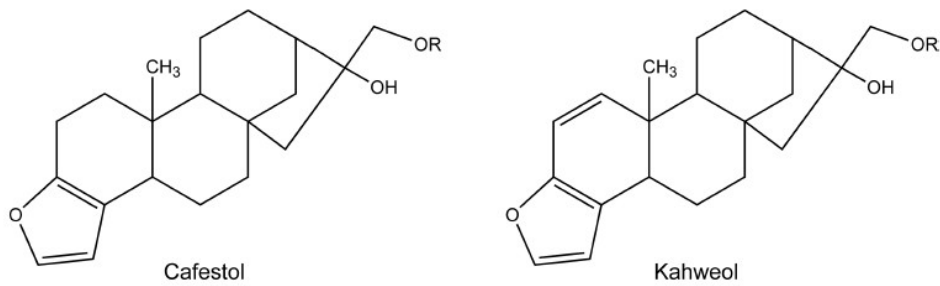
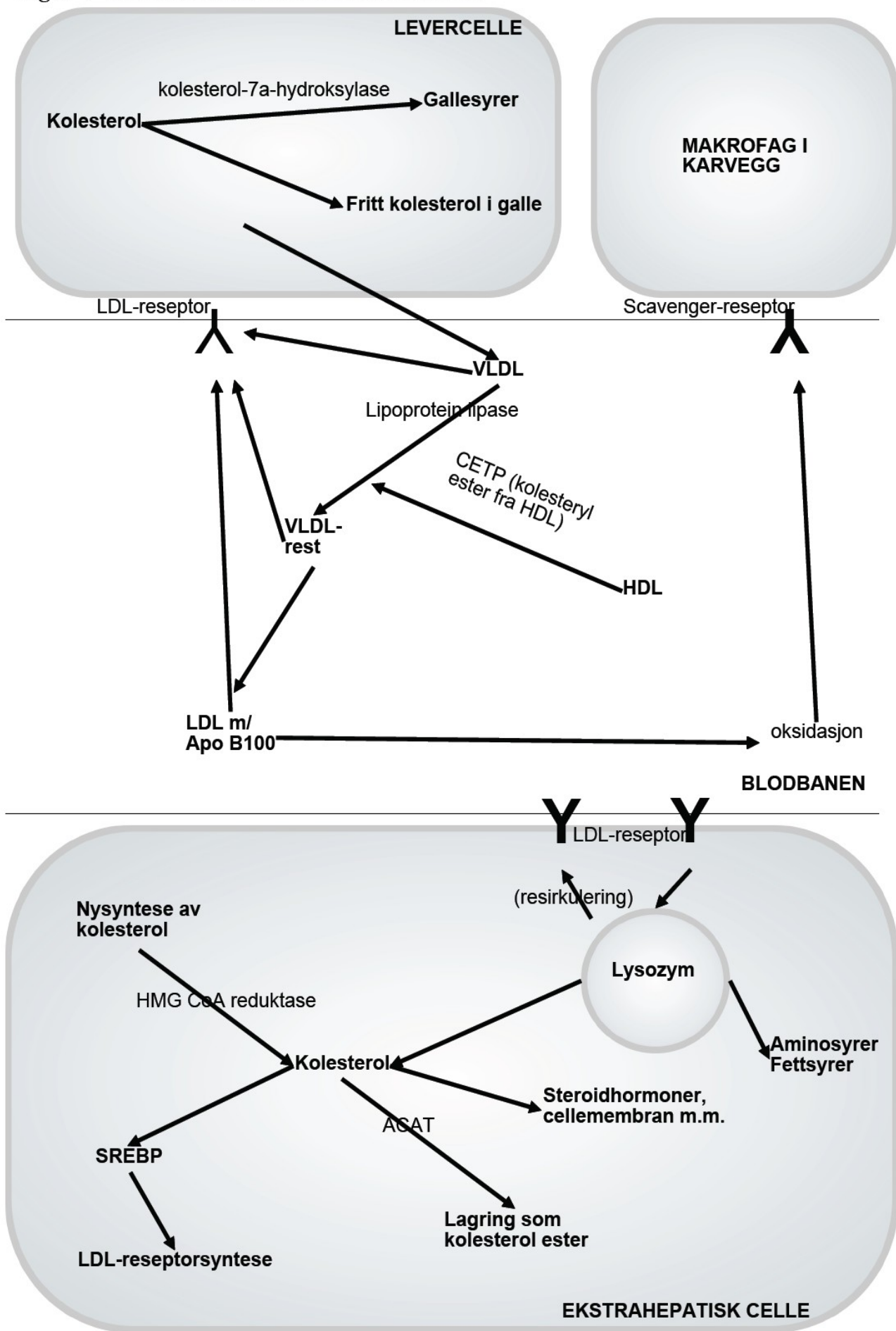


