



VKM Report 2016:05

Risk assessment of "other substances" – conjugated linoleic acids

**Opinion of the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy of
the Norwegian Scientific Committee for Food Safety**

Report from the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) 2016: 05
Risk assessment of "other substances" - conjugated linoleic acids

Opinion of the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy of the
Norwegian Scientific Committee for Food Safety
01.03.2016

ISBN: 978-82-8259-196-6

Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM)
Po 4404 Nydalen
N – 0403 Oslo
Norway

Phone: +47 21 62 28 00

Email: vkm@vkm.no

www.vkm.no

www.english.vkm.no

Cover photo: iStock Photo

Suggested citation: VKM. (2016). Risk assessment of "other substances" – conjugated linoleic acids. Opinion of the Panel on Nutrition, dietetic products, Novel Food and Allergy of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, ISBN: 978-82-8259-196-6, Oslo, Norway.

Risk assessment of "other substances" – conjugated linoleic acids

Author preparing the draft opinion

Per Ole Iversen

Assessed and approved

The opinion has been assessed by the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (Vitenskapskomiteen for mattrygghet, VKM). Per Ole Iversen (chair), Livar Frøyland, Margaretha Haugen, Kristin Holvik, Martinus Løvik, Tor A Strand and Grethe S Tell.

(Panel members in alphabetical order after chair of the panel)

Acknowledgment

The Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy has answered the request from the Norwegian Food Safety Authority. Project leader from the VKM secretariat has been Bente Mangschou. Per Ole Iversen is acknowledged for his valuable work on this opinion. Jan Alexander (the Scientific Steering Committee), Åshild Krogdahl (the Scientific Steering Committee) and Helle Margrete Meltzer (former member of the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy) constituted a reference group and are acknowledged for their valuable comments and suggestions on this opinion.

Competence of VKM experts

Persons working for VKM, either as appointed members of the Committee or as external experts, do this by virtue of their scientific expertise, not as representatives for their employers or third party interests. The Civil Services Act instructions on legal competence apply for all work prepared by VKM.

Table of Contents

Summary	6
Sammendrag på norsk	9
Abbreviations and glossary	11
Background as provided by the Norwegian Food Safety Authority	12
Terms of reference as provided by the Norwegian Food Safety Authority	13
Assessment	14
1 Introduction	14
2 Hazard identification and characterisation	15
2.1 Literature	15
Previous risk assessments	15
2.1.1 Report by The Norwegian Institute of Public Health on adverse health effects upon use of CLAs. Norway, 2003	15
Report by Statens næringsmiddeltilsyn on health risks of CLA products. Norway 2004/16	
Opinion of the French Safety Agency (AFSSA) on a "safety assessment of the use of an oil enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLA)". France, 2005	17
EFSA Scientific opinion on the safety of the "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil" Clarinol® as a Novel Food ingredient. EFSA, 2010	17
Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) on a "safety assessment of the use of an oil enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLAs)". France, 2011(a)	18
Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) on the "assessment of the risks associated with substances with nutritional or physiological effects with a view to restricting or prohibiting their use in food stuffs". France, 2011(b)	18
2.1.2 EFSA (2012) Statement on the safety of the "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oils" Clarinol® and Tonalin® TG 80 as Novel Food ingredients. EFSA, 2012	19
2.1.3 Literature search	20
2.2.1 Publication selection and data extraction	20
2.2.2 General information	22
Chemistry	22
Occurrence	22
2.4.1	
2.3 Absorption, distribution, metabolism and excretion	22
2.4 Adverse effects	23
Human studies	23
2.4.1.1 Randomised controlled trials (RCTs)	26

2.4.1.2	Other human trials	29
2.4.1.3	Interactions, allergic sensitisation and adjuvant effects	29
	Animal studies	29
	Effects of CLAs on blood lipids as biomarkers of cardiovascular disease	31
	Mode of action for adverse effects.....	31
2.4.2	Vulnerable groups.....	32
2.4.3	Vulnerable groups.....	32
2.5	Summary of hazard identification and characterisation	32
3	2.4. Exposure / Intake	35
3.1	Food supplements.....	35
3.2	Other sources	35
4	Risk characterisation.....	36
5	Uncertainties.....	38
6	Conclusions with answers to the terms of reference	39
7	Data gaps	41
8	References	42
Appendix 1	46
	Search strategies for this risk assessment.....	46
	Search strategy 1.....	46
	Search strategy 2.....	47
	Search strategy for studies in children and adolescents	48
Appendix 2	49

Summary

The Norwegian Scientific Committee for Food Safety (Vitenskapskomiteen for mattrygghet, VKM) has, at the request of the Norwegian Food Safety Authority (Mattilsynet; NFSA), assessed the risk of "other substances" in food supplements and energy drinks sold in Norway. VKM has assessed the risk of doses given by NFSA. These risk assessments will provide NFSA with the scientific basis for regulating the addition of "other substances" to food supplements and other foods.

"Other substances" are described in the food supplement directive 2002/46/EC as *substances other than vitamins or minerals that have a nutritional or physiological effect*. It is added mainly to food supplements, but also to energy drinks and other foods. VKM has not in this series of risk assessments of "other substances" evaluated any potential beneficial effects from these substances, only possible adverse effects.

The present report is a risk assessment of conjugated linoleic acids (CLAs), and is based on previous risk assessments of CLAs and articles retrieved from literature searches.

According to information from the NFSA, CLAs are ingredients in food supplements sold in Norway, and NFSA has requested a risk assessment of the following doses of CLAs in food supplements: 3.0, 3.25 and 3.5 g/day. The daily intakes in Norway of CLAs range between 20 and 170 mg (MoBa 2008, version 4).

The CLAs are mostly studied in overweight and obese subjects because of their claimed effects to reduce body weight.

CLAs constitute a group of isomeric fatty acids mostly produced by bacterial fermentation in the gut. In the human diet, meat (mainly isomers c9,t11 and t10,c12) and dairy products (mainly isomer c9,t11) are main sources of CLAs. The various isomers may have different metabolic effects. In the food supplements evaluated by EFSA (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; EFSA, 2012), Clarinol® and Tonalin®, the t10,c12 and the c9,t11 isomers are present in about equal proportions. In research articles not all authors are consistent in reporting what they have studied, so in this report we sometimes do not distinguish between these isomers; hence they are referred collectively to as CLAs if it is not specified.

Most of the cited studies have tested supplemental CLAs in doses of about 3.5 g/day, but ranging from 0.7 to 6.0 g/day. In most of the randomised controlled trials (RCTs) there have been no significant differences in adverse effects between the placebo and CLA-groups.

Concerns about indications of an unfavourable effect on biomarkers of lipid- and carbohydrate metabolism in obese men with metabolic syndrome as well as unfavourable effect on antioxidant status; increased markers of oxidative stress after consumption of supplemental CLAs have been reported in previous studies. No clear dose-response effects have been found. It is concluded that supplemental CLAs may impair lipid- and carbohydrate metabolism in obese men with the metabolic syndrome.

Intake of supplemental CLAs by lactating women may reduce fat content in breastmilk, and intake of supplemental CLAs by pregnant women may reduce birth weight and –length among their offsprings.

Only one randomised controlled trial has included children (6-10 years). These children were all overweight or obese, subjects likely to have a different CLA-metabolism/-effect than normal-weight subjects. VKM considers that current data are too incomplete to evaluate any doses of CLAs for children and adolescents.

There are few long-term studies, and adverse health effects were not primary outcomes in these studies. Based on available data no conclusions can be drawn for supplemental use of CLAs longer than six months.

VKM concludes that:

- In adults (≥ 18 years), the specified doses 3.0, 3.25 and 3.5 g/day CLAs in food supplements are considered to be unlikely to cause adverse health effects if used for up to six months.
- CLA may cause lipid- and carbohydrate disturbances in obese men with metabolic syndrome as well as in overweight/obese subjects with type 2 diabetes.
- Use of CLA supplements in lactating and pregnant women may cause reduction in milk production and in the content on milk fat and cause decreased birth weight and-length in their off-springs.
- No conclusion can be made for children and adolescents.
- Data are insufficient to conclude regarding use of CLAs for more than six months.

Short summary:

The Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) has, at the request of the Norwegian Food Safety Authority, assessed the risk of specified doses of CLAs in food supplements. VKM concludes that:

- In adults (≥ 18 years), the specified doses 3.0, 3.25 and 3.5 g/day CLAs in food supplements are considered to be unlikely to cause adverse health effects if used for up to six months.
- CLA may cause lipid- and carbohydrate disturbances in obese men with metabolic syndrome as well as in overweight/obese subjects with type 2 diabetes.
- Use of CLA supplements in lactating and pregnant women may cause reduction in milk production and in the content on milk fat and cause decreased birth weight and-length in their off-springs.
- No conclusion can be made for children and adolescents.
- Data are insufficient to conclude regarding use of CLAs for more than six months.

Key words: Adverse health effect, CLA, conjugated linoleic acid, food supplement, negative health effect, Norwegian Scientific Committee for Food Safety, other substances, risk assessment, VKM.

Sammendrag på norsk

På oppdrag for Mattilsynet har Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) vurdert risiko ved tilsetning av "andre stoffer" i kosttilskudd og energidrikk som selges i Norge. VKM har risikovurdert ulike bruksdoser oppgitt fra Mattilsynet. Disse risikovurderingene vil gi Mattilsynet vitenskapelige grunnlag for å regulere "andre stoffer" i kosttilskudd.

"Andre stoffer" er stoffer som har en ernæringsmessig eller fysiologisk effekt, og som ikke er vitaminer og mineraler. De tilsettes i hovedsak til kosttilskudd, men også til energidrikker og andre næringsmidler. I disse risikovurderingene har VKM ikke sett på potensielle gunstige helseeffekter, men kun vurdert mulige negative helseeffekter.

I denne rapporten har VKM vurdert risiko ved konjugerte linolsyrer (CLAs). Risikovurderingen er basert på tidligere risikovurderinger av CLAs og artikler som er funnet ved litteratursøk.

Ifølge informasjon fra Mattilsynet er CLAs en ingrediens i kosttilskudd som selges i Norge. Oppdraget fra Mattilsynet var å risikovurdere følgende doser av CLAs i kosttilskudd: 3,0; 3,25 og 3,5 g/dag. Daglig inntak av CLAs i Norge er rapportert å være mellom 20 og 170 mg (MoBa 2008, version 4).

CLAs er for det meste undersøkt i overvektige og obese på grunn av påstått vektreduserende effekt.

CLAs utgjør en gruppe isomere fettsyrer som hovedsakelig fremstilles ved bakteriell fermentering i tarmen. Kjøtt (hovedsakelig isomerene c9,t11 and t10,c12) og meieriprodukter (hovedsakelig isomer c9,t11) er de viktigste kildene til CLAs i kosten. De ulike isomerer kan ha forskjellige metabolske effekter. I kosttilskuddene som er vurdert av EFSA (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; EFSA, 2012), Clarinol[®] og Tonalin[®], forekommer isomerene t10, c12 og c9, t11 i omlag likt forhold (1:1). Ikke alle forfattere skiller mellom de ulike isomere i vitenskapelig artikler, og derfor er de omtalt samlet som CLAs dersom isomerer ikke er spesifisert.

De fleste omtalte studiene har undersøkt tilskudd med doser på om lag 3,5 g CLAs per dag, med et dosespenn fra 0,7 til 6,0 g/dag. I de fleste randomiserte kontrollerte studiene (RCT) er det ikke vist noen signifikante forskjeller i negative helseeffekter mellom placebo- og CLA-gruppene.

I flere tidligere rapporter er det uttrykt bekymring rundt ugunstige endringer i biomarkører for fett- og karbohydratmetabolisme i menn med fedme og metabolsk syndrom i tillegg til ugunstig effekt på antioksidantstatus; en økning i markører for oksidativt stress etter inntak av CLA-tilskudd har blitt rapportert i tidligere studier. Noen klar dose-respons-effekt er ikke funnet. Det konkluderes med at CLA-tilskudd kan forstyrre fett- og karbohydratmetabolisme i menn med fedme og metabolsk syndrom samt overvektige og de med fedme som har diabetes type 2.

Inntak av CLA-tilskudd kan muligens føre til redusert innhold av fett i brystmelk hos ammende kvinner, og inntak av CLA-tilskudd hos gravide kvinner kan redusere fødselsvekt og -lengde til barna deres.

Det er kun identifisert en randomisert kontrollert studie med barn (6-10 år). Disse barna hadde overvekt eller fedme, og det er grunn til å anta at disse kan ha en CLA-metabolisme som divergerer fra normalvektige. VKM anser derfor at datagrunnlaget ikke er godt nok til å vurdere noen av de spesifiserte dosene av CLAs for barn og ungdom.

Det er få langtidsstudier, og negative helseutfall var ikke primære helseutfall i noen av langtidsstudiene. Basert på foreliggende data kan det ikke konkluderes ut over seks måneders bruk av CLA-tilskudd.

Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) konkluderer med at:

- For voksne (≥ 18 år) er det usannsynlig at dosene 3,0; 3,25 og 3,5 g/dag CLAs i kosttilskudd vil forårsake negative helseeffekter hvis det brukes opp til seks måneder.
- CLA kan føre til uønskede endringer i lipid- og karbohydratnivåer hos menn med fedme og metabolsk syndrom samt overvektige og de med fedme som har diabetes type 2.
- Bruk av CLA tilskudd hos ammende og gravide kvinner kan føre til reduksjon i melkeproduksjonen og i innholdet av melkefett samt forårsake redusert fødselsvekt og -lengde til barna deres.
- På grunn av få studier gis det ingen konklusjoner for barn eller ungdom under 18 år.
- Basert på foreliggende data kan det ikke konkluderes ut over seks måneders bruk av CLA-tilskudd.

Kort sammendrag: Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) har på oppdrag for Mattilsynet vurdert risiko ved inntak spesifikke doser konjugerte linolsyrer (CLAs) i kosttilskudd. VKM konkluderer med at:

- For voksne (≥ 18 år) er det usannsynlig at dosene 3,0; 3,25 og 3,5 g/dag CLAs i kosttilskudd vil forårsake negative helseeffekter hvis det brukes opp til seks måneder.
- CLA kan føre til uønskede endringer i lipid- og karbohydratnivåer hos menn med fedme og metabolsk syndrom samt overvektige og de med fedme som har diabetes type 2.
- Bruk av CLA tilskudd hos ammende og gravide kvinner kan føre til reduksjon i melkeproduksjonen og i innholdet av melkefett samt forårsake redusert fødselsvekt og -lengde til barna deres.
- På grunn av få studier gis det ingen konklusjoner for barn eller ungdom under 18 år.
- Basert på foreliggende data kan det ikke konkluderes ut over seks måneders bruk av CLA-tilskudd.

Abbreviations and glossary

Abbreviations

AFFSA	- French Agency for Food Safety (now ANSES)
ANSES	- French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety
ATP	- adenosine triphosphate
BMI	- body mass index
bw	- body weight
CO ₂	- carbon dioxide
CRP	- C-reactive protein
EFSA	- European Food Safety Authority
CLA	- conjugated linoleic acid
GI	- gastrointestinal
HDL	- high density lipoprotein
LDL	- low density lipoprotein
LOAEL	- lowest observed adverse effect level
NFSA	- Norwegian Food Safety Authority [<i>Norw.</i> : Mattilsynet]
NOAEL	- no observed adverse effect level
RCT	- randomised controlled trial
SNT	- previous Norwegian Food Safety Authority, now named NFSA [<i>Norw.</i> : Statens næringsmiddeltilsyn]
VKM	- Norwegian Scientific Committee for Food Safety [<i>Norw.</i> : Vitenskapskomiteen for Mattrygghet]
WHO	- World Health Organization

Glossary

"Other substances": a substance other than a vitamin or mineral that has a nutritional or physiological effect (European Regulation (EC) No. 1925/2006, Article 2; <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006R1925&from=en>).

"Negative health effect" and "adverse health effect" are broad terms and World Health Organization (WHO) has established the following definition for "adverse effect": a change in morphology, physiology, growth, development, reproduction or life span of an organism, system or (sub)population that results in an impairment of functional capacity, an impairment of the capacity to compensate for additional stress, or an increase in susceptibility to other influences (WHO, 1994).

An adverse event is considered serious if it: results in death, is life-threatening, requires or prolongs hospitalisation, is a congenital anomaly or birth defect, is a persistent or significant disability/incapacity or is another serious or important medical event.

Background as provided by the Norwegian Food Safety Authority

"Other substances" are substances other than vitamins and minerals, with a nutritional and/or physiological effect on the body. "Other substances" are mainly added to food supplements, but these may also be added to other foods and beverages, such as sports products and energy drinks. Ingestion of these substances in high amounts presents a potential risk for consumers.

In Norway, a former practice of classification of medicines had constituted an effective barrier against the sale of potentially harmful "other substances". Ever since this practice was changed in 2009, it has become challenging to regulate and supervise foods with added "other substances". Meanwhile, in the recent years, the Norwegian market has witnessed a marked growth in the sales of products containing "other substances". In 2011, food supplements containing "other substances" constituted more than 50% of the market share.

While within the European Economic Area, these substances fall under the scope of the European Regulation (EC) No. 1925/2006 on the addition of vitamins, minerals and certain other substances to foods and the European Regulation (EC) No 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients, "other substances" remain largely unregulated. In order to ensure safe use of "other substances" many countries have regulated their use at a national level. For example, Denmark regulates these substances in a positive list i.e. a list of substances with maximal daily doses, permitted for use in food supplements and other foods (FVM, 2014).

The Norwegian Food Safety Authority (NFSA) is working on the establishment of a regulation on the addition of "other substances" to foods at a national level. The regulation will include a list of substances with permitted maximal doses, based on the substances and doses found in products on the Norwegian market. In preparation for a regulation, NFSA has therefore requested the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) to assess the safety of "other substances" found on the Norwegian market. NFSA, in consultation with the industry, has compiled a list of "other substances" found in products marketed in Norway. Only substances with a purity of minimum 50% or concentrated 40 times or more have been included in the list. Substances regulated by other legislations like those for novel foods, food additives, flavourings, foods for special medical purposes, etc. have been excluded from the list.

Terms of reference as provided by the Norwegian Food Safety Authority

The Norwegian Food Safety Authority (NFSA) requested the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) to assess the safety of conjugated linoleic acids (CLAs) in food supplements at the following doses: 3.0, 3.25 and 3.5 g/day.

NFSA requested VKM to assess the safety of "other substances" (in accordance to the guidance document developed in Phase 2) at the doses specified (Phase 3).

Safety assessments of "other substances" present in food supplements shall be carried out for a general population, ages 10 years and above.

Assessment

1 Introduction

"Other substances" are described in the food supplement directive 2002/46/EC as *substances other than vitamins or minerals that have a nutritional or physiological effect*, and may be added to food supplements or e.g. energy drinks.

This risk assessment regards the group of substances conjugated linoleic acids (CLAs) per se, and no specific products.

VKM has in this series of risk assessments of "other substances" not evaluated documentation of any potential beneficial effects from these substances, but merely possible adverse effects at specified doses used in Norway.

According to information from the Norwegian Food Safety Authority (NFSA), CLAs are ingredients in food supplements purchased in Norway and NFSA has requested a risk assessment of the following doses of CLAs in food supplements: 3.0, 3.25 and 3.5 g/day.

The CLAs are mostly studied in overweight and obese subjects because of their claimed effects to reduce body weight.

CLAs constitute a group of isomeric fatty acids, mostly produced by bacterial fermentation, especially in ruminants, but also in humans. In dairy products the major CLA isomer is c9, t11 (rumenic acid) which accounts for reportedly 87% of CLAs whereas the isomer t10, c12, accounts for reportedly 4.5% (ANSES, 2011a). In the food supplements evaluated by EFSA (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b), Clarinol[®] and Tonalin[®], the t10, c12 and the c9, t11 isomers are present in about equal proportions. The predominant isomers of CLAs in food products with processed fats are t9, t11 and t10, t12, while the isomer c9,t11, accounts for only 5-8% (ANSES, 2011b). The various isomers may have different metabolic effects. In research articles, not all authors are consistent in reporting what they have studied, so in this report we sometimes do not distinguish between these isomers; hence they are referred collectively to as CLAs if it is not specified.