Figure 3 Chemical structures of cafestol and kahweol, diterpenes in coffee with cholesterol-raising effects. R = H: free diterpene; R = fatty acid: diterpene ester.

Reprinted from Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Volume 46, pages 101-23. Higdon JV, Frei B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. With kind permission from Taylor & Francis (c) 2006. www.rightslink.com

Figur 4- Hovedtrekk i kolesterolmetabolismen



Referanser

1 Wilson TC. Coffee. Encyclopædia Britannica Online:

<http://www.britannica.com/eb/article-9106003> 29.05.2007.

2 Mattioli AV. Effects of caffeine and coffee consumption on cardiovascular disease and risk factors. *Future Cardiol.* 2007;3(2):203-12.

3 Cornelis MC, El-Sohemy A. Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18:13-19.

4 Higdon JV, Frei B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Crit Rev Food Sci.* 2006;46:101-23.

5 Sofi F, Conti AA, Gori AM, Luisi MLE, Casini A, Abbate R, Gensini GF. Coffee consumption and risk of coronary heart disease: A meta-analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17(3):209-23.

6 Tverdal A, Stensvold I, Solvoll K, Foss OP, Lund-Larsen P, Bjartveit K. Coffee consumption and death from coronary heart disease in middle aged Norwegian men and women. *Brit Med J.* 1990;300(6724):566–9.

7 Ranheim T, Halvorsen B. Coffee consumption and human health – beneficial or detrimental? - Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49:274-84.

8 Bonita JS, Mandarano M, Shuta D, Vinson J. Coffee and cardiovascular disease: In vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacol Res.* 2007;55(3):187-98.

9 Keijzers GB, de Galan BE, Tack CJ, Smith P. Caffeine can decrease insulin sensitivity in humans. *Diabetes Care.* 2002;25:364-369.

10 Svilaas A, Sakhi AK, Andersen LF, Svilaas T, et al. Intakes of antioxidants in coffee, wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *J Nutr.* 2004;134:562-7.

- 11 Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *J Agric Food Chem* 2002;50:6211-6.
- 12 Verhoef P, Pasma WJ, van Vliet T, Urgert R, Katan MB. Contribution of caffeine to the homocysteine-raising effect of coffee: a randomized controlled trial in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1244-8.
- 13 Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Stefanadis C. Associations between coffee consumption and inflammatory markers in healthy persons: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:862-7.
- 14 Thelle DS, Arnesen E, Førde OH. The Tromsø Heart Study: does coffee raise serum cholesterol? *N Engl J Med.* 1983;308:1454-57.
- 15 Aro A, Tuomilehto J, Kostianen E, Uusitalo U, Pietinen P. Boiled coffee increases serum low density lipoprotein concentration. *Metabolism.* 1987;36:1027-30.
- 16 Bak A. Coffee and cardiovascular risk; an epidemiological study [dissertation]. Erasmus University Rotterdam; 1990.
- 17 Zock PL, Katan MB, Merkus MP, Dusseldorp M, Harryvan JL. Effect of a lipid-rich fraction from boiled coffee on serum cholesterol. *Lancet.* 1990;335:1235-7.
- 18 Heckers H, Göbel U, Kleppel U. End of the coffee mystery: diterpene alcohols raise serum low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels. *J Intern Med.* 1994;235:192-3.
- 19 Brunzell JD, Chait A. Lipoprotein Metabolism: Structure and Function. *Encyclopedia of Life Sciences*:
<http://mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0000609/current/html?hd=All,lipoprotein&hd=All,metabolism> 10.06.2008.
- 20 Champe PC, Harvey RA. Lippincott's illustrated reviews – Biochemistry. 2nd ed. Lippincott Williams and Wilkins;1994.