The daily intakes in Norway of CLAs range between 20 and 170 mg (MoBa 2008, version 4). The total intake of CLAs from other sources than food supplements is not included in this risk assessment.

2 Hazard identification and characterisation

2.1 Literature

In this risk assessment we have included previous risk assessments of CLAs by the Norwegian Institute of Public Health (FHI, 2003)(see Appendix 2), Statens næringsmiddeltilsyn (SNT, 2004) now NSFA from 2004, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (formerly known as AFSSA, now ANSES) in 2005 (AFFSA, 2005a; AFSSA, 2005b) and its two reports in 2011 (a,b) (ANSES, 2011a; ANSES, 2011b) as well as the European Food Safety Authority (EFSA) reports from 2010 and 2012 (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; EFSA, 2012); and articles retrieved from two literature searches. An additional search was conducted to ensure retrieval of studies with children and adolescents.

Previous risk assessments

2.1.1

Report by The Norwegian Institute of Public Health on adverse health effects upon use of CLAs. Norway, 2003

At request from SNT, the NIPH performed a risk assessment of of CLAs (available in Norwegian only (FHI, 2003), attached to the current report - Appendix 2. The report concluded that (i) intake of CLA supplements may adversely affect insulin resistance among obese men with the metabolic syndrome; (ii) the use of CLAs (in particular isomers c9t11 and t10c12) may alter the blood lipid-profile negatively; (iii) the use of CLA by lactating women may inhibit breast milk production and the fat content in the breast milk; and (iv) use of CLAs by pregnant women may reduce birth weight and growth of their offsprings. These conclusions were based on 19 publications originating in 12 supplementation-studies performed in humans. Based on animal experiments, the report also cautioned about the development of fatty-liver and increased insulin resistance and inflammation following CLA intake.

The basis for concern regarding insulin resistance (i) was an RCT by Risérus et al. (2002b) where 60 men with metabolic syndrome were randomised to one of three groups receiving 6 capsules/day of 3.4 g CLAs (isomer mixture), 3.4 g purified isomer t10,c12 CLA, or 3.4 g placebo (olive oil). The major isomer content of the CLA preparation (80% free fatty acids) was 35.9% t10, c12 CLA and 35.4% c9, t11 CLA. In the t10, c12 CLA preparation, it was 76.5% t10, c12 CLA and 11.4% 18:1n-9. Supplementation with t10, c12 increased significantly oxidative stress and inflammatory biomarkers. The oxidative stress seemed closely related to induced insulin resistance, suggesting a link between the fatty acid-induced lipid peroxidation and insulin resistance.

The basis for concern regarding lipid metabolism (ii) was mostly a randomised, double-blind controlled trial where obese men (n = 60) were treated with 3.4 g/day CLAs (isomer mixture), purified t10,c12 CLA, or placebo (Risérus et al., 2002a). The isomer t10,c12 reduced HDL cholesterol with 4% compared with placebo, whereas the CLA mixture lowered HDL cholesterol by 2%.

The basis for the concern regarding breastmilk composition (iii) was data from the cross-over-study on CLA supplementation to lactating women performed by Masters et al. (2002). Nine breastfeeding women participated in this double-blind, placebo-controlled, cross-over study. During each intervention period, women consumed 1.5 g of CLA supplement or placebo (olive oil) daily; during the washout period no supplements were consumed. The milk concentrations of the CLA isomers c9, t11 and t10, c12 were significantly greater during the CLA treatment period as compared to the placebo period. Milk fat content was significantly lower during the CLA treatment, as compared to the placebo treatment.

The concern (iv) on birth outcomes stemmed from data from Elias and Innis (2001) of 58 pregnant women at gestational week 35 and outcomes of their 70 infants at birth. They measured the CLA isomers c9, t11; t9, c11; c10, t12; and t10, c12. They reported that (1) CLA concentrations in infant phospholipids correlated with the same fatty acid in maternal plasma phospholipids; and (2) the infant plasma cholesteryl ester CLA and triacylglycerol CLA concentrations were all significantly and inversely related to the length of gestation and that the plasma concentration of infant cholesteryl ester CLAs was inversely related to infant birth weight and birth length; whereas (3) no significant relations were found between maternal plasma CLAs and the length of gestation or infant birth weight or length. Notably then, a direct link between maternal CLA intake and infant anthropometry at birth was not given.

Report by Statens næringsmiddeltilsyn on health risks of CLA products. Norway 2004

In 2004 an ad hoc scientific committee appointed by SNT evaluated the risk assessment quoted above on adverse effects by CLAs from the NIPH in 2003 (available in Norwegian only, attached to the current report) (FHI, 2003). The committee agreed on the conclusions made in the literature-review from 2003 and reiterated that (i) intake of CLA supplements (mainly the t10, c12 isomer) may adversely affect insulin resistance among obese men with the metabolic syndrome; (ii) the use of isomer c9, t11 of CLA by lactating women may inhibit breast milk production and the fat content in the breast milk; and (iii) use of CLAs by pregnant women may reduce birth weight and growth of their offsprings.

In addition the committee stated that animal studies were not of sufficient quality and/or relevance to be included in the risk assessment of use of CLAs in humans.

Opinion of the French Safety Agency (AFSSA) on a "safety assessment of the use of an oil enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLA)". France, 2005

In 2005, AFSSA published a benefit and risk assessment of trans fatty acids, including an assessment of CLA isomers (AFSSA, 2005a; AFSSA, 2005b). The AFSSA report referred to animal toxicity studies and human studies on the metabolism and toxicity, as well as on the role CLA isomers play in immunity and various pathological conditions: obesity, metabolic syndrome, cardiovascular disease and cancer. A summary of the report was translated to English, and our understanding of this AFSSA report is based solely on this short summary. AFSSA's main concern was that whereas the t10, c12 isomer is present in trace amounts in trans fatty acids of natural origin, the t10, c12 and the c9, t11 isomers are present in about equal proportions in commercial preparations included in e.g. food supplements. AFSSA (2005a); (AFSSA, 2005b) wrote that studies had found that the t10, c12 isomer was neutral or detrimental to blood cholesterol as risk markers, but no dose-effect was found. Moreover it was stated that the t10,c12 isomer decreased HDL-cholesterol, whereas it increased very low density lipoproteins and C-reactive protein levels as well as increased the non-enzymatic peroxidations.

EFSA Scientific opinion on the safety of the "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil" Clarinol[®] as a Novel Food ingredient. EFSA, 2010

Following an application the European Commission in 2010 requested EFSA to evaluate the safety of Clarinol[®], an oil with approximately 80% CLAs 1:1 mixture of c9, t11 and t10, c12 isomers (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b). A user-dose of 3.75 g Clarinol[®] (corresponding to 3 g CLAs) was suggested by the applicant who also provided documentation about safety concerning Clarinol[®]. EFSA estimated that this would represent a six-fold increase of the intake of c9, t11 and a 50-fold increase of the t10, c12 isomer. EFSA concluded, based on the provided documentation, that intake of 3.75 g Clarinol[®] per day for up to six months was safe (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b).

The EFSA opinions evaluated animal studies including acute toxicity studies, several subchronic and chronic toxicity studies, genotoxicity, reproductive and developmental toxicity studies.

O'hagan and Menzel (2003) performed a subchronic (13-week) feeding study in male and female Wistar outbred (CrI: (WI)WU BR) rats (20 rats/sex/group) using Clarinol[®]G80. The test material contained approximately 79% CLA isomers, including equal amounts of the c9, t11 and t10,c12 CLA isomers in the form of glycerides. In this study, based on liver enlargement and hepatocellular hypertrophy and on the effects on blood insulin concentrations, the authors considered the NOAEL to be 5% CLA-rich oil in the diet, equivalent to 2433 and 2728 mg/kg bw per day for males and females, respectively.

EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) considered it unlikely that Clarinol[®] CLA-rich oil elicits allergic reactions. With respect to subjects with type-2 diabetes, the EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) considered that the provided evidence did not establish the safety of 3 to 6 g per day of

CLAs because of reported adverse effect on surrogate markers of insulin sensitivity as well as on fasting blood glucose, and no studies on long-term blood glucose control (e.g. HbA1c) were available. Moreover EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) considered that the data presented suggested an increase in lipid peroxidation as a result of cyclo-oxygenase-mediated inflammation and oxidative stress associated with the consumption of the CLAs 1:1 mixture. Notably, EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) wrote that the effects of CLAs on insulin resistance and on markers of cardiovascular risk appeared to be species-dependent, and hence the results were difficult to extrapolate from animal studies to humans.

Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) on a "safety assessment of the use of an oil enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLAs)". France, 2011(a)

ANSES (2011a) raised concerns about the conclusions in the EFSA opinion from 2010 and use of CLAs since the long-term safety in humans has not been established. Specifically ANSES (2011a) cautioned that CLA consumption could increase insulin resistance and markers of oxidative stress.

Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES) on the "assessment of the risks associated with substances with nutritional or physiological effects with a view to restricting or prohibiting their use in food stuffs". France, 2011(b)

Similar to ANSES (2011a), the ANSES (2011b) opinion raised concerns about the use of CLAs since the long-term safety in humans has not been established, in particular regarding the t10,c12 isomeric form of CLAs. Specifically ANSES (2011a) and ANSES (2011b) cautioned that CLA consumption could have an atherogenic effect, increase insulin resistance and markers of inflammation, oxidative stress and vascular function. This caution was based on the following data retrieved from the literature in addition to those found in the EFSA opinion (2010):

Atherogenic effect: A decrease in HDL-cholesterol (4 to 14%) after 8 to 12 weeks of supplementation (3.4-5.5 g/day) with a mixture of c9, t11 and t10,c12 or supplementation with t10,c12, was found in 3 RCTs.

Diabetogenic effect: The insulin sensitivity measured using a euglycemic clamp was reduced by 19% after 12 weeks of supplementation (3.4 g/day) with the t10, c12 isomer.

Effect on markers of inflammation: Induction of lipid peroxidation was more pronounced after 12 weeks of supplementation (3.4 g/day) with the t10, c12 isomer than after 12 weeks of supplementation with the mixture, increased C-reactive protein and plasminogen activator inhibitor-1 levels were observed after 16 weeks of supplementation with the mixture of the two isomers, but not with the c9, t11 isomer.

Effect on oxidative stress: A mixture of c9,t11 and t10,c12 isomers in vitro was associated with an increase in the synthesis of reactive oxygen species and isoprotane production by macrophages.

Effect on endothelial function: Decreased production of nitric oxide was observed in vitro by each of the two isomers.

EFSA (2012) Statement on the safety of the "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oils" Clarinol® and Tonalin® TG 80 as Novel Food ingredients. EFSA, 2012

The EFSA updated its opinion from 2010 on the safety of using Clarinol® and also included another CLA-rich oil, Tonalin® TG 80. Additional information was provided by Member States to the European Commission. The requested daily doses were 3.75 g Clarinol® and 4.5 g Tonalin® TG 80, corresponding to approximately 3 and 3.5 g of CLAs, respectively. EFSA (2012) concluded, based on this additional information, that the safety of Clarinol® and Tonalin® TG 80 had been established for these daily doses for up to six months. EFSA (2012) wrote: These conclusions were based on the following considerations:

1. The administration of CLAs to normal weight, overweight and obese non-diabetic subjects did not appear to have adverse effects on insulin sensitivity, blood glucose control or liver function at the proposed conditions of use for up to six months.
2. The effects of CLA consumption over periods longer than six months on insulin sensitivity and liver steatosis had not been adequately addressed in humans.
3. CLAs appeared to adversely affect both static and dynamic surrogate markers of insulin sensitivity as well as fasting blood glucose concentrations in subjects with type-2 diabetes and no studies on blood glucose control (e.g., HbA1c) were available for periods of consumption beyond eight weeks in this population subgroup.
4. Under the proposed conditions of use, CLAs was considered to have no effect on (low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol) concentrations or the LDL:HDL-cholesterol ratio, and the magnitude of the changes observed in HDL- and triglyceride concentrations were unlikely to have an impact on coronary vascular disease risk.
5. The observed increase in plasma and urinary concentrations of isoprostanes, which may indicate an increase in lipid peroxidation, and the increase in some markers of subclinical inflammation (i.e., 15-keto-dihydroprostaglandin F2 and possibly CRP) associated with CLA consumption, together with the limited data available on the effects of CLAs on vascular function, were considered to indicate a potential for vascular damage (i.e., atherosclerosis) in the longer term, and no data on effects of CLA intake on the arterial wall had been provided in humans.

The safety of CLA consumption by type-2 diabetic subjects had not been established. In EFSA (2012) there is no information about safety of consumption of CLAs alone; the

statement concerns the consumption of CLAs as part of the two products Clarinol® and Tonalin® TG 80. (EFSA, 2012) thus concluded that use of 3.75 g Clarinol® (corresponding to 3.0 g CLAs) and 4.5 g Tonalin® (corresponding to 3.5 g CLAs) was safe for use up to 6 months.

Literature search

Three literature searches were performed in order to retrieve publications on adverse effects caused by CLAs.

The first literature search, performed in MEDLINE and EMBASE 9 October 2014, focused on meta-analyses, systematic reviews and RCTs, but also included some animal studies (only publications combining animal and human studies) and was conducted to retrieve an overview of existing literature.

The search included various terms for CLAs, food supplements and adverse effects. The search terms used are presented in Appendix I. The search period was limited to publications from 2000 to 2014, and the search was further limited to include publications written in English, Danish, Swedish or Norwegian.

The second search, conducted in MEDLINE, EMBASE, Global Health and Web of Science 3 March 2015, aimed to focus more particularly on adverse effects of CLAs. The search included the term CLA (in title) and furthermore, a term for adverse effects had to be adjacent to a term for CLA separated by maximum three words. Conference abstracts, letters and editorials were excluded, but no limitations were conducted for time span. For view of the search terms used, see Appendix I. When writing the risk characterisation and conclusions for children and adolescents, it was considered that an extra literature search for children and adolescents was needed. This search was performed 18 June 2015. The strategy for this search is also included in Appendix 1.

2.1.3

Publication selection and data extraction

The study types for inclusion in this opinion were human and some animal studies. The criteria for inclusion were:

- CLAs in relation to adverse effect must be addressed in the abstract of the paper
- Oral route of exposure to CLAs in human studies
- Human studies are performed in apparently healthy individuals or patient groups assumed to have normal CLA absorption and metabolism
- Animal model studies addressing adverse effects relevant to human health

Studies were excluded if the result could be affected by other substances. Furthermore, in vitro studies, case reports and textbook chapters were excluded.

The literature search in October 2014 identified 95 articles. The additional search in March 2015 identified 49 articles (one of these was also identified in search 1). The third search specified for children and adolescents identified 15 studies.

After independent reviews of study titles and abstracts in a primary screening by two experts according to the above mentioned criteria, inclusion was discussed in a meeting and a consensus was reached about which publications should be reviewed in full text. The 31 full text articles that passed the primary screening were retrieved for a secondary screening. In this screening, the full text articles were reviewed and compared against the same inclusion criteria. The secondary screening was performed by the author of this report and resulted in a total of 20 publications (see Figure 2.1.3-1).

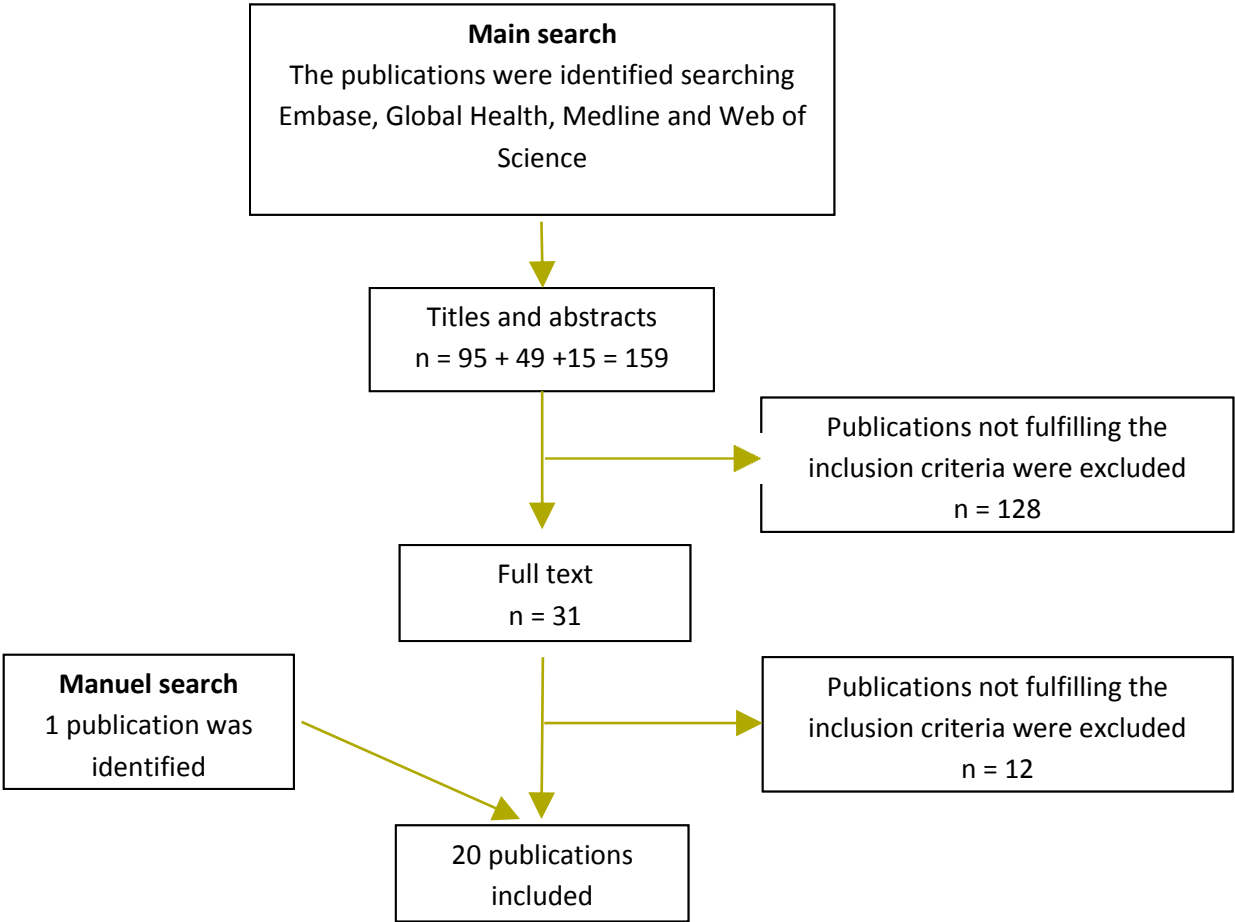


Figure 2.1.3-1: Flow chart for publication selection for CLA literature searches.

2.2 General information

Chemistry

The CLAs are isomeric fatty acids, the two most common being C18:2 c9, t11 and C18:2 t10, c12. The CAS numbers are 2420-56-6 and 121250-47-3, respectively.

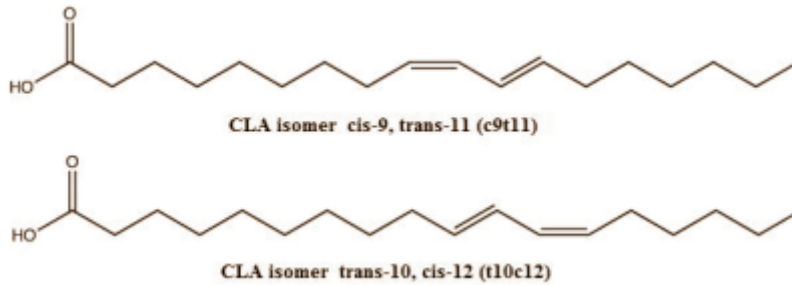


Figure 2.2.1-1: Structural formula of the two most common CLA isomers.

Occurrence

2.2.2

In humans, the CLAs are produced by bacterial fermentation of linoleic and alpha-linolenic acids in the gut. In the human diet, meat (mainly isomers c9, t11 and t10, c12) and dairy products (mainly isomer c9,t11) are main natural sources of CLAs. In addition CLAs are available in various food supplements.

In dairy products the major CLA isomer is c9, t11 (rumenic acid) and accounts for 87% of CLAs whereas the isomer t10, c12, accounts for 4.5% (ANSES, 2011a). In the food supplements evaluated by EFSA (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b), Clarinol[®] and Tonalin[®], the t10, c12 and the c9, t11 isomers are present in about equal proportions. The predominant isomers of CLAs in food products with processed fats are t9, t11 and t10, t12, while the isomer c9,t11, accounts for only 5-8% (ANSES, 2011b). As the lipid fraction in milk is composed mainly (97%) by triacylglycerols (TAGs), most CLAs in milk and dairy products are TAG-bound. Synthetic CLAs in food supplements may contain various isomers and be TAG bound or as free fatty acids. Clarinol[®] and Tonalin[®], which were evaluated by EFSA, contain approximately 1:1 c9, t11 and t10, c12 isomers (ANSES, 2011b; EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; EFSA, 2012).

2.3 Absorption, distribution, metabolism and excretion

In mammals, CLAs are absorbed and distributed to the various organs of the body similar to other lipid compounds. Briefly, CLAs are incorporated into micelles in the gut lumen, and then taken up by the gut epithelium, transported by the lacteals to the systemic circulation. Then they are blood-borne to organs and tissues.

The CLAs, like other fatty acids, are subjected to beta-oxidation. Though, some of the metabolism of CLAs apparently is isomer-specific: For example in rats the c9, t11 isomer reportedly interfered with antioxidants and decreased proinflammatory markers (Mollica et al., 2014); those effects were not observed with the t10,c12 isomer. Moreover, the incorporation of these two CLA isomers into rat liver cells differed apparently also, with c9, t11 being preferentially taken up by the liver (DeGuire and Weiler, 2013).

The transport of CLAs in plasma is similar to that of other fatty acids.

The few human studies that deal with CLA metabolism confirm a different metabolism of the two major CLA isomers. Only the c9,t11 isomer is found above the detection limit in plasma of healthy subjects consuming 1.4 g per day of a CLAs 50:50 mixture for six months (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; EFSA, 2012).

After crossing placenta, CLAs seem to be more concentrated in the foetal plasma than in the maternal plasma (AFFSA, 2005a; AFSSA, 2005b).

2.4 Adverse effects

Human studies

2.4.1

Table 2.4.1-1 summarises the results of the literature search, and in 2.4.1.1 is a more in-depth description of the various studies. Notably, very few studies had adverse effects as end points, and many data concerning adverse effects are poorly detailed and often stem from oral, non-structured questions posed to the study participants.

Table 2.4.1-1: Overview of human studies investigating CLAs and adverse health effects. There are few studies with adverse effects as the primary end points, and the methods for evaluating such effects either lack or are inadequately described.

Reference	Participant characteristics	Country	Number in study groups		Doses	Main end points	Duration of intervention	Adverse effects
			CLA	Control				
RCTs								
Chen et al. (2012)	Healthy subjects, men and women with BMI between 24 and 35 kg/m ² , 18-60 years	China	30	33	1.7 g/day	BMI and body composition	3 months	No significant differences in GI-symptoms or liver enzymes (glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase) or lipids (triglycerides, HDL/LDL) between CLAs and placebo
Sluijs et al. (2010)	Healthy volunteers, overweight and obese, men and women, 40-70 years	The Netherlands	173	173	4.6 g/day	Aortic stiffness	6 months	No significant difference in adverse effects, lipids, glucose, insulin or CRP between CLAs and placebo

Reference	Participant characteristics	Country	Number in study groups		Doses	Main end points	Duration of intervention	Adverse effects
			CLA	Control				
Racine et al. (2010)	Overweight/obese children 6-10 years	USA	28	25	3 g/day (1:1 c9,t11 and t10,c12 isomers)	Change in body fat and BMI	7 months	No significant difference in adverse effects or blood biomarkers (LDL, liver enzymes, insulin, glucose) between CLAs and placebo. HDL decreased significantly in CLA group compared to controls.
Tholstrup et al. (2008)	Postmenopausal (about 55-65 years), healthy women	Denmark	CLA mixture: 24 and CLA milk: 24	26	5.5 g/day	Biomarkers of risk	4 months	Increased levels of risk markers for cardiovascular disease in those given the CLA mixture, but not in those given CLA milk
Gaullier et al. (2007)	Healthy volunteers, men and women, BMI 28-32 kg/m ² , 18-65 years	Norway	42	41	3.4 g/day	Body composition	6 months	No significant difference in adverse effects between CLAs and placebo
Iwata et al. (2007)	Healthy volunteers, men, BMI 25-35 kg/m ² , aged 25-60 years	Japan	20x2	20	3.4 and 6.8 g/day	Short term safety	3 months	Adverse effects were present in 30% of the placebo, 60% in the low and 70% in the high CLA (data not shown in paper). These effects were time-limited and consisted mostly of headache, fever, diarrhea, cough, abdominal distension
Laso et al. (2007)	Healthy volunteers, men and women, BMI 25-35 kg/m ² , 35-65 years	Spain	42	41	3.0 g/day	Body composition	3 months	No significant difference in adverse effects between CLAs and placebo
Watras et al. (2007)	Healthy women aged 18-44 years, BMI between 25 and 30 kg/m ²	USA	22	18	3.2 g/day	Weight gain	6 months	No significant difference in adverse effects or biomarkers of lipid-, carbohydrate metabolism and liver function between CLAs and placebo
Pinkoski et al. (2006)	Healthy volunteers, men and women, mean age 23-27	Canada	38	38	5 g/day	Body composition	7 weeks	No significant difference in adverse effects between CLAs and placebo
Larsen et al. (2006)	Healthy volunteers, BMI <28 kg/m ² , aged 18-65 years, men and women	Denmark	51	50	3.4 g/day	Body composition	1 year	No significant difference in adverse effects or indexes of insulin resistance between CLAs and placebo
Taylor et al. (2006)	Healthy volunteers, BMI <27 kg/m ² , men aged 35-60 years	UK	21	19	4.5 g/day	Endothelial function	3 months	CLAs worsened significantly biomarkers of endothelial function

Reference	Participant characteristics	Country	Number in study groups		Doses	Main end points	Duration of intervention	Adverse effects
			CLA	Control				
Gaullier et al. (2005)	Healthy volunteers, men and women, BMI 28-32 kg/m ² , 18-65 years	Norway	CLA-TAG 93	41	3.4 g/day	Body composition	2 years	No significant occurrence in adverse effects; plasma total cholesterol and LDL cholesterol were significantly reduced, whereas HDL cholesterol and triglycerides were unchanged
Gaullier et al. (2004)	Healthy volunteers, men and women, BMI 25-30 kg/m ² , 18-65 years	Norway	CLA-FFA 61 CLA-TAG 60	59	CLA-FFA: 3.6 g/day CLA-TAG: 3.4 g/day	Body composition	1 year	No significant difference in adverse effects between CLAs and placebo
Masters et al. (2002)	Healthy breastfeeding women 1-10 months post partum	USA	9 (cross-over study)	9	1.5 g/day CLA in olive oil	Breastmilk volume and fat content	5+7+5 days	Decreased fat content in milk and reduced milk production
Basu et al. (2000)	Healthy volunteers, men and women, aged 23-63 years	Sweden	28	25	4.2 g/day	Peroxidation	3 months	CLAs induced both non-enzymic and enzymic lipid peroxidation
Berven et al. (2000)	Healthy overweight/obese (BMI 27.5-39 kg/m ²), aged 46-47 years	Norway	25	22	3.4 g/day	Safety	3 months	No significant difference in adverse effects or biomarkers between CLAs and placebo
Meta-analyses, reviews								
Dilzer and Park (2012)	Healthy volunteers, overweight and obese				0.5 - 7 g/day		< 2 years	No adverse effects observed in human subjects, possible adverse effects on biomarkers not clarified
Onakpoya et al. (2012)	Healthy volunteers, overweight and obese				2.4 – 6.0 g/day		Minimum 6 months	Reports of CLA-induced adverse effects (constipation, diarrhea)
Silveira et al. (2007)	Healthy volunteers, overweight and obese				0.7-6.8 g/day	Body composition, metabolism, liver and muscle function	Maximum 6 months	Reports of CLA induced adverse effects (lipid- and glucose metabolism)
Larsen et al. (2003)	Humans and rodents				Humans: 1.7-3.9 g/day Rodents: Equivalent to 130 g/day for humans		Humans: 2-3 months	Reports of CLA induced adverse effects in both humans and rodents (liver hypertrophy, glucose metabolism, milk composition)

2.4.1.1 Randomised controlled trials (RCTs)

In a randomised, double-blind, placebo-controlled trial by Chen et al. (2012), subjects with a BMI of 24 to 35 kg/m² randomly received 1700 mg of c9, t11 and t10, c12 CLAs (n=30) or placebo (salad oil; n=33) in 200 mL of sterilised milk twice daily for 12 weeks. Ten participants reported adverse effects (CLA group, n=3, 10%; control group, n=7, 21.2%). There was no significant difference in the percentage of gastrointestinal (GI) symptoms between the two groups. No serious adverse effects were reported. The levels of liver enzymes (glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase) and lipids (triglycerides and LDL-cholesterol), increased, whereas those of HDL-cholesterol decreased after 3 months of CLA treatment. The changes in these levels were slight, within the normal range, and not significantly different from the baseline values.

In an RCT testing 4.6 g CLAs daily for 6 months on aortic stiffness, Sluijs et al. (2010) did not find any effect of supplementation with CLAs. In total, 188 adverse events were reported by 102 subjects in the CLA group and 170 adverse events by 94 subjects in the placebo group, without a statistically significant difference. Seven severe adverse events were reported in the CLA group and 8 severe adverse events in the placebo group. All severe adverse events were judged by the authors to be unrelated to the use of CLAs. There were no significant differences between the CLA and placebo groups regarding lipids (triglycerides, HDL/LDL), glucose, insulin or CRP.

Racine et al. (2010) tested the effect of 3 g/day CLA supplement with 1:1 mixture of the isomers c9, t11 and t10, c12 on change in body fat and BMI among overweight/obese children in an RCT (28 in the intervention and 25 in the control group) lasting 7 months. Although some gastrointestinal symptoms were reported, no significant difference was detected among the intervention- and control groups. Data of blood chemistry did not reveal any significant differences between the two study groups in the levels of LDL, liver enzymes, insulin, or glucose. HDL decreased significantly in the CLA-group only.

Tholstrup et al. (2008) studied the effect of CLAs (intervention with CLAs either as isomeric mixture or as milk) on biomarkers of inflammation and oxidative stress in an RCT with postmenopausal women given 5.5 g of CLAs daily for 4 months. Both CLA supplements increased lipid peroxidation measured as urinary free 8-iso-prostaglandin F_{2α}. Inflammatory risk markers (interleukin-6, tumor necrosis factor-α) in blood were not affected.

In their RCT testing 3.4 g/day of CLAs for 6 months, Gaullier et al. (2007) reported adverse events by 37% of all randomised subjects, with similar frequencies in both study groups. Of 58 single events, the investigators considered five of them related to supplementation (4 in the CLA group and 1 in the placebo group). Of these, one event (diarrhea) was classified as "probable" and the rest as "possible". All adverse events were rated as either "mild" or "moderate", and most often occurred within the gastrointestinal and musculoskeletal systems. Two subjects (1.7% of the total) left the trial due to adverse events, one case of incidentally discovered breast cancer considered unrelated to supplementation, and one case of constipation "possibly" related to CLA supplementation. One male subject suffered an

acute myocardial infarction of moderate severity. This was considered as "possibly" related to supplementation. However, the subject rejoined the study a short time after recovery and completed it according to the protocol. One subject suffered a rash that was not judged to be related to supplementation.

In their RCT testing safety after 3 months exposure to two different doses (3.4 and 6.8 g/day) of CLAs from food supplements, Iwata et al. (2007) reported mild to moderate adverse events (diarrhea, abdominal distension, headache, fever) in 20% in the placebo and 60% and 70% in the low and high dose CLA groups. They did not detail how these adverse events were monitored. Blood pressure and heart rate did not differ between the 3 groups. No statistically significant differences were observed regarding a wide range of blood parameters (including biomarkers of liver function, glucose- and lipid metabolism as well as bone marrow function).

In their RCT testing the effect of 3 g CLAs daily from food supplement for 3 months, Laso et al. (2007) reported that CLA supplementation was not associated with any adverse effects or biological changes in blood variables and hemodynamic variables.

Watras et al. (2007) reported no adverse events or change in blood biomarkers of lipid metabolism (HDL, LDL, triglycerides), carbohydrate metabolism (glucose, insulin) or liver enzymes (transaminases, bilirubin) in their RCT testing supplements of 3.2 g/day of CLAs to healthy women for 6 months to reduce weight gain during holidays.

Pinkoski et al. (2006) tested the effect of combined 5 g daily supplement of CLAs and physical training for 7 weeks in a RCT. Among the 38 subjects in the intervention- and the 38 subjects in the control group, 8 and 7, respectively, reported mild to moderate adverse effects (gastrointestinal discomfort and heartburn), but with no significant difference in the number of adverse effects between the two study groups. No biomarker for lipid- or carbohydrate metabolism was included.

In the RCT of Larsen et al. (2006) testing the effect of supplementing 3.4 g/day CLAs for 1 year, a total of 563 adverse events were reported, but with no significant difference between the two groups. Urine analyses, electrocardiogram registrations, systolic and diastolic blood pressures, and heart rates did not uncover any other abnormal observations in any of the study groups. CLAs did not significantly affect fasting values of plasma glucose or insulin, and insulin resistance was also not affected. In addition to the safety variables, they assessed a panel of hormones (testosterone, growth hormone, insulin-like growth factor-1, and thyroid stimulating hormone), but CLA treatment did not significantly affect any of these hormones.

Taylor et al. (2006) found in their RCT that 4.5 g CLAs daily for 3 months worsened endothelial function assayed as decreased flow-mediated dilatation by measuring perfusion of the brachial artery using an ultrasound method. A decrease in dilatation may indicate a dysfunctional vessel.

In their open extension study of their RCT, Gaullier et al. (2005) found after a total of 2 years that adverse events were reported by 50% of all randomised subjects with similar frequencies in the 3 study groups. Notably all intervention subjects received CLAs as triacylglycerol in this open study (3.4 g/day). Of 124 single events, 7 adverse events were considered to be drug-related, and all were rated as "mild". Three of these subjects (2.2% of the total number of subjects) left the trial due to adverse events. The most frequently reported drug-related adverse events were various gastrointestinal complaints. Eight subjects had serious adverse events during the extension period, but all of them were judged to be unrelated to the use of CLAs. Plasma total cholesterol and LDL cholesterol were significantly reduced, whereas HDL cholesterol and triglycerides were unchanged.

In another RCT by Gaullier et al. (2004) supplementation of CLAs combined with a mixture of different free fatty acids (3.6 g/day) or TAG (3.4 g/day) was given for 1 year. LDL increased in the free fatty acid group, HDL decreased in the TAG group, and lipoprotein(a) increased in both groups compared with values at baseline. Fasting blood glucose concentrations remained unchanged. In conclusion, adverse events were reported by 68% of all randomly assigned subjects and with similar frequency in all 3 study groups. Of 264 single events, the investigators considered 30 to be drug-related. The drug-related adverse events were evenly distributed among the 3 study groups. All adverse events were rated as either "mild" or "moderate", and the symptoms were transient. Ten subjects (5.5% of the total) left the study because of musculoskeletal ailments or GI symptoms such as abdominal discomfort, diarrhea, or nausea. The gastrointestinal events were judged by the study investigators as probably related to the tested drug. Abdominal discomfort or pain, loose stools, and dyspepsia were the most frequently reported drug-related adverse events.

Masters et al. (2002) performed a cross-over RCT among nine healthy breastfeeding women 1-10 months post partum. The intervention periods lasted each five days separated by a washout period for seven days. They consumed about 1.5 g CLAs in olive oil, containing approximately 560 mg of the t10, c12-18:2 isomer and 547 mg of c9, t11 isomer, and 93 mg of various other CLA isomers. Whereas the breastmilk content of fat was reduced, no change in breastmilk volume was detected between intervention- and control-periods.

In a double-blind controlled trial by Basu et al. (2000) in 53 healthy subjects who were supplemented with CLAs (4.2 g/day) or a corresponding amount of a placebo preparation containing olive oil for 3 months, no participants experienced any side effects during the study period. However, an increase ($p < 0.0001$) of both 8-iso-PGF_{2α} (prostaglandine F-2α) and 15-keto-dihydro-PGF_{2α} in urine (two markers of lipid peroxidation) was observed after 3 months of daily CLA intake as compared to the control group.

Berven et al. (2000) tested the effect of supplementing 3.4 g/day CLAs on overweight/obese volunteers for 12 weeks in a RCT. No difference in adverse events or other safety parameters (quality of life, blood parameters) was found between the treatment and placebo groups.

2.4.1.2 Other human trials

Dilzer and Park (2012) wrote a non-systematic review focusing on possible beneficial effects on consumption of CLA in various forms. They reported on a wide range of biomarkers of immune-, glucose- renal and liver-metabolism. Concerning safety of CLA use they wrote: "When high quality CLA preparations (containing approximately 80–90% of the 2 biologically active isomers: *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 CLA) are consumed in a range of 0.5 to 7 g/day no adverse effects were observed in human subjects."

Onakpoya et al. (2012) reported mostly constipation and diarrhea as adverse effects in their systematic review and meta-analysis of RCTs testing CLAs.

In their non-systematic review on the possible deleterious effects of CLAs on lipid and glucose metabolism including insulin sensitivity, Silveira et al. (2007) quoted several contradictory reports on markers of these metabolic aspects upon use of CLAs (typically with daily doses of about 3 g). However, Silveira et al. (2007) cautioned against the use of CLA supplements containing high quantities of the t10, c12 isomer, especially in obese patients with type 2 diabetes or the metabolic syndrome.

Larsen et al. (2006) reviewed CLAs exposure data in human studies reporting data usually including 20-80 subjects consuming between 1.8 to 8 g of CLAs daily for one to six months. In this, non-systematic review the authors cautioned that CLAs might induce liver hypertrophy and insulin resistance. Moreover, they found support for this conclusion in data from rodents as well.

2.4.1.3 Interactions, allergic sensitisation and adjuvant effects

There was no information concerning interactions with other substances in the literature reviewed in the present risk assessment. The absence of information in the selected literature does not document an absence of interactions.

There was little information concerning allergic sensitisation or allergy adjuvant effects in the literature reviewed in the present risk assessment. The scarce information in the selected literature does not document an absence of allergic sensitisation or allergy adjuvant effects.

According to the applicant in the EFSA 2010 opinion, the purification and refinement steps involved in the production of Clarinol[®] CLA-rich oil ensure that only minor amounts (30 mg/kg) of lipases or other proteins (from safflower) are present in the final product. For three batches protein contents of 9, 19 and 28 mg/kg, respectively, have been reported.

2.4.2 Safflower is not known as a source associated with allergenic proteins. The EFSA panel considers it unlikely that Clarinol[®] CLA-rich oil elicits allergic reactions.

Animal studies

Relevant animal studies from previous risk assessment have been evaluated.