- 21 Viani R. Coffee. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, pp. 315-39. Weinheim, Germany. VCH Verlag 1986.
- 22 Urgert R, Katan MB. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *J R Soc Med* 1996;89:618-623.
- 23 Urgert R, van der Weg G, Kosmeijer-Schuil TG, van de Bovenkamp P, Hovenier R, Katan MB. Levels of the Cholesterol-Elevating Diterpenes Cafestol and Kahweol in Various Coffee Brews. *J Agric Food Chem*. 1995;43:2167-72.
- 24 Gross G, Jaccaud E, Huggett AC. Analysis of the Content of the Diterpenes Cafestol and Kahweol in Coffee Brews. *Food Chem Toxicol*. 1997;35:547-54.
- 25 Urgert R, Katan MB. The cholesterol-raising factor from coffee beans. *Annu Rev Nutr*. 1997;17:305-24.
- 26 de Roos B, Katan MB. Possible mechanisms underlying the cholesterol-raising effect of the coffee diterpene cafestol. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:41-5.
- 27 Grundy SM, Vega GL. Causes of High Blood Cholesterol. *Circulation*. 1990;81(2):412-27.
- 28 Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997; 89:331-340.
- 29 Steinberg D, Parthasarathy TE, Carew JC, Khoo, and Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-24.
- 30 van Tol A, Urgert R, de Jong-Caesar R, van Gent T, Scheek LM, de Roos B, Katan MB. The cholesterol-raising diterpenes from coffee beans increase serum lipid transfer protein activity levels in humans. *Atherosclerosis*. 1997;132:251-4.
- 31 de Roos B, van Tol A, Urgert R, Scheek LM, van Gent T, Buytenhek R, Princen HMG, Katan MB. Consumption of French-press coffee raises cholesteryl ester transfer protein activity levels before LDL cholesterol in normolipidaemic subjects. *J Intern Med*. 2000;248(3):211-6.

- 32 Post SM, de Roos B, Vermeulen M, Afman L, Jong MC, Dahlmans VEH, et.al. Cafestol Increases Serum Cholesterol Levels in Apolipoprotein E*3-Leiden Transgenic Mice by Suppression of Bile Acid Synthesis. *Arterioscl Throm Vas.* 2000;20:1551-6.
- 33 Weggermans RM, Zock PL, Ordovas JM, Pedro-Botet, Katan MB. Apoprotein E genotype and the response of serum cholesterol to dietary fat, cholesterol and cafestol. *Atherosclerosis.* 2001;154:547-55.
- 34 Ricketts M, Boekschoten MV, Kreeft AJ, Hooiveld GJEJ, Moen CJA, Müller M, et.al. The Cholesterol-Raising Factor from Coffee Beans, Cafestol, as an Agonist Ligand for the Farnesoid and Pregnane X Receptors. *Mol Endocrinol.* 2007;21(7):1603-16.
- 35 Cohen JC. Contribution of cholesterol 7 alpha-hydroxylase to the regulation of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10(4):303-7.
- 36 Post SM, de Wit ECM, Princen HMG. Cafestol, the Cholesterol-Raising Factor in Boiled Coffee, Suppresses Bile Acid Synthesis by Downregulation of Cholesterol 7 α -Hydroxylase and Sterol 27-Hydroxylase in Rat Hepatocytes. *Arterioscl Throm Vas.* 1997;17:3064-70.
- 37 Axelson M, Sjövall J. Potential bile acid precursors in plasma: possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem.* 1990;36:631-40.
- 38 Rustan AC, Halvorsen B, Huggett AC, Ranheim T, Drevon CA. Effect of Coffee Lipids (Cafestol and Kahweol) on Regulation of Cholesterol Metabolism in HepG2 Cells. *Arterioscl Throm Vas.* 1997;17:2140-9.
- 39 Lu T, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwers J, Mangelsdorf DJ. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6:507-15.
- 40 Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, et.al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2005;2:217-225.