Scimeca (1998) fed 20 male Fischer 344 rats (5 to 6 weeks old) with 1.5% CLAs in the diet for 36 weeks. Compared with 20 rats fed a control diet, no adverse effects were noted for body weight, cageside examination and histopathology of 10 different organs.

Larsen et al. (2003) reviewed CLA exposure data in hamsters, mice and rats. In this non-systematic review the authors cautioned that CLAs might induce liver hypertrophy and insulin resistance via a redistribution of fat deposition that resembles lipodystrophy, thus corroborating their results obtained from human studies in the same review-article.

Notably, in their 2004- evaluation Statens næringsmiddeltilsyn concluded that animal studies were not of sufficient quality and/or relevance to be included in a quantitative risk assessment of use of CLAs in humans (SNT, 2004). In support of this EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) wrote that the effects of CLAs on insulin resistance and on markers of cardiovascular risk appeared to be species-dependent, and hence the results were difficult to extrapolate from animal studies to humans. AFFSA (2005a) and AFSSA (2005b) quoted animal data cautioning that it is necessary to take into account the adverse hepatic effects (steatosis) of the t10,c12 isomer in animals, even if they occurred at a high dose (0.5 g/kg bw per day). In addition to these hepatic effects, lipotrophic extrahepatic effects had also been observed.

The EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) opinions quoted the studies of Park et al. (2005) and O'hagan and Menzel (2003). The effects of long-term feeding of CLAs were examined in Fischer 344 rats by Park et al. (2005). Weanling male rats were administered either a control diet (n=10) or a diet containing 1% CLAs (41.9% c9,t11 and 43.5% t10,c12; n=11; level of intake equivalent to a dose of approximately 1000 mg CLAs/kg bw per day) for a period of 18 months. Blood glucose concentrations were significantly lower in the CLA-fed group compared to controls after about 70 weeks. Blood urea nitrogen and cholesterol concentrations were elevated beyond the normal range in both groups, but were not significantly different between groups. At necropsy there were no significant differences between the groups in organ weights. Microscopic analysis showed that all animals from both groups had chronic renal diseases (chronic interstitial nephritis, nephrosis, and/or glomerulosclerosis). The chronic renal disease was explained by the authors as a side effect of the high protein content of the diets and was not considered to be CLA-related. One of the CLA-fed animals had an enlarged spleen, which was diagnosed as granular cell lymphoma. The incidences of pituitary or testicular tumors, prostatitis, lymphoma and other disorders were not significantly different between the groups. In their 2010 opinion, EFSA stated that the use of male animals only, the testing of a single dose of CLAs, the limited number of animals available for the specific toxicological examinations, and the occurrence of severe renal disease in all animals greatly limited the relevance of this study.

In the rat study (O'hagan and Menzel, 2003) the authors suggested a NOAEL of 5% CLA-rich oil (Clarinol™ G80), equivalent to 2433 and 2728 mg/kg bw per day for males and females, respectively. Higher doses resulted in liver hypertrophy and increased plasma insulin

concentrations. However, the authors considered the NOAEL of 5% Clarinol™ G80 as conservative.

Effects of CLAs on blood lipids as biomarkers of cardiovascular disease

2.4.3 The effects of CLAs on the blood levels of various lipids have been of particular concern in many studies, presumably due to a possible pro-atherogenic effect.

FHI (2003) concluded that since CLA isomers c9, t11 and t10, c12 are trans fatty acids, a reduction of HDL cholesterol as a result of CLA supplementation in human studies also indicate that these products may have a negative effect on the lipid profile.

The SNT (2004) evaluation quoted human studies showing reductions in HDL cholesterol concentrations, however with not significant difference between intervention- and control-groups.

AFFSA (2005a), AFSSA (2005b) quoted studies showing that the t10, c12 isomer was neutral or detrimental to blood cholesterol as risk markers, but no dose-effect was found. Moreover it was stated that the t10, c12 isomer decreased HDL-cholesterol, whereas it increased very low density lipoproteins.

The EFSA (2010 a); EFSA (2010 b); EFSA (2012) opinion concluded that the effects of CLAs on markers of cardiovascular risk appeared to be species-dependent, and hence the results were difficult to extrapolate from animal studies to humans. EFSA (2010) wrote: "In conclusion, studies on the effects of CLA on insulin and glucose metabolism have been conducted both in vitro and in animal models. In vitro data suggest that the t10, c12 CLA isomer is involved in the regulation of fatty acid synthesis, the reduction of fat in adipocytes and the reduction of insulin sensitivity. Mice seem to be particularly sensitive to the effects of CLA on fat metabolism and are also a sensitive species with regard to insulin sensitivity. The extents of the effects of CLA on insulin resistance and also on markers of cardiovascular risk appear to be species-dependent, and at present results are difficult to extrapolate from animal studies to humans. Therefore the focus of the safety assessment needs to rely mainly on human studies and should include those parameters which were most affected in animal studies."

2.4.4 ANSES (2011b) quoted several studies showing a decrease in HDL-cholesterol (4 to 14%) after 8 to 12 weeks of supplementation (3.4-5.5 g/day) with a mixture of c9, t11 and t10, c12 or supplementation with t10, c12.

Mode of action for adverse effects

No definite modes of action have been identified.

Vulnerable groups

CLA supplementation to lactating mothers may cause reduced milk production and reduced content of milk fat according to data from the cross-over-study on CLA supplementation to lactating women performed by Masters et al. (2002). Use of CLAs by pregnant women may reduce birth weight and -length of their off-springs according to Elias and Innis (2001) and cited in (FHI, 2003) (Appendix 2).

In some of the RCTs, the study populations have included overweight and/or obese, classified according to their BMI-values. Most of these studies did not report any differences in adverse effects between the CLA-supplemented and the control groups (see Table 2.4.1-1). However, previous reports have cautioned about the use of CLAs among obese men with the metabolic syndrome due to an increase in markers of insulin resistance and inflammation/cardiovascular disease (Risérus et al., 2002b).

In the RCT by Racine et al. (2010) on the effect of CLA supplementation to overweight/obese children, no significant differences in adverse effects or biomarkers were detected between the CLA-supplemented and the control groups, with the exception that HDL decreased significantly more in the CLA-group.

There is insufficient data to conclude about possible adverse health risks among elderly (> 65 years) who consume CLA supplements.

2.5 Summary of hazard identification and characterisation

Most of the cited studies from the literature searches have tested supplemental CLAs in doses of about 3.5 g/day, ranging from 0.7 to 6 g/day. Many of these have been of short duration, and the intervention periods have been from days and weeks up to 2 years. The study groups have mostly been adults with overweight and obesity.

Only one study in children has been identified. Racine et al. (2010) tested 3 g/day CLA supplement (1:1 mixture of the isomers c9,t11 and t10,c12) on change in body fat and BMI among overweight/obese children in an RCT lasting 7 months. Data of blood chemistry did not reveal any significant differences between the two study groups in the levels of LDL, liver enzymes, or insulin, or glucose whereas HDL decreased significantly in the CLA-group only. . Notably, this RCT was conducted on children who were either overweight or obese, and the age-range included was limited (6-10 years). Hence, this RCT alone cannot form the basis for any conclusion about healthy children in general by VKM in the present report.

The FHI (2003) (Appendix 2) concluded that intake of CLA supplements (mainly the t10,c12 isomer) may (i) adversely affect insulin resistance among obese men with the metabolic syndrome, (ii) that use of CLAs by pregnant women may reduce birth weight and -length of their off-springs, and (iii) that use of CLAs by lactating women may reduce their milk production and the fat content of their milk. These conclusions were supported in the SNT evaluation from 2004 (SNT, 2004) (Appendix 2).

The EFSA opinions from 2010 concluded that a dose up to 3.0 g/day for up to six months of CLA supplementation was apparently safe for use in adults (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b). In 2012 EFSA updated the 2010 opinion and additionally included an evaluation of the safety of consuming the CLA-rich supplement Tonalin® TG 80 at a dose of 4.5 g corresponding to 3.5 g/day of CLAs (EFSA, 2012). The EFSA 2012 statement concluded that it was safe to use this supplement for up to six months. In the EFSA (2012) statement there is no information about safety of consumption of CLAs alone; the statement concerns the consumption of CLAs as part of the two products Clarinol® and Tonalin® TG 80. The EFSA (2012) statement concluded that the safety of 3.75 g Clarinol® (corresponding to approximately 3 g CLA) and 4.5 g Tonalin® TG 80 (corresponding to approximately 3.5 g CLA) had been established for these daily doses for up to six months. Additional data reviewed in this VKM report have not invalidated this conclusion.

Concern regarding insulin resistance in obese men with metabolic syndrome was stated in reports from ANSES (2011a); ANSES (2011b) that raised concerns about indications of an unfavourable effect on biomarkers of lipid- and carbohydrate metabolism as well as on antioxidant status; increased markers of oxidative stress after consumption of supplemental CLAs.

There are few animal studies that are directly relevant for this risk assessment, according to previous risk assessments (SNT, 2004), (EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b) partly because of a plethora of feeding regimens/CLA compositions, and partly because of a wide variety in species and strains. Reviews of animal studies give some support to the findings in humans of an increase in liver hypertrophy, biomarkers of oxidative stress and unfavourable lipid- and carbohydrate changes upon feeding with CLAs.

Many studies with adequate design (RCTs) concern CLAs and effect on body weight, but few of them have included safety and/or risk factors as their primary aims. Many of these studies do, however, give an overview of adverse effects, though not always detailed. In most of the RCTs there were no significant differences in adverse effects between the placebo and CLA-groups. A number of biomarkers have also been studied, using them as proxies for lipid- and carbohydrate metabolism as well as of oxidative stress. The results are conflicting in that some report unwanted changes while others report no changes in the levels of these biomarkers between subjects receiving CLAs and controls receiving placebo.

Based on these previous risk assessments (AFFSA, 2005a; AFSSA, 2005b; ANSES, 2011b; EFSA, 2010 a; EFSA, 2010 b; FHI, 2003; SNT, 2004) the present risk assessment has not found firm support for increased blood lipid levels upon CLA supplementation to healthy individuals. Most of the studies focusing on CLA supplementation and blood lipids were of short duration, and consequently the impact of such supplementation on future cardiovascular risk is uncertain since clinically relevant atherosclerotic lesions take years to develop. Notably the EFSA (2010 a); EFSA (2010 b) opinions put a maximal duration of safe use of CLA supplementation to six months. Moreover, the changes in blood lipids, e.g. HDL-cholesterol, were small, and a dose-response effect has not been demonstrated.

As value for comparison in the risk characterisation of CLAs, VKM will use 3.5 g/day mainly based on the EFSA statement from 2012. In an adult weighing 70 kg, 3.5 g/day of CLAs corresponds to 50 mg/kg bw per day.

3 Exposure / Intake

Exposure of CLAs was estimated from the intake of food supplements. For food supplements, the intake of CLAs was estimated for the age groups 10-14 years, 14-18 years and adults (≥ 18 years).

3.1 Food supplements

The Norwegian Food Safety Authority has requested a risk assessment of 3.0, 3.25 and 3.5 g/day of CLAs in food supplements for children above 10 years, adolescents and adults.

The default body weights (bw) determined by EFSA were used: 10 to <14 years=43.4 kg, 14 to <18 years=61.3 kg, and adults=70 kg. The intakes per kg bw is given in (Table 3.1-1).

Table 3.1-1: An overview of the exposure of children, adolescents and adults in the present risk assessment.

Groups	Daily doses (mg)	Body weight (kg)	Exposures (mg/kg bw per day)
Children (10 to <14years)	3000, 3250 and 3500	43.4	69, 75 and 81
Adolescent (14 to <18 years)	3000, 3250 and 3500	61.3	49, 53 and 57
Adults (≥ 18 years)	3000, 3250 and 3500	70.0	43, 46 and 50

3.2 Other sources

The daily dietary intake in Norway of CLAs range between 20 and 170 mg (MoBa 2008, version 4). Dairy products account for about 80-90% of total intake of CLAs. Intakes of CLAs in children and adolescents are not known. CLA concentrations in milk and dairy products vary considerably, by a factor of up to 10 in studies in which large numbers of samples were analysed. Because CLA concentrations are dependent on feed composition and use of supplements, seasonal fluctuations in CLA concentrations are seen. On average, CLA concentrations in milk and dairy products range from 0.2 to 1.6 g/100 g fat.

4 Risk characterisation

The doses received from NFSA are 3.0, 3.25 and 3.5 g/day CLAs in food supplements, and the exposures for adults, adolescents and children above 10 years are given in chapter 3.

The value for comparison used in this risk characterisation is 3.5 g CLAs per day corresponding to 50 mg/kg bw per day in a 70 kg adult.

Obese men with the metabolic syndrome who use CLA supplements may experience impairments in their lipid- and carbohydrate metabolism.

Use of CLA supplements in lactating and pregnant women may cause reduction in milk production and in the content on milk fat and cause decreased birth weight and-length in their off-springs.

There is apparently only one RCT based on subjects ≤ 18 years, showing no differences in adverse effects or biomarker values between intervention and control subjects (Racine et al., 2010). In this study a limited age range (children aged 6-10 years) was included and the participants were all overweight or obese; the intervention lasted for 7 months. Adverse health effects were not the primary outcome. It is also doubtful to extrapolate from the tolerance level for CLAs in adults to children since much of the collected data are from overweight/obese, subjects likely to have a different CLA-metabolism/-effect than normal-weight subjects. Thus the evidence for use of CLA supplements is too limited for VKM to conclude about the risk associated with use among children and adolescents. Notably, during their lifespan children are more prone to develop atherosclerotic disease than adults if they consume substances that lead to increase in relevant risk markers, e.g. lipids. Hence, this RCT alone cannot form the basis for any conclusion about healthy children in general by VKM in the present report.

Most studies with CLAs have short duration. Only three studies lasting longer than six months were identified, and these studies mostly included overweight or obese participants.

VKM considers that:

In healthy adults (≥ 18 years), the specified doses 3.0, 3.25 and 3.5 g/day CLAs in food supplements are considered to be unlikely to cause adverse health effects if used for up to six months.

Based on available data no conclusions can be drawn for supplemental use of CLAs longer than six months.

Supplemental CLAs may impair lipid and carbohydrate metabolism in obese men with metabolic syndrome as well as in overweight/obese subjects with type 2 diabetes.

Data are insufficient to evaluate any of the specified doses of CLAs for children and adolescents.

Use of CLA supplements by pregnant women may lead to decreased birth weight and -length among their offsprings. Intake of supplemental CLAs in lactating women may reduce the fat content in breastmilk.

5 Uncertainties

The previous risk assessments, in particular those from EFSA (2010 a); EFSA (2010 b); EFSA (2012), focused on CLA-rich oils and not pure CLA supplements.

Many of the included studies were performed on overweight/obese subjects and not on normal-weight subjects who may metabolise CLAs differently. There is a need for more studies of lactating women given the possible negative effect of CLAs on milk composition.

Only one RCT on children was identified in the literature search, and this study included overweight/obese and not normal-weight children. There is insufficient knowledge about CLA metabolism in children versus adults to permit a mere extrapolation of adult-data to children and adolescents.

Most of the studies referred to are benefit studies, specifically designed to investigate the claimed positive effects and not adverse effects. Adverse effects may not always be recorded and if they are, they may not be properly diagnosed. In the human studies, the adverse effects reported are partly based on self-reporting, and partly on biomarkers for adverse health effects (e.g. oxidative stress, cardiovascular disease risk, carbohydrate- and lipid metabolism). It is unknown for many biomarkers if they are directly involved in the metabolism of CLAs and/or the reported adverse effects.

6 Conclusions with answers to the terms of reference

The Norwegian Food Safety Authority (NFSA) requested the Norwegian Scientific Committee for Food Safety (VKM) to assess the safety of conjugated linoleic acids (CLAs) in food supplements at the following doses: 3.0, 3.25 and 3.5 g/day for the general population, ages 10 years and above.

VKM concludes that doses up to 3.5 g per day of CLAs from food supplements for up to six months is unlikely to cause adverse health effects in adults ≥ 18 years. There are insufficient data to conclude regarding use of more than six months duration.

Supplemental CLAs may impair lipid and carbohydrate metabolism in obese men with metabolic syndrome as well as in overweight/obese subjects with type 2 diabetes.

Use of CLA supplements by pregnant women may lead to decreased birth weight and -length among their offsprings. Intake of supplemental CLAs in lactating women may reduce the fat content in breastmilk.

There is insufficient evidence to evaluate the specified doses for children and adolescents.

VKM concludes that:

- In adults (≥ 18 years), the specified doses 3.0, 3.25 and 3.5 g/day CLAs in food supplements are considered to be unlikely to cause adverse health effects if used for up to six months.
- CLA may cause lipid- and carbohydrate disturbances in obese men with metabolic syndrome as well as in overweight/obese subjects with type 2 diabetes.
- Use of CLA supplements in lactating and pregnant women may cause reduction in milk production and in the content on milk fat and cause decreased birth weight and-length in their off-springs.
- No conclusion can be made for children and adolescents.
- Data are insufficient to conclude regarding use of CLAs for more than six months.

Table 6.1: An overview of the conclusions for CLAs in food supplements.

Green: Estimated exposures to CLAs are unlikely to cause adverse health effects if used up to 6 months.

Grey: No conclusion.

	CLAs		
Doses	3.0	3.25	3.5
Age groups	g/day	g/day	g/day
Children (10 to <14 years)	No conclusion	No conclusion	No conclusion
Adolescents (14 to <18 years)	No conclusion	No conclusion	No conclusion
Adults (≥18 years)	Up to 6 months	Up to 6 months	Up to 6 months

7 Data gaps

Good data for content of CLAs in foods are lacking, as well as data for intake of CLAs from foods in various population groups.

There is lack of short and long term studies in humans of CLAs with adverse health effects as the primary outcome that are of sufficient good quality.

The studies on adverse health effects related to CLAs in adults are heterogeneous both in design and results.

There are few studies on adverse health effects related to CLAs in children and adolescents as well as in vulnerable groups such as pregnant and lactating women and the elderly.

More data on the specific metabolic effects of the various isomers present in the CLA supplements are needed. There is a need for more in-depth studies on the possible adverse effects following intake of the individual CLA isomers.

Identification of more biomarkers with a direct link to CLA metabolism is also called for, and mode of actions need more elucidation.

8 References

- AFFSA. (2005a) Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments du 25 juillet 2005 relatif à l'évaluation des risques éventuels liés à l'emploi de lycopène en tant qu'ingrédient alimentaire. AFFSA Journal.
- AFSSA. (2005b) Sécurité et bénéfices des phytoestrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations. AFSSA Journal.
- ANSES. (2011a) Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety on a "safety assessment of the use of an oil enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLA)". ANSES Journal.
- ANSES. (2011b) Opinion of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety on the assessment of the risks associated with substances with nutritional or physiological effects with a view to restricting or prohibiting their use in foodstuffs
- ANSES Journal.
- Basu S., Smedman A., Vessby B. (2000) Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. FEBS Lett 468:33-36.
- Berven G., Bye A., Hals O., Blankson H., Fagertun H., Thom E., Wadstein J., Gudmundsen O. (2000) Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. European Journal of Lipid Science and Technology 102:455-462.
- Chen S.-C., Lin Y.-H., Huang H.-P., Hsu W.-L., Hwang J.-Y., Huang C.-K. (2012) Effect of conjugated linoleic acid supplementation on weight loss and body fat composition in a Chinese population. Nutrition 28:559-565.
- DeGuire J.R., Weiler H.A. (2013) Free fatty acid and triacylglycerol forms of CLA isomers are not incorporated equally in the liver but do not lead to differences in bone density and biomarkers of bone metabolism. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA) 88:399-403.
- Dilzer A., Park Y. (2012) Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. Crit Rev Food Sci Nutr 52:488-513.
- EFSA. (2010 a) Scientific Opinion on the safety of "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil" (ClarinolReg.) as a Novel Food ingredient. EFSA Journal 8.
- EFSA. (2010 b) Scientific Opinion on the safety of "conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil" (TonalinReg. TG 80) as a Novel Food ingredient. EFSA Journal 8.
- EFSA. (2012) Statement on the safety of the "conjugated linoleic acid (CLA) rich oils" ClarinolReg. and TonalinReg. TG 80 as Novel Food ingredients. EFSA Journal 10.

- Elias S.L., Innis S.M. (2001) Infant plasma trans, n- 6, and n- 3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *The American journal of clinical nutrition* 73:807-814.
- FHI. (2003) CLA (Conjugated linoleic acid) og uheldige helseeffekter; en gjennomgang av litteratur. Nasjonalt folkehelseinstitutt, Avdeling næringsmiddel toksikologi, seksjon for miljømedisin, Oslo.
- FVM. (2014) Bekentgørelse om tilsætning af visse andre stoffer end vitaminer og mineraler til fødevarer. Fødevarestyrelsen, Denmark, Fødevareministeriet (FVM) Ref.no. 2014-27-31-00005.
- Gaullier J.-M., Halse J., Høyvik H.O., Høye K., Syvertsen C., Nurminiemi M., Hassfeld C., Einerhand A., O'Shea M., Gudmundsen O. (2007) Six months supplementation with conjugated linoleic acid induces regional-specific fat mass decreases in overweight and obese. *Br J Nutr* 97:550-560.
- Gaullier J.-M., Halse J., Høye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H., Gudmundsen O. (2004) Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *The American journal of clinical nutrition* 79:1118-1125.
- Gaullier J.-M., Halse J., Høye K., Kristiansen K., Fagertun H., Vik H., Gudmundsen O. (2005) Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *The Journal of nutrition* 135:778-784.
- Iwata T., Kamegai T., Yamauchi-Sato Y., Ogawa A., Kasai M., Aoyama T., Kondo K. (2007) Safety of dietary conjugated linoleic acid (CLA) in a 12-weeks trial in healthy overweight Japanese male volunteers. *Journal of oleo science* 56:517-525.
- Larsen T.M., Toubro S., Astrup A. (2003) Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity evidence from animal and human studies. *J Lipid Res* 44:2234-2241.
- Larsen T.M., Toubro S., Gudmundsen O., Astrup A. (2006) Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *The American journal of clinical nutrition* 83:606-612.
- Laso N., Brugué E., Vidal J., Ros E., Arnaiz J.A., Carné X., Vidal S., Mas S., Deulofeu R., Lafuente A. (2007) Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid (isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12) on body composition and metabolic syndrome components. *Br J Nutr* 98:860-867.
- Masters N., McGuire M.A., Beerman K.A., Dasgupta N., McGuire M.K. (2002) Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. *Lipids* 37:133-138.
- Mollica M.P., Trinchese G., Cavaliere G., De Filippo C., Cocca E., Gaita M., Della-Gatta A., Marano A., Mazzarella G., Bergamo P. (2014) c9, t11-Conjugated linoleic acid ameliorates steatosis by modulating mitochondrial uncoupling and Nrf2 pathway. *J Lipid Res* 55:837-849.

- O'hagan S., Menzel A. (2003) A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with a conjugated linoleic acid product. *Food Chem Toxicol* 41:1749-1760.
- Onakpoya I.J., Posadzki P.P., Watson L.K., Davies L.A., Ernst E. (2012) The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in overweight and obese individuals: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Eur J Nutr* 51:127-134.
- Park Y., Albright K.J., Pariza M.W. (2005) Effects of conjugated linoleic acid on long term feeding in Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 43:1273-1279.
- Pinkoski C., Chilibeck P.D., Candow D.G., Esliger D., Ewaschuk J.B., Facci M., Farthing J.P., Zello G.A. (2006) The effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training. *Med Sci Sports Exerc* 38:339.
- Racine N.M., Watras A.C., Carrel A.L., Allen D.B., McVean J.J., Clark R.R., O'Brien A.R., O'Shea M., Scott C.E., Schoeller D.A. (2010) Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *The American journal of clinical nutrition* 91:1157-1164.
- Risérus U., Arner P., Brismar K., Vessby B. (2002a) Treatment with dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25:1516-1521.
- Risérus U., Basu S., Jovinge S., Fredrikson G.N., Ärnlöv J., Vessby B. (2002b) Supplementation With Conjugated Linoleic Acid Causes Isomer-Dependent Oxidative Stress and Elevated C-Reactive Protein A Potential Link to Fatty Acid-Induced Insulin Resistance. *Circulation* 106:1925-1929.
- Scimeca J.A. (1998) Toxicological evaluation of dietary conjugated linoleic acid in male Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol* 36:391-395. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915%2897%2900169-5>.
- Silveira M.-B., Carraro R., Monereo S., Tébar J. (2007) Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. *Public Health Nutr* 10:1181-1186.
- Sluijs I., Plantinga Y., de Roos B., Mennen L.I., Bots M.L. (2010) Dietary supplementation with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid and aortic stiffness in overweight and obese adults. *The American journal of clinical nutrition* 91:175-183.
- SNT. (2004) Vurdering av helserisiko av CLA-produkter. Statens næringsmiddeltilsyn.
- Taylor J.S., Williams S.R., Rhys R., James P., Frenneaux M.P. (2006) Conjugated linoleic acid impairs endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:307-312.
- Tholstrup T., Raff M., Straarup E.M., Lund P., Basu S., Bruun J.M. (2008) An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *The Journal of nutrition* 138:1445-1451.

Watras A., Buchholz A., Close R., Zhang Z., Schoeller D. (2007) The role of conjugated linoleic acid in reducing body fat and preventing holiday weight gain. *Int J Obes* 31:481-487.

WHO. (1994) Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. *Environmental Health Criteria* 170, World Health Organization. .

Appendix 1

Search strategies for this risk assessment

Search strategy 1

1. Database: Ovid MEDLINE(R) <1946 to October Week 1 2014>, Embase <1974 to 2014 October 9>
risk factor/ or (risk factor* or risk benefit).tw.
2. risk assessment/ or ((risk adj2 assess*) or (safety adj2 assess*)).tw.
3. ((adverse adj2 effect*1) or (adverse adj2 event*) or side-effect*).tw.
4. adverse drug reaction/ or ((adverse adj2 reaction*) or (drug adj2 effect*1)).tw.
5. (negative health* or negative effect*1 or negative impact*).tw.
6. (consequence* or interact* or contra-indicat* or contraindicat*).tw.
7. health hazard/ or ((health adj2 hazard*) or (harmful adj2 effect*1) or health harm* or (health adj2
8. risk*) or harm*).tw.
9. toxicity/ or (toxicity or (toxic adj effect*1)).tw.
10. or/1-8
11. dietary supplements/ or diet supplementation/
12. ((diet* adj2 supplement*) or (food adj2 supplement*)).tw.
13. or/10-11
14. 9 and 12
15. linoleic acids, conjugated/ or conjugated linoleic acid/ or conjugated linoleic acid*.tw.
16. 13 and 14
17. Meta-analysis as topic/ or meta-analysis/
18. (meta-analy* or metaanaly*).tw.
19. (systematic adj (review*1 or overview*1)).tw.
20. review literature as topic/
21. review.pt. or cochrane.tw.
22. or/16-20
23. randomized controlled trials as topic/ or randomized controlled trial/
24. clinical trial/ or clinical trial*.tw.
25. randomization/ or random allocation/ or (randomi?ation.tw. or (random* adj2 allocat*).tw.
26. or/22-24
27. 21 or 25
28. 15 and 26
29. limit 27 to yr="2000 -Current"
30. remove duplicates from 28
31. animals/ or animal experiment/ or animal*.tw.
32. rat/ or rats/ or rat.tw. or rats.tw. or mouse/ or mice/ or mouse.tw. or mice.tw.

33. nonhuman/ or nonhuman*.tw.
34. or/30-32
35. human/ or humans/ or human experiment/ or human*1.tw.
36. 33 not (33 and 34)
37. 29 not 35 (result 95 hits)

Search strategy 2

Databases: Ovid MEDLINE(R) <1946 to March Week 1 2015>, Embase <1974 to 2015 March 3> and Web of Science

Search Strategy for MEDLINE AND EMBASE:

1. conjugated linoleic acid*.ti. (4886)
2. (conjugated linoleic acid* adj3 (risk* or safety or adverse or reaction* or side-effect*1 or hazard* or harm* or negative or contraindicat* or contra-indicat* or interact* or consequence* or toxicity or toxic)).tw. (77)
3. 1 and 2 (57)
4. (conference abstract* or letter* or editorial*).pt. (3507763)
5. 3 not 4 (57)
6. remove duplicates from 5 (33)

Search strategy for Web of Science:

3 37 #2 AND #1

Indexes=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI Timespan=All years

2 81 TS=(("conjugated linoleic acid*") NEAR/3 (risk* or safety or adverse or reaction* or side-effect*1 or hazard* or harm* or negative or contraindicat* or contra-indicat* or interact* or consequence* or toxicity or toxic))

Indexes=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI Timespan=All years

1 2,252 (TI=("conjugated linoleic acid*") AND **DOCUMENT TYPES:** (Article OR Book OR Book Chapter OR Proceedings Paper OR Review))

Indexes=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI Timespan=All years

Result altogether 50 hits

Search strategy for studies in children and adolescents

Database: Ovid MEDLINE(R) <1946 to June Week 1 2015>, Embase <1974 to 2015 June 16>

1. conjugated linoleic acid*.ti. (3480)
2. (child* or adolescent* or teenage* or college* or high school).tw. (2760579)
3. 1 and 2 (27)
4. limit 3 to (danish or english or norwegian or swedish) (22)
5. remove duplicates from 4 (result 16 hits - one of which was adults)

Appendix 2

Statens næringsmiddeltilsyn
Postboks 8187 dep
0034 Oslo

VURDERING AV HELSERISIKO AV CLA- PRODUKTER

Flere forhold, blant annet en risikovurdering utført av Nasjonalt Folkehelseinstitutt ved Jan Alexander og Margaretha Haugen på oppdrag fra SNT, indikerer at det kan være en helserisiko forbundet med bruk av CLA som kosttilskudd. SNT har derfor behov for en kritisk gjennomgang av risikovurderingen levert av Folkehelseinstituttet.

Til å utføre denne vurderingen har SNT oppnevnt følgende personer i en ad hoc vitenskapskomité som er bredt sammensatt med hensyn på kompetanse innen relevante fagområder:

Janneche Utne Skåre (leder), Veterinærinstituttet
Jan Alexander, Nasjonalt Folkehelseinstitutt
Margaretha Haugen, Nasjonalt Folkehelseinstitutt
Stein Vaaler, Rikshospitalet
Rolf Berge, Universitetet i Bergen
Serina Tonstad, Ullevål Universitetssykehus
Steinar Tretli, Kreftregisteret

Spørsmålene som gruppen er blitt bedt om å besvare:

1. Kan gruppen slutte seg til risikovurderingen utført av Nasjonalt Folkehelseinstitutt?
2. Bør noe legges til, endres eller fjernes fra vurderingen for at gruppen kan slutte seg til den?
3. Gir dokumentasjonen som er oversendt fra Natural ASA grunnlag for endrede konklusjoner?

Gruppen har hatt tre arbeidsmøter og har forøvrig kommunisert via e-mail. Ikke alle har hatt anledning til å delta på alle møtene. Seks av medlemmene stiller seg fullt og helt bak dette dokumentet. Rolf Berge hadde ikke anledning til å delta på det avsluttende møtet og heller ikke mulighet til å gå igjennom dokumentet som det foreligger. Han ønsket ikke å slutte seg til risikovurderingen. Etter hans ønske er hans innspill til ad hoc komitéen vedlagt (appendix 2).

-Innledning

Konjugerte linolsyrer, CLA, betsår av et karbonskjellett med 18 atomer og 2 dobbeltbindinger (C18:2). Dobbeltbindingene som er konjugerte i CLA kan sitte i forskjellige posisjoner, enten i 8 og 10 posisjon, eller 9,11, 10,12 eller 11,13 posisjon. Det første tallet angir karbonatomet regnet fra karboksylsyren. I tillegg til ulik plassering av dobbeltbindinger kan fettsyren ha

forskjellige geometriske former på grunn av cis trans isomeri. Teoretisk mulige antall geometriske former for CLA er seksten. CLA dannes naturlig i drøvtyggervommen. Naturlig CLA kilde i kostholdet er melk og melkeprodukter. Kjøtt fra drøvtyggere er en annen viktig kilde. Naturlig forekommende CLA består hovedsakelig av cis9trans11 isomerer. De femten andre isomerene utgjør 15-22% av total CLA. Isomerer trans10cis12 forekommer kun i små mengder. Syntetiske CLA preparater kan inneholde ulike sammensetninger av isomerer. I Tonalin®, som er det ledende produktet på det norske markedet utgjør cis9trans11 39% og trans10 cis12 isomerer ca 41%. I tillegg utgjør syv andre isomerer ca 5% av total CLA. Andre kommersielle preparater kan ha noe annerledes isomersammensetning. CLA produkter markedsføres i dag som kosttilskudd med muskeloppbyggende og fettvevsreduserende effekt ved slanking og fysisk aktivitet. Ut fra opplysninger fra Bransjerådet for Naturmidler om forbrukerverdien av CLA-produkter på det norske marked, kan det antas at ca 10% av befolkningen i Norge kjøpte et CLA-produkt i tidsperioden juli 2001 til og med juni 2002.

Generelle kommentarer

Risikovurderingen fra Nasjonalt Folkehelseinstituttet er av gjennomgående meget god kvalitet. Den gir en fyldestgjørende beskrivelse av CLA; kjemisk struktur, biosyntese, naturlige kilder i kostholdet, fremstilling av syntetiske CLA-preparater, sammensetning av ulike kommersielle produkter, anbefalt dosering og bruk samt bruk i Norge. De har også foretatt en meget grundig litteraturgjennomgang og valgt ut relevante publiserte dyreeksperimentelle og human studier som grunnlag for sin vurdering. Deres fokus har vært på mulige helseskade eller fravær av disse ved CLA supplementering. De har grundig diskutert problemene rundt dosestørrelse og isomersammensetning i de ulike studiene. I sin konklusjon påpeker de at det er isomerer trans10cis12 som ser ut til å være den aktive isomerer i forhold til å redusere fettvev og å forårsake steatose i dyremodeller. Det er dessuten denne isomerer som ser ut til å ha den mest uheldige effekten på metabolske parametre i menneske. De konkluderer med at dokumentasjonen tyder foreløpig på at CLA supplementering kan ha meget uheldige virkninger i menn med metabolsk syndrom, gravide og ammende kvinner. Ad hoc vitenskapskomitéen slutter seg til konklusjonene i risikovurderingen. Vi har i vår vurdering lagt til grunn den foreliggende risikovurdering, dokumentasjon oversendt fra Natural ASA og relevant ny litteratur publisert etter at Folkehelseinstituttet leverte sin vurdering 20.06.03. Vi har i det følgende utdypet bakgrunnen for hovedkonklusjonene ut i fra statistiske og kliniske vurderinger.

-Spesifikke kommentarer

Dyreeksperimentelle studier

I risikovurderingen utført av Folkehelseinstituttet er det foretatt en grundig gjennomgang av publiserte dyreeksperimentelle studier med CLA. I det følgende er det bare lagt vekt på uheldige helseeffekter. I dyrestudier er det generelt funnet at CLA forårsaker steatose og øker fetttsyreoksydasjon og lipogenese.

Ad hoc komitéen har gjennomgått relevant litteratur publisert etter at Folkehelseinstituttet leverte sin vurdering 20.06.03. Følgende to studier nevnes spesielt:

Hagan SO, Menzel A. A subchronic 90-day oral rat toxicity study and in vitro genotoxicity studies with conjugated linoleic acid product. Food and Chem Tox. 2003;41:1749-60.

Rotter ble fôret med Clainol™G80 som består av en blanding 9cis11trans og 10 trans12cis i forholdet 1:1. Rottene fikk henholdsvis 1, 5 og 15% i kosten med solsikkeolje som høy fett og lavfett kontroll. Den høyeste dosen ga leverforstørrelse som var reversibel og hyperinsulinemi, begge effekter i hunnrotter. Det var ingen effekt på glukosenivå i blod. Studien bekrefter de effekter som tidligere er vist. Slike effekter er også påvist i humane studier. Pga. artsforskjell mellom rotter og mennesker i lipid- og karbohydratstoffsiftet, er det imidlertid vanskelig å bruke denne studien til å fastsette et tolerabelt inntaksnivå i mennesker. Det vil være naturlig å bruke data for mennesker for å kunne bestemme dette.

Rajakangas J et al. Adenoma growth stimulation by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid (CLA) is associated with changes in mucosal NF-κB and cyclin D1 protein levels in the Min mouse. J. Nutr. 2003;133:1943-8

Tre grupper med 10 Min mus i hver gruppe ble studert. Min mus er en modell for familiær polypose i tarmen. Gruppe 1 fikk 1g cis9trans11 CLA per 100 g for, gruppe 2 fikk 1 g trans10cis12 CLA og gruppe 3 kontroll dietten i 8 uker. CLA ble påvist å øke veksten og biomarkører indikerte økt oksidativt stress som følge av CLA supplementering.

Ad hoc komitéens vurdering er at resultater fremkommet i disse studiene ikke gir grunn til å endre på oppsummeringen av de dyreeksperimentelle studiene i Folkehelseinstituttets vurdering. De dyreeksperimentelle studiene gir støtte for de funn som observeres i de kliniske studiene, men Ad hoc komiteen finner, pga av store artsforskjeller mellom rotter og mennesker når det gjelder fett- og karbohydratstoffsiftet, at dyrestudiene ikke er egnet til å gjøre en kvantitativ risikovurdering for mennesker.

Folkehelseinstituttet har i begrenset omfang diskutert bakenforliggende mekanismer for effekter av CLA i dyremodellene. Ad hoc gruppen mener at inkludering av noen mekanismebetraktninger vil kunne bidra til vurdering av helserisiko av CLA-produkter.

PPAR reseptorer synes å ha stor betydning for utvikling av hjerte- og karsykdommer og metabolsk syndrom. Det er senere fremkommet litteratur som viser at CLA kan virke modulerende på PPAR γ reseptor (Granlund et al. 2003). Betydningen av dette er foreløpig ikke kjent. Se også Berges kommentarer Appendiks 1.

Ekspimentelle kliniske studier

Humanstudier med CLA er først og fremst designet for å få dokumentert CLAs mulige positive helseeffekter. I Risikovurderingen utført av Folkehelseinstituttet er det foretatt en grundig gjennomgang av de humanstudiene med CLA som er publisert i PubMed frem til mai 2003. Folkehelseinstituttets fokus har vært på helseskadelige effekter eller fravær av disse ved CLA supplementering. Det generelle inntrykk av de kliniske studiene er at de til dels har for kort observasjonstid og har for få inkluderte til å påvise negative bivirkninger av klinisk relevans hos mennesker. Ad hoc komiteen har gjennomgått relevant litteratur publisert etter at Folkehelseinstituttet leverte sin vurdering. Følgende nye studier ble spesielt vurdert med fokus på mulige helseskadelige effekter eller fravær av disse ved CLA supplementering:

Kamphuis MMJW et al. The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight

subjects. Int J Obesity 2003;27:840-7

Dette er en dobbelt blindet, placebo kontrollert studie hvor alle (26 menn og 28 kvinner) startet med 1000 kcal i 3 uker og hvor de fikk initiert et vekttap på mellom 4-5 kg. Etter dette fikk en gruppe (14 personer) 1,8 g CLA, en gruppe 3,6 g CLA (13 personer) og to placebogrupeer (13 personer +14 personer) fikk tilsvarende 1,8 g resp. 3,6 g oljesyre i 13 uker. CLA preparatet var Tonalin 75% TG Natural.