- 41 Boekschoten MV, Hofman MK, Buytenhek R, Schouten EG, Princen HM, Katan MB. Coffee Oil Consumption Increases Plasma levels of 7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-one in Humans. *J Nutr.* 2005;135(4):785-9.
- 42 Axelson M, Bjorkheim I, Reihner E, Einarsson K. The plasma level of 7-alpha-hydroxy-cholesten-3-one reflects the activity of hepatic cholesterol 7 alpha-hydroxylase in man. *FEBS Lett.* 1991;284:216-8.
- 43 Halvorsen B, Ranheim T, Nenseter MS, Huggett AC, Drevon CA. Effect of a coffee lipid (cafestol) on cholesterol metabolism in human skin fibroblasts. *J Lipid Res.* 1998;39(4):901-12.
- 44 Ranheim T, Halvorsen B, Huggett AC, Blomhoff R, Drevon AC. Effect of a coffee lipid (cafestol) on regulation of lipid metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* 1995;36(10):2079-89.
- 45 Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1977;46:897-930.
- 46 Bilheimer DW, Goldstein JL, Grundy SM, Starzl TE, Brown NS. Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N Eng J Med.* 1984;311:1658-64.
- 47 Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 1993; 34:1637-59.
- 48 Albers JJ, Wolfbauer G, Cheung MC, et al. Functional expression of human and mouse plasma phospholipid transfer protein: effect of recombinant and plasma PLTP on HDL subspecies. *Biochim Biophys Acta* 1995;1258:27-34.
- 49 Masucci-Magoulas L, Plump A, Jiang XC, Walsh A, Breslow JL, Tall AR. Profound induction of hepatic cholesteryl ester transfer protein transgene expression in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene knockout mice - A novel mechanism signals changes in plasma cholesterol levels. *J Clin Invest.* 1996;97:154-61.
- 50 van Dusseldorp M, Katan MB, van Vliet T, Demacker PN, Stalenhoef AF. Cholesterol-raising

factor from boiled coffee does not pass a paper filter. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:586-93.

51 Aro A, Teirila J, Gref CG. Dose-dependent effect on serum cholesterol and apoprotein B concentrations by consumption of boiled, non-filtered coffee. *Atherosclerosis.* 1990;83:257-61.

52 de Roos B, Sawyer JK, Katan MB, Rudel LL. Validity of animal models for the cholesterol-raising effects of coffee diterpenes in human subjects. *P Nutr Soc.* 1999;58:551-557.

53 Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* 1993;34:1637-1659.

54 Majer BJ, Hofer E, Cavin C, Lhoste E, Uhl M, Glatt HR, et al. Coffee diterpenes prevent the genotoxic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-nitrosodimethylamine in a human derived liver cell line (HepG2). *Food Chem Toxicol.* 2005;43:433-441.

55 Kim JY, Jung KS, Lee KJ, Na HK, Chun H-K, Kho Y-H, et al. The coffee diterpene kahweol suppress the inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Cancer Lett.* 2004;213:147-154.

56 Fredholm BB, Battig K, Holmen J, et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999;51:83-133.