Under diettperioden fikk man en signifikant reduksjon av vekt, %kroppsfett, fettmasse, fettfri masse, "resting metabolic rate", respiratory quotient, plasma glukose, insulin og TG, mens FFA, glycerol og β -hydroksibutytrat økte. Multippel regresjons analyse viste at CLA ikke hadde noen effekt på vektøkningen etter 13 uker, men % vektøkning av fettfri masse var større i CLA gruppene 6,2 og 4,5% mot 2,8 og 3,4% i kontrollgruppen. Det var ikke noen dose-respons, dvs man hadde best resultat i gruppen som fikk minst CLA. Resting metabolic rate var økt i CLA gruppene. Man fant ikke noen forandringer på blodparametrene (glukose, insulin, TG, FFA, glycerol og β -hydroksibutytrat) etter 13 uker med CLA supplementering sammenliknet med før studiestart. Studien er for liten til å utelukke slike effekter.

Ad hoc komitéen konkluderer med at denne studien ikke gir grunnlag for trykghetsvurdering.

Albers R. et al. Effect of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. Eur J Clin Nutr. 2003;57:595-603.

Hensikten med studien var å studere immunologiske variabler hos 71 friske menn (31-69 år) som fikk CLA 40 dager før de ble vaksinert mot hepatitt B og under en periode på 82 dager. Deltakerne ble vaksinert 3 ganger; dag 40, 55 og 68. DTH ble undersøkt dag 82.

Undersøkelsen var en dobbelt-blindet placebo kontrollert studie hvor deltakerne ble randomisert i 3 grupper; en gruppe fikk 1,7 g cis9trans11/trans10cis12 som FFA i forholdet 50/50; neste gruppe fikk 1,6g cis9trans11/trans10cis12 som TG i forholdet 80/20.

Kontrollgruppen fikk tilsvarende mengde solsikkeolje. CLA preparatet var produsert av Loders Croklaan som også støttet studien.

Resultatet viste at gruppen som fikk CLA blandingen 50/50 hadde signifikant høyere frekvens av respondenter til hepatitt B vaksineringsen sammenliknet med det to andre gruppene. Man fant ingen forskjeller i DTH respons, NK celler, lymfocytt proliferering, produksjon av TNF- α , IL1- β , IL6, IFN- γ , IL2 eller PGE₂. Ingen andre variabler ble målt.

Ad hoc komitéen konkluderer med at denne studien ikke gir grunnlag for trykghetsvurdering.

Belury MA et al The conjugated linoleic acid (CLA) isomer trans10cis12-CLA, is inversely associated with changes in the body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. J. Nutr 2003;133:257S-60S.

Studien viste at i en gruppe (12 personer) med type 2 diabetes som fikk 8,0 g 76% ren CLA som FFA per dag i 8 uker (cis9trans11 37% og trans10cis12 39%) og en kontrollgruppe (9 personer) som fikk tilsvarende mengde tistelolje korrelerte CLA negativt med vekten og med serum leptin. Best korrelasjon (negativ) fant man mellom trans10cis12CLA i plasma og vekttap og forandring i leptin. Forfatteren konkluderer med at det er trans10cis12 som er den aktive formen når det gjelder vekttap og type 2 diabetes. Videre etterlyses studier som viser mekanismer som kan forklare effekter på insulin og insulinsensitivitet og lipidmetabolismen.

Ad hoc komitéen konkluderer med at denne studien er for begrenset og har et design som ikke er egnet til å kunne avsløre trygghetsmomenter.

Ad hoc komitéen har også fått oversendt dokumentasjon fra Natural ASA for fem kliniske studier på CLA, CLA001, CLA002, CLA005, CLA006, CLA009. Disse er alle utført på oppdrag fra Natural ASA. Resultater fra studiene CLA001 og CLA002 er publisert, CLA006 foreligger i manuskriptform og disse er vurdert av Folkehelseinstituttet. De andre studiene er pt kun fremlagt som rapporter.

CLA 006 og 009: Dette er en rapport som beskriver en 12 måneders åpen studie som etterfølger en blindet hovedstudie på 12 måneder. I denne åpne studien fikk alle deltakere

tilbud om 3,4 g CLA-TG. 150 av de opprinnelige 180 deltakerne fortsatte i denne studien. Etter 24 måneder totalt hadde man signifikant økning i ASAT, leukocytter, trombocytter, insulin og Lp(a) innen gruppene, mens HDL-kolesterol og leptin ble redusert innen gruppene. Man fant ingen signifikante forskjeller mellom gruppene.

Sammenholdt med den første 12 måneders studien tyder resultatene på at leukocytter har en tendens til økning og at trombocytter viser en signifikant økning ved CLA-supplementering. Dette kan imidlertid være et utslag av multiplesignifikansanalyser. Økningen i ASAT var klinisk marginal.

CLA 006: Denne rapporten omhandler dannelse av oksidasjonsproduktet isoprostane 8-iso-PGF_{2α} og serums oksidasjonstilbøyelighet målt med diendannelse. Mens man ikke fant noen effekt på total serum tilbøyelighet for kobberindusert oksidasjon, fant man en signifikant økning av isoprostane 8-iso-PGF_{2α} konsentrasjonen i blod ved CLA supplementering. Økningen i isoprostane 8-iso-PGF_{2α} korrelerte negativt med økning av IGF-1 og positivt med insulin C- peptid.

Betydningen av økning av isoprostane 8-iso-PGF_{2α} diskuteres og man konkluderer med at den ikke har klinisk relevans. Resultatet bekrefter imidlertid funn i studien til Basu et al. 2003 som er omtalt i Folkehelseinstituttets rapport.

CLA 005: Toubro S et al. One year effect of conjugated linoleic acid (CLA) treatment on body composition regain in obese volunteers after an initial 8 week low caloric diet (LCD) induced weight loss. Rapport.

Dette er en dobbelt blindet, placebo kontrollert studie hvor alle (101 personer) startet med lav kalori diett (LCD) i 8 uker. Etter en vektreduksjon på minst 8% ble 50 personer randomisert til gruppen som fikk 3,4 g CLA-FFA(Tonalin) per dag i 52 uker og 51 personer til gruppen som fikk placebo, 4,5 g olivenolje per dag.

Ingen av de målte variablene (hemoglobin, erytrocytter, leucocytter, trombocytter, glukose, kreatinin, ASAT, ALAT, γ -GT) indikerte uheldige effekter av CLA supplementeringen.

For å kunne svare på spørsmålet om dokumentasjonen fra Natural ASA gir et grunnlag for å endre konklusjonene gitt i Folkehelseinstituttets risikovurdering, har ad hoc komiteen vurdert kvaliteten til dokumentasjonen fremlagt fra Natural ASA ved å bedømme i hvilken grad de

enkelte studier har muligheter til å belyse formålet som er satt opp, og om de konklusjoner som er trukket ut fra studienes resultater er vitenskapelig holdbare.

I studiene er det benyttet 3 typer variable:

1. Måling av effekt (vekt, BMI, etc.). Disse variablene måles i kontinuerlige skalaer.
2. Måling av laboratorieverdier (kolesterol, HDL kolesterol, etc). Disse variablene måles i kontinuerlige skalaer.
3. Måling av bivirkningshendelser (Adverse events). Dette er for den enkelte person en ja/nei variabel og for en gruppe forsøkspersoner vil den angis som et prosent tall.

Ved beregninger av statistisk styrke (dvs studiens evne til å avsløre en medisinsk signifikant forskjell) er det vanlig å bruke 80% eller høyere når signifikansnivået er gitt. Signifikansnivået settes som oftest til 5%.

CLA001: Safety and efficacy of CLA in healthy, moderately obese volunteers. A multicenter double-blind randomized placebo controlled study (Phase I/II).

Formålet med denne studien var å undersøke sikkerheten av CLA (Tonalin™ kapsler) blant friske frivillige og vise effekten av CLA på kroppens fettmasse målt ved BMI.

Antall pasienter inkludert i studien var 60 personer randomisert i 2 grupper. Tretten personer frafalt. Dette resulterte i 22 personer i placebogruppen og 25 personer i CLA gruppen. Studieperioden var 12 uker. Målinger og undersøkelser ble gjort ved uke 0 (baseline), uke 6 og uke 12. Alle inkluderte personer hadde BMI ≥ 27.5 kg/m².

Denne studien tar mål av seg til belyse både effekt og sikkerhet gjennom de 3 typer variable angitt ovenfor. Når det gjelder målinger av effekt og endringer i laboratorieverdier, så har 25 personer i hver gruppe (uten drop-out) 80% sannsynlighet til å påvise forskjeller som er større enn ca 1.0 standardavvik ved 1% signifikansnivå og ca 0.8 standardavvik ved 5% signifikansnivå. For å eksemplifisere hva dette betyr, så vil endringer mellom uke 0 og uke 12 måtte være større enn ca 1 mmol/l for total kolesterol for å bli bedømt som medisinsk signifikant ved 1 % signifikansnivå. Ved 5% signifikansnivå må tilsvarende endring være 0.8 mmol/l. Ved 1% signifikansnivå vil endring i kroppsvekt måtte være ca 1.8 kg i samme periode.

Når det gjelder målinger av bivirkningshendelser (Adverse events), så er situasjonen enda verre. Anta at bivirkningshendelser var sett hos 20% av personene i den ene gruppen og hos 40% i den andre. Med 80 % sannsynlighet for å avsløre bivirkningsforekomst av denne størrelsen og ved 1% signifikansnivå, så måtte det være ca 120 personer i hver gruppe og ikke 25 som her er brukt. Tilsvarende tall for 5% signifikansnivå vil være ca 80 personer i hver gruppe.

Denne studien er for liten til å kunne gi nødvendig informasjon om forskjeller mellom CLA og placebogruppene. Det blir meningsløst i sikkerhetssammenheng å slutte at manglende observerte forskjeller kan tolkes som ingen forskjell mellom de to gruppene. I tillegg må nevnes at bivirkningsstudier over 12 uker nok er i korteste laget. Studien er publisert.

CLA002: Dose response of CLA on body composition in healthy volunteers. A single center, double-blind, randomised placebo controlled study (Phase I/II).

Formål med denne studien er å undersøke effekten av forskjellige doser CLA på kroppsmasse sammensetning blant friske frivillige og å undersøke sikkerheten ved bruk av laboratorieparametre og bivirkningshendelser (Adverse events).

Antall personer inkludert i studien var 60 personer fordelt på 5 grupper som mottar doser på henholdsvis 0g, 1.7g, 3.4g, 5.1g og 6.8g. Dvs at det i utgangspunktet er 12 personer i hver gruppe. Studien varte i 12 uker. Antall dropouts var 13.

Ut fra eksemplene som er beskrevet i CLA001-kommentaren, så sier det seg selv at alle direkte sammenligninger mellom placebogruppen (kun 8 personer fullførte) og en av de eksponerte gruppene, vil ha alt for liten statistisk styrke til å gi ønsket informasjon. Dersom studien hadde vist en dose-respons sammenheng så ville det kunne øke den statistiske styrken noe. Det ble imidlertid ikke funnet noen dose-respons sammenheng. Studiens konklusjon at en dose på 3.4g ” seem to be sufficient to obtain positive effects on body composition” har ikke dekning i den gjennomførte studien. Studien er publisert.

CLA005: One year effect of conjugated linoleic acid (CLA) treatment on body composition regain in obese volunteers after an initial 8 weeks low calorie diet (LCD) induced weight loss. Personene har deltatt i forsøket i 12 måneder. Denne studien er noe mer relevant med hensyn til sikkerhetvurderinger fordi personene blir vurdert over 1 år og fordi studien er større enn de to før nevnte. Med 50 pasienter i hver gruppe vil fortsatt den statistiske styrken for å avsløre bivirkningshendelser være for lav, men situasjonen er forbedret i forhold til endringer i laboratorieverdier. Med 5% signifikansnivå har forskerne beregnet at med 44 personer i hver gruppe vil man kunne avsløre forskjeller på 0.5 x standardavvik med sannsynlighet 64% og 0,75 x standardavvik med sannsynlighet 94%. Eks: for hemoglobin svarer 0.5 standardavvik til 0,2-0,25 mmol/l.

CLA006: Effect of 12 months treatment with conjugated linoleic acid (CLA) on body composition and body weight in overweight adults.

Studien inneholder 2 grupper med aktivt medikament (CLA-FFA og CLA-TG) samt en kontrollgruppe (placebo). I hver gruppe inkluderes 60 personer. Tilsammen 23 personer ble dropouts eller lost to follow up. Antall inkluderte ble bestemt ut fra vurderinger av effekt. En effekt på ca 1.7 kg skulle kunne avdekkes med 80% sannsynlighet ved bruk av 2.5% signifikansnivå (beregnet av forskergruppen) når dropout kunne bli opptil 40%.

Studien har ikke tilstrekkelig statistisk styrke til å avsløre bivirkningshendelser. For laboratorieendringer er situasjonen bedre. Med 5% signifikansnivå og 13% dropouts (slik det ser ut i dag) har den statistisk styrke til å avsløre forskjeller over tid av størrelsesorden 0.5x standardavviket (dvs en endring på 0.12 mmol/l for HDL kolesterol). Studien er innsendt for publisering.

CLA009: Effect and safety of 12 months' extension of the main CLA006 study in moderately overweight volunteers.

Den dokumentasjon som er mottatt, indikerer at studien ikke er ferdig analysert enda. Det har blitt 30 (til sammen 53) flere dropouts eller lost to follow up.

De styrkebetragtninger som er beskrevet for CLA006 gjelder stort sett også for utvidelsen av forsøket, men muligens bør anslaget på definert medisinsk signifikant forskjell justeres noe

opp til omkring 0.6-0.7 standardavvik. Det er positivt med hensyn til sikkerhetsvurderinger at studien har to år oppfølgingstid.

Ad hoc komitéen konkluderer med at de eksperimentelle kliniske studiene med CLA supplementering organisert av Natural ASA ikke er planlagt eller gjennomført på en slik måte at bivirkningshendelsene kan påvises, men endringer i laboratorieverdier for eksempel lipider kan påvises med rimelighet, for de studier som har 12 måneder eller mer oppfølgingstid.

Insulinresistens

I sin vurdering konkluderer Folkehelseinstituttet med at CLA supplementering kan ha meget uheldige virkninger i menn med metabolsk syndrom. Bakgrunn for denne konklusjonen er at i de studiene der man kan vise til fettvevsreduksjon har man også funnet reduksjon av HDL-kolesterol, økt insulinresistens og økt utskillelse av peroksydasjonsprodukter i urin. Insulinresistens med påfølgende hyperinsulinemi og dyslipidemi karakteriserer metabolsk syndrom som således kan utvikles til type II diabetes. Siden de fleste type II diabetes pasienter er overvektige og overvektighet er assosiert med insulin resistens, er det antydnet en kausal sammenheng. Det er vanskelig å vurdere hvilken effekt CLA supplementering kan ha på fett- og glukosemetabolisme. Det er imidlertid noen tendenser som fremtrer:

- 1) CLA reduserer bukfettet og effekten synes å være knyttet til isomeren trans10cis12.
- 2) Reduksjonen av fettvevet synes ikke å være relatert til forbedring av den metabolske tilstanden. Tvert om ser det ut som om CLA gir pasientene forsterkede symptomer på det metabolske syndromet og de blir mer insulin resistente og får en dårligere metabolsk profil. Dette er i tråd med dyrestudier ved at reduksjon av fettvev ikke er relatert til øket insulin sensitivitet.
- 3) Det er ikke funnet utvikling av fettlever ved noen kliniske studier dersom vi ser på leverenzymverdiene.
- 4) CLA øker utskillelsen av 8-iso-PGF2alpha (F2-isoprostaner) og 15-K-DH-PGF2alpha, henholdsvis mål på ikke enzymatisk og enzymatisk lipid peroksidasjon *in vivo*. F2-isoprostaner er mest sannsynlig den beste indikator for øket oksydativt stress. Det er for eksempel også å bemerke at det er rapportert øket F2-isoprostaner etter n-3 fettsyre administrering. Således kan økningen av denne parameteren skyldes grad av umettethet av fettsyrene. Mest sannsynlig er det uttrykk for øket oksydativt stress og en kan således ikke utelukke negative effekter av CLA. I klinisk medisin tar man hensyn til dette i valg av dose av n-3 fettsyrer.

Ad hoc komitéen slutter seg til konklusjonen i risikovurderingen til Folkehelseinstituttet at CLA, spesielt isomeren trans10cis12 kan være ugunstig for personer med insulinresistens.

Hjerte- og karsykdommer

Ad hoc komitéen har vurdert om CLA-produkter kan ha ugunstige metabolske effekter på kort sikt når det gjelder risiko for hjerte- og karsykdom og har sett på de mest relevante kliniske studier i forhold til følgende to *a priori* spørsmål:

1) CLA-produkter består mest av *trans*-fettsyre. *Trans*-fett er vist å redusere HDL-kolesterol og øke Lp(a)-nivå. Ser vi tendens til dette i de kliniske studier?

2) Dyrestudier viser at CLA-produkter kan øke fett i leveren. Ser vi tendens til dette i de kliniske studier?

Når det gjelder lipider er to studier funnet relevante:

Blankson et al. J. Nutr 2000; 130: 2943-8. (CLA 002) I denne studien er det flest kvinner med BMI på ca 29 kg/m². Det er rapportert nedgang i HDL-kolesterolnivå på 0,1-0,2 mmol/l kun innenfor CLA-gruppene. Det er ikke statistisk styrke til påvise forskjeller mellom gruppene.

CLA006: Deltagerne er flest kvinner med BMI ca 27-28 kg/m². Det er rapportert reduksjon i HDL-kolesterol kun innenfor TG-CLA-gruppen men det ikke påvist statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Det er observert økning i Lp(a)-nivå innenfor begge CLA-gruppene, men det er ikke påvist statistisk signifikant forskjell mellom gruppene. Lp(a) er veldig skjevt fordelt, og risiko for hjerte- og karsykdom avhenger mer av hvilken genotype man har enn nivå.

CLA009 : Gruppe 3 som var først på placebo i ett år og så på CLA i ett år har en signifikant økning i Lp(a)-nivå, men forskjellen mellom gruppene er ikke statistisk signifikant.

Når det gjelder risiko for utvikling av fettlever er følgende studier vurdert:

CLA009 : Deltakerne har en gjennomsnittsalder på 46 år, en moderat overvekt med BMI på ca 28 kg/m², normale ALAT verdier på ca 25-26 IU/L, bra gjennomsnittlig HDL-kolesterol (ca 1,4 mmol/l – de fleste er kvinner), lave triglyserider (ca 1,3 mmol/l) og normalt gjennomsnittlig c-peptidnivå. De er ikke representative for personer med metabolsk syndrom som kan være mer utsatt for eventuelle ugunstige endringer i lipider og ALAT. Pga manglende tegn til insulinresistens er de heller ikke representative for personer med risiko for non-alkoholisk steatohepatitt (NASH) som kan innebære fare for leverfibrose. Den observerte økningen i ALAT på 5 IU/L i gruppe 3 (som startet CLA i det året) er ikke statistisk signifikant. Gruppen mener at en 10% økning i ALAT kan ha biologisk og klinisk signifikans spesielt for personer med et forhøyet nivå, men studien har ikke statistisk styrke til å avsløre en slik forskjell. Forekomsten av NASH er korrelert med insulinresistens mer enn med BMI. Det vil være vanskelig for en enkelt person å vite om de har insulinresistens. Det er tvilsomt at noen vil sette i gang endepunktstudier med CLA da dette blir meget kostbart.

Riserus et al. Diabetes Care 2002; 25: 1516-21 og Circulation 2002; 106: 1925-9. Deltakere i denne studien er representative for folk med metabolsk syndrom. De er menn, har BMI på ca 30 kg/m², gjennomsnittlig alder 53 år, lav HDL kolesterol (1,0 mmol/l) og høye triglyserider (ca 3 mmol/l). Studiene viser at trans10cis12 CLA forverret insulinresistens (målt med en gullstandardmetode), HDL-kolesterol, oksidative markører og CRP-nivå etter 12 uker. Økningen i CRP kan ha betydning for risiko for utvikling av hjerte- og karsykdommer. Endringer i de ulike metabolske parametere er biologisk konsistente med metabolsk syndrom.

Et nytt abstract (Riserus et al. 2003) har utvidet funnene omtalt ovenfor med trans 10cis12 CLAs effekter på insulinsensitivitet med at også cis9trans11 CLA har gitt liknende funn i en gruppe på 25 menn med abdominal fedme.

Ad hoc komiteen konkluderer med at trans10cis12 CLA kan være ugunstig for personer med metabolsk syndrom (insulinresistens, abdominal fedme, høyt triglyseridnivå, lavt HDL-kolesterol og hypertensjon). Vi er således enig i konklusjonen gitt i vurderingen til Folkehelseinstituttet.

Ad hoc komitéens vil tilføye at antallet med diabetes type II er økende og 75%- 80% av de som har diabetes type II har insulinresistens. I tillegg har mange med BMI over 30 kg/m² insulinresistens. Dette utgjør en vesentlig andel av befolkningen.

Virkning på fødselsvekt

I en studie der man korrelerte plasma CLA i navlestrengblod med graviditeslengde, barnets lengde og vekt ved fødsel fant man negative korrelasjoner med alle de tre variablene og CLA. Kun effekten av cis9trans11 ble vurdert. Forfatterne av studien konkluderte med at en burde se nærmere på CLA i forbindelse med graviditet. Det foreligger ikke tilsvarende studier i dyr. Ad hoc komitéen har ikke identifisert ny litteratur og slutter seg til konklusjonen gitt i vurderingen til Folkehelseinstituttet.

Ad hoc komitéen er enig i at CLA supplementering til gravide kvinner kan ha uheldige effekter på barnets fødselsvekt og lengde.

Virkning på fettinnhold i morsmelk

Folkehelseinstituttet refererer til en humanstudie der en har funnet reduksjon i fettprosent i morsmelken ved CLA supplementering. Tilsvarende er funnet i en studie på ku. På dette grunnlag har de konkludert med at CLA supplementering kan ha meget uheldige virkninger på ammende kvinner. Ad hoc komitéen har funnet flere studier som har sett på melkeproduksjonen hos kuer ved korttids supplementering. Funnene er konsistente og viser at fettprosenten i melken går ned. Langtidssupplementering ble utført i en studie på kuer fra dag 79 i drektighetsperioden (omkring 200 dager før kalving) og fortsatte til dag 140 etter kalving. Resultatet viste at produksjonen av alle fettsyrer var redusert. Spesielt var det nivåene av de korte og halvlange fettsyreene som var redusert. CLA supplementeringen var en CLA-isomer blanding (Perfield et al. 2002).

En lignende studie ble gjort på 12 drektige griser. Man fant også her en reduksjon på melkefettet totalt og en økning av de langkjedete fettsyreene, men ingen effekter på drektighetsperioden eller avkom (Bee 2000).

Ad hoc komitéen er enig i at CLA supplementering kan ha uheldige virkninger på fettinnholdet i morsmelk hos ammende kvinner.

På denne bakgrunn har vi følgende svar til spørsmålene

1. Kan gruppen slutte seg til risikovurderingen utført av Nasjonalt Folkehelseinstitutt?

Ad hoc komitéen slutter seg til risikovurderingen foretatt av Folkehelseinstituttet.

2. Bør noe legges til, endres eller fjernes fra vurderingen for at gruppen kan slutte seg til den?

Ad hoc komiteen har i sin vurdering utdypet en del spørsmål og inkludert nye referanser. Det er spesielt kliniske sider samt statistiske vurderinger av studiene som er utdypet.

Vi vil tilføye at andelen personer med insulinresistens utgjør en betydelig andel av befolkningen og er økende.

3. Gir dokumentasjonen som er oversendt fra Natural ASA grunnlag for endrede konklusjoner?

Dokumentasjonen oversendt fra Natural ASA gir ikke grunnlag for endrede konklusjoner. Det gjør heller ikke relevant litteratur publisert etter at Folkehelseinstituttets risikovurdering ble ferdigstilt.

Referanser:

Referanselisten er ufullstendig og vil bli ferdigstilt etter 24.11.03.

1. Perfield JW, Bernal-Santos G, Overton TR, Bauman DE. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J.Dairy Sci.* 2002;85:2609-17.
2. Bee G. Dietary conjugated linoleic acids alter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows. *J.Nutr.* 2000;130:2292-8.
3. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000;49:1534-42.

Apendix 1 (til rapport fra SNT)

Kommentar fra Rolf Berge: Effekten av CLA på reduksjon av fettvev og plasmalipider synes å være mediert via en PPARalpha avhengig og en PPARalpha uavhengig mekanisme. Øket mitokondriell og peroksisomal fettsyreoksydasjon og oppregulering av PPARalpha gener, hovedsaklig i lever, vil øke opptaket og forbrenningen av fettsyrer og delvis forklare denne effekten av CLA funnet i dyremodeller. I og med at PPAR er sterkere uttrykt i hann- enn hunndyr så ser en sterkere effekt av CLA i hanndyr enn hos hunndyr. I dyrestudier (hunn-mus og Zucker rotte) har man etter CLA supplementering også funnet fettakkumulering i lever. Grunnen for dette er mest sannsynligvis at i Zucker rotter er PPARalpha lavt uttrykt og har mye lavere mitokondriell fettsyreoksidasjon enn villtypen. Dette fenomenet er også funnet etter administrering av w-3 fettsyrer og det er grunn til å tro at øket fettsyre innfluks til lever konverteres til triglyserid biosyntese og øket lipogenese som resulterer i fettlever. I så måte er det en kryssamtale mellom PPARalpha og en annen transkripsjonsfaktor, SREBP som fører til en oppregulering av lipogenese markører som FAS, S14 og SCD-1. I mange dyrestudier er det etter CLA administrasjon funnet en signifikant reduksjon i kroppsfett og øket protein, men med liten effekt på glukose nivået. Disse data indikerer at overvekt og insulin resistens ikke medieres via same mekanisme, men kan være to fenomen som løper parallelt.

Apendix 2

VURDERING AV HELSERISIKO AV CLA-PRODUKTER

Dyreksperimentelle studier

1. relasjon mellom fettysreoksydasjon og lipogenese

Generelt vil CLA redusere fettvev og plasma lipider i muse-og rotte studier og denne effekten synes å medieres via en PPARalpha og en PPAR alpha uavhengig mekanisme. Øket mitokondriell og peroxisomal fettysreoksydasjon og oppregulering av PPARalpha gener, hovedsaklig da i leveren, vil øke opptaket og forbrenningen av fettsyrer og delvis forklare den gunstige effekten av CLA. I og med at PPAR er sterkere uttrykt i hann- enn hundyr så ser en sterkere effect av CLA i hanndyr enn hun dyr. Disse dyrestudiene bekrefter således en bedre balanse mellom fett og protein .

Intressant er det at i dyrestudier(hun-mus) og Zucker rotte etter CLA supplementering har funnet fettakkumulering i leveren. Grunnen for dette er mest sannsynligvis at i Zucker rotter er også PPAR alpha lavt uttrykt og har mye lavere mitokondriell fettysreoksydasjon en wildtypen. Dette fenomen er også funnet etter administrering av w-3 fettsyrer og det er grunn til å tro at øket fettysre innfluks til lever convertes til triglyserid biosyntese og øket lipogenese og resulterer i fettlever. I så måte er det en kryssamtale mellom PPARalpha og en annen transkripsjonsfaktor, SREBP. Som fører til en oppregulering av liåogenese markører som FAS, S14 og SCD-1.

2. Metabolsk Syndrom

Insulin resistens med påfølgende hyperinsulinemi og dyelipidemi karakteriserer metabolsk Syndrom som således kan utvikles til type II diabetes. Siden de fleste type II diabetes pasienter er overvektige og overvektighet er assosiert med insulin resistens, er det foreslått an klausal sammenheng I mange dyrestudier etter CLA adminstrasjon er det funnet en signifikant reduksjon i kroppsfett og øket rprotein, men med liten effect på glucose nivået. Disse data indikerer at overvekt og insulin resistens ikke medieres via same mekanisme , men kan være to fenomen som løper parallelt

Kliniske studier

1 Effekten på fedme og glukosemetabolismen

De generelle inntrykk av de kliniske studiene er at de relativt svake og uten sikre funn som har klinisk relevans hos mennesker.

3. Tendenser

Tendensen er at CLA 1, reduserer buk fett og effekten synes å være knyttet til isomeren t10-c12. 2, Reduksjonen av fettvevet synes ikke å være relaterert til forbedring av den metabolske tilstanden. Tvert om ser det ut som om CLA gir pasientene mer tegn på det metabolske Syndromet og blir mer insulin resistente og en dårligere metabolsk profil. Dette

er i tråd med dyrestudier ved at reduksjon av fett ikke er relatert til øket insulin sensitivitet. En kommentar her er å bemerke at noen rapporter syner at w-3 fettsyrer ikke øker insulin sensitiviteten. Noen andre studier med w-3 fettsyrer syner klare effekter, 3, det er ikke funnet utvikling av fettlever ved noen kliniske studier deersom vi ser på leverenzyme verdiene. 4. CLA øker utskillelsen av 8-iso-PGF2alpha (F2-isoprostaner) og 15-K-DH-PGF2alpha henholdvis mål på ikke enzymatisk og enzymatisk lipid peroksidasjon in vivo. F2-isoprostaner er mest sannsynlig den beste indikator for øket oksydativt stress, Det er å bemerke at det er også rapportert øket F2-isoprostaner etter w-3 fettsyre administrering. Således kan økningen av denne parameteren skyldes umettheten av fettsyrer. Me mest sannsynlig er det uttrykk for øket oksydativt stress og en kan således ikke utelukke negative effekter av CLA. 5. Det er en tendens til at HDL-kolesterolnivået reduseres etter bruk av CLA. Det er å bemerke at endringene er så små og kan således skyldes biologisk variasjon og analytisk metode

Sammenfatning

CLA synes å ha fettreduserende egenskaper. Denne egenskapen er hovedsaklig knyttet til isomeren t10-c12. Denne isomeren forekommer naturlig, men ikke de de konsentrasjoner som anbefales.

Human studiene som foreligger har liten statistisk kreft og det er ytterest vanskelig å vurdere mulige helseskadelige effekter eller fravær av slike. Det mest bekymringsfulle er at CLA har en tendens å øke oksydativt stress. Om det er farligt på lanbg sikt vites ikke for slike studier fines ikke. Produsenten oppgir å ha solgt CLA i mer enn 400 000 forpakninger og det er kun meldt inn 4 alvorlige hendelser til Statens Legemiddelverk som klassifiseres som mulig relatert til bruk av CLA.

Dokumentasjon viser at et høyt inntak av CLA gjennom kosten hos gravide kvinner er assosiert med lavere fødselsvekt og lengde

Hos ammende kvinner går fettprosenten i morsmelken ned ved CLA supplementering.

Konklusjon

Basert på bakenforliggende litteratur som inkluderer FHIs utvalg og tolking av aktuell litteratur, oversendt litteratur fra Natural ASA og ovenstående skriv kan følgende konklusjon trekkes:

CLA bør ikke brukes av gravide og ammende og med varsomhet hos personer med insulin resistens

Rolf K Berge

CLA (Conjugated linoleic acid) og uheldige helseeffekter; en gjennomgang av litteratur

Margaretha Haugen, Rose Vikse og Jan Alexander, Nasjonalt folkehelseinstitutt, Avdeling næringsmiddel toksikologi, seksjon for miljømedisin, Oslo.

1. Mandat

På oppdrag fra SNT har vi blitt bedt om å foreta en risikovurdering av konjugert linolsyre (CLA) som selges som kosttilskudd på det norske markedet.

1.1 Bakgrunn

I reklamen for CLA (konjugerte linolsyrer) produkter blir vi lovet ”Bedre balanse mellom fett og muskel” ved inntak av 2-4 kapsler per dag. Hvis vi leser videre får vi vite at CLA også er kolesterolregulerende og forebygger aterosklerose og diabetes type II. Disse påstander bygger på funn i dyrestudier, mens de få humanstudier som foreligger gir liten støtte til slike uttalelser. Det blir også hevdet at CLA ikke har noen uheldige helseeffekter.

I et brev til SNT har avdelingsoverlege Steinar Madsen i Statens Legemiddelverk rapportert fire tilfeller med alvorlige bivirkninger som mulig kan tilskrives bruken av CLA. En kvinne utviklet pankreatitt, en overvektig man fikk forstyrrelser i leverfunksjonsprøver og leversteatose og to kvinner utviklet pulmonal hypertensjon i tilknytning til bruk av CLA-preparater. Likeså har studier fra Sverige vist at overvektige menn med metabolsk syndrom fikk økt insulinresistens, redusert serum HDL-kolesterol og en signifikant forhøyet utskillelse av produkter i urin som indikerer økt oksidativ aktivitet ved inntak av 3,4 g trans10cis12 CLA/dag (1), (2). Disse funn har satt søkelyset på CLA og mulige uheldige helseeffekter. Ved supplementering tilfører man kroppen doser som ligger 10-20 ganger høyere enn ved et beregnet normalt kostinntak på 20-170 mg CLA/dag.

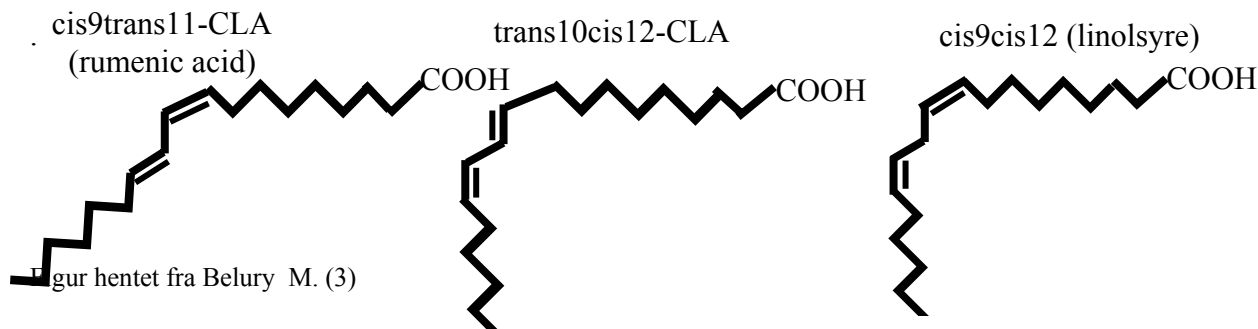
2. CLA

2.1 Kjemisk struktur

Konjugerte linolsyrer (CLA) består av 18 karbonatomer og har 2 dobbeltbindinger, dvs de har den samme kjemiske formelen som linolsyre (C18:2).

Dobbeltbindingene i CLA fettsyrene er konjugerte, dvs. er adskilt av en enkeltbinding, og ikke to som i linolsyre. Dobbeltbindingene i de ulike CLA isomerene kan sitte enten i 8 og 10 posisjon, eller i 9,11, eller 10,12 eller 11,13 posisjon, hvor det første tallet angir karbonatomet regnet fra karboksylsyren se fig 1. I tillegg til ulik plassering av dobbeltbindingene, kan fettsyren ha ulike geometriske former på grunn av cis-trans isomeri. Totalt antall mulige forskjellige geometriske former av CLA blir derfor 16 (4x4, trans,trans; trans,cis; cis,trans og cis,cis).

Fig 1. Struktur av isomerene cis9trans11-CLA, trans10cis12-CLA og linolsyre.



2.2 Biosyntese

Biosyntese av CLA skjer naturlig i vommen hos drøvtyggere ved en bakteriell enzymatisk gjæringsprosess av linolsyre og ved hjelp av bakterien *Butyrovibrio fibrisolvens*. Under denne prosessen blir hovedsakelig den geometriske isomerer cis9trans11-CLA dannet (rumenic acid)(4), mens de femten andre isomerene av CLA som har vært identifisert i melkefett, til sammen utgjør 15-22% av totalt CLA, inklusive små mengder av trans10cis12 isomerer (5). Norske analyser av fettsyresammensetningen i smør viser at ca. 0,7 % av fettsyrene i melkefett er CLA fettsyrer og at 95% av disse er cis9trans11-CLA, se tabell 1.

Tabell 1. Fettsyresammensetningen i norsk melkefett

Fettsyre	%
C4:0	4,86
C6:0	2,43
C8:0	1,29
C10:0	2,65
C11:0	0,29
C12:0	2,90
C14:0	10,28
C14:1 cis	0,91
C15:0	0,84
C16:0	27,03
C16:1 trans	0,84
C16:1 cis	1,43
C17:0	0,50
C18:0	12,31
C18:1 trans	2,79
C18:1 cis	25,88
C18:2 cis cis	1,47
C18:3 cis cis cis	0,43
C18:2 konjugert (95% som cis9trans11)	0,70
C20:0	0,17

Kilde: TINE FoU. Resultatene er basert på 341 smørprøver som ble analysert i 1991. Prøvene var tatt ut på 10 meierier i ulike landsdeler, 1 prøve per meieri per måned over 1 år.

En annen kilde til CLA hos drøvtyggere er syntese via delta9-desaturase av trans-11 oktadekoensyre (vaccensyre) (6)(Figur 2).

Hos mennesker har man ikke sett noen egenproduksjon av CLA fra linolsyre (7), men studier med vaccensyre i dietten viser at det skjer en konvertering til cis9trans11 CLA, sannsynligvis ved hjelp av Δ -9-desaturase (8;9). Dette tyder på at man bør ta hensyn til inntak av vaccensyre når konsentrasjonen av cis9trans11 inntaket skal vurderes.

2.3 Naturlige kilder i kostholdet

Den største kilden til CLA i humant fettvev kommer fra melk og melkeprodukter, og man ser en positiv korrelasjon mellom mengde CLA i humant fettvev og fettinntak fra melk. Andre kilder til CLA i kostholdet er kjøtt fra drøvtyggere, men små mengder forekommer også i andre fettrike matvarer, tabell 2.

På et normalt norsk kosthold er inntaket av CLA beregnet å ligge mellom 20-170 mg/dag. Serumnivået av CLA hos mennesker er i størrelsesorden 20-70 μ M/l, hvorav cis9trans11-isomeren utgjør omtrent 80% og trans10cis12-isomeren 10% (10).

Tabell 2

Matvare	mg CLA/g fett
Melk	3,4 – 6,4
Smør	4,7
Yoghurt	4,8
Ost	4,1 – 8,0
Lammekjøtt	5,8
Oksekjøtt	4,3
Kalvekjøtt	2,7
Kylling	0,9
Svinekjøtt	0,6
Eggeplomme	0,6
Laks	0,3

Data er hentet fra gruppen til Pariza (11)

2.4 Fremstilling av syntetiske CLA-preparat.

Kommersielle CLA produkter fremstilles vanligvis ved oppvarming av solsikkeolje eller tistelolje i et basisk miljø. Sluttproduktets innhold av CLA fettsyrer avhenger av mengde linolsyre i utgangsoljen. De fleste produkter består av de fire isomerene trans8cis10, cis9trans11, trans10cis12 og cis11trans13, men ulike cis,cis isomere og transt,trans isomerer kan også forekomme (12). I de fleste CLA produktene forekommer fettsyrene i fri form, men i de sist utviklede produktene som triglyserider. Forskning har vist at cis9trans11 og trans10cis12 isomerene har de egenskapene som produsentene hevder at CLA besitter, dvs fettvevsreduserende, antikarsinogent, immunstimulerende og forebygger aterosklerose og diabetes type II. Derfor prøver man nå å foredle produktene slik at innholdet av disse isomerene utgjør størsteparten av CLA fettsyrene.

2.4.1 Sammensetning av ulike kommersielle produkter

I Tonalin®, som er det ledende produktet på det norske markedet, utgjør cis9trans11-CLA 39% og trans10cis12-CLA isomeren ca. 41%. I tillegg finnes de ulike isomerene cis9cis11-CLA, cis10trans12-CLA, trans9trans11-CLA,

trans10trans12-CLA og isomerer av 7,9-CLA, 8,10-CLA og 11,13-CLA totalt i en konsentrasjon på 5%. Dessuten består CLA oljen fra Tonalin®, av ca. 0,5% linolsyre, 5,5% oljesyre og 4% fettsyrer som ikke er identifisert (3). Andre kommersielle preparater kan ha en litt annerledes isomerfordeling, men forholdet mellom cis9trans11 og trans10cis12 ligger rundt 1 i de fleste syntetiske produkter (13;14). Cis11trans13- isomerer akkumuleres i lever og hjertemuskel hos gris (15), og produsentene prøver derfor å redusere mengden av denne isomerer. Imidlertid kan denne isomerer utgjøre 7-15% av CLA-isomererene i enkelte preparater (12), se tabell 3.

Tabell 3. Produkt analyse. Innhold oppgitt i %. (c =cis, t=trans konfigurering)

Produkt	Antall CLA isomerer	CLA c9,t11	CLA t10,c12	CLA c,c	CLA t,t	CLA c11t13	CLA t8,c10	Andre CLA isomerer	Totalt CLA
Tonalin-FFA (Natural)	2	38,73	41	2,42	1,58	0,2	0,24	0,2	84,37
Tonalin-TG (Natural)	2	37,49	38,02	1,88	1,95	0,6	0,39	0,44	80,77
Tonalin –FFA (PharmaNutrients)	4	11,44	14,69	6,74	6	15,34	10,79	-	65
Clarinol –TG (Loders & Croklaan)	2	39,36	38,16	0,75	0,38	0,28	-	1,55	80,48
CLA-kapsler FFA (Fitness Pharma)	4	21,7 +t8c10	19,1	4,2	3,1	8,5	21,7 +t10c12	-	56,6

Tabell er hentet fra Gaullier et al. (12)

2.4.2 Anbefalt dosering og bruk

På pakningen til de fleste kommersielle produkter som Tonalin® fra Natural, Bio-CLA® fra PharmaNord, CLA fra Fitness Pharma og CLA fra Natures, anbefales en daglig dose på 2 til 3,4 g CLA. Dette vil gi et tilskudd av cis9trans11 og trans10cis12 isomerer på mellom 1,6 – 2,7 g daglig. Et av hovedargumentene til produsentene av CLA er at disse fettsyrer er naturlig forekommende, men at moderne matproduksjon har ført til en redusert mengde. Denne påstand kan kanskje til en viss grad forsvares når det gjelder cis9trans11 isomerer, men ikke når det gjelder trans10cis12 isomerer. Denne isomerer forekommer i meget små konsentrasjoner fra naturens side, og kostinntaket kan beregnes til 4-34 mg/dag. Ved supplementering med f.eks. 3,4 g Tonalin økes inntaket av denne isomerer ca. 70 ganger til 1462 mg/dag. Beregnet tilsvarende økning for cis9trans11 isomerer blir ca.10 ganger normalt kostinntaket.

I dyreforsøk som ligger til grunn for mange av påstandene til CLA, brukes det vanligvis doser på mellom 0,5 – 1 % av forvåtvekten (w/w), hvilket tilsvarer 2 - 4 energi% fra CLA. For en 60 kg person som spiser 2000 kcal/dag vil dette tilsvare 4-9 g CLA/dag. Dosene som brukes i dyreforsøk ligger ca. 5 ganger over det som anbefales til mennesker.

På Internettssidene til danske forhandlere av CLA- produkter står det at preparatet ikke bør brukes av gravide, og at den daglige dosen ikke bør overstige 5 g/dag, mens liknende informasjon ikke finnes på de norske Internettssidene eller på selve produktene.

2.5 Bruk av CLA produkter i Norge

Til tross for at CLA produkter ikke markedsføres som rene slankemidler i dag, men som muskeloppbyggende og fettvevsreducerende produkt ved slanking og fysisk aktivitet, er salget av produktene høyt. Bransjerådet for Naturmidler opplyser at forbrukerverdien av CLA-produkter var 80 millioner fra juli 2001 til og med juni 2002. Med en gjennomsnittskostnad på ca. 180 kr per enhet utgjør dette ca. 440.000 enheter per år, dvs at ca 10% av den norske befolkningen kjøpte et CLA-produkt i denne tidsperioden. Beregninger gjort på 7000 kvinner i den norske mor og barn undersøkelsen viser at 0,2% av de gravide kvinnene brukte et CLA kosttilskudd i 2001.

3. Studerte effekter av CLA

3.1 Effekt på fettvev

3.1.1 Dyreforsøk

Et tidlig arbeide viste at CLA reduserte fettvev hos voksende mus med 50% når de fikk en diett som inneholdt 1% w/w CLA i 28-32 dager (16). Flere studier fulgte på mus og rotter som dokumenterte den fettvevsreducerende egenskapen til CLA. I motsetning til funn i non-obese dyr, fant Sisk og medarbeidere (17) at obese Zucker rotter som fikk en diett med 0,5% CLA w/w i 5 uker fikk økt mengde fettvev. Man finner også kjønnsforskjeller i studier på gnagere hvor hanndyr ser ut å ha en større effekt av CLA supplementering enn hunndyr (3).

Pariza's gruppe (18;19) har vist at det er trans10cis12 isomeren som har størst effekt på fettvev og at denne isomeren reduserer opptaket av fett i dyrkede adipocytter ved å hemme lipoprotein lipase og steatoyl-CoA desaturase. Videre reduseres triglyserider og glyserol intacellulært samtidig som glyserolfrisetting til medium økes. Hva som skjer med fettsyrer som ikke blir transportert inn i fettvevet er foreløpig ukjent. I en supplementeringsstudie hvor hunnmus - C57BL/6J ble foret med 1% w/w CLA i 8 måneder (CLA blandingen bestod av 34% cis9trans11/ trans9cis11, 36% av trans10cis12, 3% av cis9cis11/cis10cis12 og 2% trans9trans11/trans10trans12) fant man et fullstendig bortfall av brunt fettvev, redusert leptin i blodet, og en massiv fettakkumulering i lever. I den samme studien kunne man også konstatere en utvikling av insulinresistens (20). Resultatet til Tsuboyama-Kasaoka og medarbeidere (20) har blitt dokumentert i en senere studie hvor mus som fikk 0,4 % w/w av trans10cis12 isomeren i 4 uker utviklet fettatrofi, fettlever og hyperinsulinemi, mens mus som fikk tilsvarende mengde av cis9trans11 isomeren eller linolsyre ikke viste noen målbare effekter av supplementeringen (21). Mens Tsuboyama-Kasaoka og medarbeider (20) kunne se apoptose i museadipocytter dyrket i kultur med samme konsentrasjon av trans10cis12 som det man fant ved et inntak på 0,36% w/w hos mus, fant man ikke den samme effekten i rotteadipocytter av trans10cis12 (22). Dette tyder på at apoptose effekten er artsavhengig.

Cis9trans11-CLA akkumuleres i større grad enn trans10cis12-CLA i lever, hud, bein og plasma fosfolipider, som igjen peker på at trans10cis12-isomeren metaboliseres raskere og kan utgjøre en mer metabolsk aktiv isomer av CLA (23).

Man mangler kunnskap om de andre isomerformenes metabolske egenskaper i forbindelse med fettvevslagring (24;25).

3.1.2 Humanforsøk

Humanstudier med CLA er først og fremst utført for å få dokumentert CLAs effekt som et slankeprodukt. Totalt er det publisert 14 studier som er referert i PubMed.

Blankson et al. (26) utførte et dose-responsforsøk på CLA med 60 overvektige kvinner og menn. Forsøkspersonene ble randomisert til 5 grupper hvor placebogruppen fikk 9 g olivenolje, og de fire CLA gruppene fikk doser på 1,7 g, 3,4 g, 5,1 g eller 6,8 g CLA per dag i 12 uker. Produktet som ble brukt var Tonalin® med 2 isomerer som frie fettsyrer. Alle deltakene fikk tilbud om trening. Ingen av gruppene viste statistisk signifikant endring av kroppsvekt, men alle gruppene som fikk CLA viste reduksjon av kroppsfett målt med DEXA teknikk, størst i gruppen som fikk 3,4 g og 6,8 g CLA/dag. Tap av kroppsfett ga ikke en lineær dose-respons. Man fant en reduksjon av plasma kolesterol som kunne forklares av en signifikant reduksjon i HDL-kolesterol i samtlige CLA grupper.

Berven og medarbeidere studerte 60 overvektige personer med en BMI på mellom 27,5-39,0 kg/m². Forsøkspersonene ble randomisert til en gruppe som fikk 4,5 g Tonalin® med 2 isomerer i form av frie fettsyrer, som tilsvarer 3,4 g CLA per dag, i 12 uker eller til en placebogruppe som fikk 4,5 g olivenolje per dag (27). Femtifem personer fullførte studien, og man fant ingen forskjeller i leverenzymmer, blodlipider, hematologiske variabler eller elektrolytter mellom CLA gruppen og placebogruppen. Det var ingen forskjeller mellom CLA- gruppen og placebogruppen i rapportering av bivirkninger. Tre forsøkspersoner i hver gruppe anga bivirkninger som diaré og gastritt.

Professor Vessbys gruppe i Uppsala har publisert flere studier hvor man har brukt Tonalin® med 2 isomerer i form av frie fettsyrer. I den første studien ble 24 overvektige menn med metabolsk syndrom og en gjennomsnitt BMI på 32 kg/m² randomisert til en CLA gruppe som fikk 4,2 g CLA per dag i 4 uker, og en placebogruppe som fikk 4,2 g olivenolje (28). Man fant at sagittal magediameter (SAD= magehøyden i liggende posisjon) viste en signifikant reduksjon på 0,6 cm, men ingen andre antropometriske mål var forandret. I den samme studien målte man en økt utskillelse av 8-iso-PGF_{2α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2α} i urin i behandlingsgruppen. To uker etter supplementeringsforsøket var utskillelsen normalisert. 8-iso-PGF_{2α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2α} er mål på ikke enzymatisk og enzymatisk katalysert fett oksidasjon (29).

I en annen studie fra den samme gruppen ble 53 friske normalvektige kvinner og menn randomisert til en gruppe som fikk 4,2 g CLA/dag (2 isomer CLA) i 12 uker (26 personer) og til en gruppe som fikk tilsvarende mengde olivenolje (24 personer). Inntaket av trans10cis12 og Cis9trans11 i denne studien var ~1280 mg/dag av hver isomer (30). Man fant en statistisk signifikant reduksjon i HDL-kolesterol i begge gruppene, men forskjellen var ikke signifikant mellom gruppene. Fastende blodsukker økte, men ikke statistisk signifikant, i gruppen som fikk CLA, mens fastende blodsukker gikk ned i kontrollgruppen. Forskjellen

mellom gruppene ble dermed signifikant. I CLA gruppen økte andelen av stearinsyre, dokosatetraensyre og docosapentaensyre i serumlipider og trombocytter, mens palmitinsyre, oljesyre og dihomo- γ -linolensyre minket. Forfatterne mener at dette tyder på at CLA supplementering hemmet aktiviteten av Δ -6 og Δ -9 desaturasen, mens Δ -5 desaturase aktiviteten økte, se figur 2a. Den samme studien ble fulgt opp med analyser av 8-iso-PGF_{2 α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2 α} og disse viste igjen en signifikant økt urinutskillelse etter 12 ukers supplementering i gruppen som fikk CLA(31).

I et forsøk på å undersøke om fettoksidasjon er isomerspesifikt, foretok professor Vessbys gruppe en studie på 60 overvektige menn med metabolsk syndrom (1). Tyve personer ble randomisert til en gruppe som fikk 3,4 g CLA som tilsvarte 2,08g ren trans10cis12 /dag (1 isomer CLA), 20 ble randomisert til en gruppe som fikk Tonalin blandingen (tilsvarer 0,98 g trans10cis12 og samme mengde med cis9trans11 /dag) og 20 forsøkspersoner til en placebogruppe som fikk 3,4 g olivenolje. Man fant at gruppen som fikk 2,08 g trans10cis12 isomerer hadde en forhøyet urinutskillelse av 8-iso-PGF_{2 α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2 α} . I tillegg fant man at gruppen med det høyeste inntaket av trans10cis12 isomerer hadde forhøyet serum CRP, insulinresistens hadde økt med 19% og HDL-kolesterol var redusert med 4% (2).

I en placebokontrollert studie utført under kontrollerte omgivelser på en metabolsk enhet på University of California, Davis, fikk 10 kvinner 3,9 CLA/dag av et produkt med 4 CLA-isomerer i 63 dager og 7 kvinner fikk tilsvarende mengde med solsikkeolje. Inntaket av trans10cis12 isomerer utgjorde ~23% av fettsyrene, dvs ~900 mg /dag med samme mengde med cis9trans11 isomerer. Denne studien viste ikke noen effekter på metabolismen av frie fettsyrer eller glycerol (32), blodplatefunksjon eller koagulering(25), monocytter (33), fastende blodsukker eller laktatkonsentrasjon (34), og plasma lipoproteiner(35). I arbeidet til Zambell ble det registrert økt serum insulin, men ikke nok til å vise en signifikant økning (32).

I en studie på 22 friske normalvektige forsøkspersoner ble 10 personer randomisert til en gruppe som fikk 0,7 g CLA (2 isomer CLA dvs 350 mg trans10cis12) i 4 uker og 1,4 g CLA (2 isomer CLA dvs 750 mg trans10cis12) i ytterligere 4 uker. Tolv personer ble randomisert til en placebogruppe som fikk tilsvarende mengde olje i form av soyaolje (36). Man fant en signifikant reduksjon i HDL-kolesterol i CLA gruppen sammenliknet med kontrollgruppen, men ratio total-kolesterol/HDL-kolesterol økte ikke signifikant. Studien viste at CLA fettsyrene i overveiende mengde ble inkorporert i fosfolipidfraksjonen.

3.1.3. Mulige fettvevsreduserende mekanismer

Flere studier beskriver ulike virkningsmekanismer av de to isomerformene cis9trans10 og trans10cis12 (37;38). Cis9trans11 isomerer ser ut å redusere serum konsentrasjonen av triglyserider og frie fettsyrer, mens trans10cis12 isomerer øker insulinresistens og serum konsentrasjonen av glukose og insulin. De ulike virkningsmekanismene til CLA isomerene kan forklare hvorfor man finne forskjellige resultat i de forskjellige supplementeringsstudiene. Man har også sett

at spesielt trans10cis12-isomeren kan redusere lagring av triglyserider i fettvev ved å hemme lipoprotein lipase (39). Dette kan bety at fettsyrene må finne andre lagringsplasser og her kan kanskje en transport til lever være resultatet (20;40).

Mulige forklaringer på reduksjon i fettvev ved supplementering med CLA hos voksende gnagere (18) og griser (41), kan være økt energiforbruk gjennom økt fettsyreoksidasjon i muskel- og fettvevsceller, som kan være en frikoblet betaoksidasjon (23;42). I mus har det vært observert økt produksjon av noradrenalin og adrenalin ved CLA supplementering, noe som igjen stimulerer mobilisering og nedbryting av fettsyrer og glykogen (43). Det ser altså ut som om noe av den fettreduserende effekten av CLA kan forklares ved økt energiproduksjon.

Den fettreduserende effekten av CLA har også vært tilskrevet økt apoptose av adipocytter (20). Apoptosen av adipocytter var koblet til økt TNF-alpha og uncoupling protein-2 (19). Økning av uncoupling protein-2 i muskler har blitt funnet ved CLA supplementering hos rotter og mus (44;45). Imidlertid var ikke uncoupling protein mRNA oppregulert ved CLA supplementering, og man mener derfor at effekten av CLA neppe kan tilskrives uncoupling protein-2 (45).

3.2 Antikarsinogene effekter

Det arbeidet som fikk interessen opp for CLA var Michael Parizas oppdagelse at CLA fettsyrer fra grillt oksekjøtt, hemmet kjemisk induisert mutagenitet og svulstdannelse i hud hos mus (46). Dette arbeidet førte til studier for å undersøke den antikarsinogene effekten. Under utprøving fant man i tillegg at CLA påvirket immunapparatet, hadde antiaterosklerotiske effekter, kunne påvirke matinntak og vekst og påvirket kroppssammensetningen i forsøksdyr(47).

I arbeidet med å finne svar på CLAs antikarsinogene effekt har man funnet at den kommersielle blandingen av CLA med 2 isomerer ved et inntak på 0,5-1,5% av energiinntaket, hemmer initiering og promosjon av kjemisk induisert hudmamma- og coloncancer i ulike dyremodeller (48). Men ikke alle studier finner den samme overbevisende antikarsinogene effekten av CLA. Blant annet fant man ikke noen redusert svulstdannelse i colon hos $Apc^{Min/+}$ mus som fikk en 3% CLA supplementert diett (49). Ingen dyrestudier har vist at CLA øker svulstdannelse (48).

3.2.1 Mulige antikarsinogene mekanismer av CLA

Den antikarsinogene effekten av CLA har vært studert med hensyn til initiering, promosjon og progresjon av kreft i ulike dyremodeller, og spesielt har påvirkning av initieringen vært studert.

Mulig virkningsmekanisme av CLA ved å motvirke oksidasjon av fett har vært studert, men er ikke fullt utredet. Ip et al. (50) fant redusert produksjon av malonaldehyd i brystvev når hunnrotter som ble utsatt for karsinogener fikk CLA. Dette kunne tyde på at CLA kan ha en antioksidativ effekt.

Redusert celleproliferasjon som en mulig antikarsinogen effekt har vært undersøkt i cellekulturer og dyremodeller. Resultatene så langt er vanskelige å tolke, og man finner at CLA virker både vevsspesifikt og spesifikt for svulstmodellen (3). Økt

apoptose av CLA har man sett i brystvev (51), levervev og fettvev (20) og dette kan også være en mulig forklaring på den antikarsinogene effekten.

Videre har man funnet at cis9trans11 isomeren reduserte vekst av brystkreftceller i kultur med 60%, mens trans10cis12 isomeren kun ga 15% reduksjon (52). Dette kan tyde på at cis9trans11 har en større antikarsinogen effekt enn trans10cis12 isomeren.

Andre mulige antikarsinogene effekter av CLA fettsyrer kan være gjennom redusert prostaglandinsyntese. Studier har vist reduksjon av leukotrien B₄ (LTB₄) samt en reduksjon i serum nivået av PGE₂ ved økende doser av CLA (53;54). Videre viste en studie på humane endotelceller at både cis9trans11 og trans10cis12 isomerene hemmet produksjonen av eicosanoider, men at høye doser av trans10cis12 hadde en pro-inflammatorisk effekt ved å gi økt produksjon av eicosanoider (55). I en CLA blandingen med cis9trans11 og trans10cis12 i forhold 1:1 var den totale eicosanoidproduksjonen redusert, også ved høye konsentrasjoner (55). Det finnes flere mulige veier hvor CLA fettsyrene kan hemme proinflammatorisk eicosanoid-produksjon. Belury (3) hevder at CLA konkurrerer med arakidonsyre (AA) som substrat eller som en antagonist til cyclooxygenasen, se figur 2b. Effekten kan med stor sannsynlighet også tilskrives at vi får dannet konjugerte arakidonsyreisomerer, som ikke går videre til produksjon av proinflammatoriske eicosanoider, se figur 2b. Det er også mulig at CLA utøver sin effekt gjennom å redusere tilgjengelig AA til produksjon av PGE₂ ved å erstatte AA i fosfolipider, eller ved å redusere tilgjengeligheten av linolsyre for produksjon av AA (55).

I et arbeid fra en Nederlandske kohortstudie med 62 573 kvinner i alderen 55-69 år, studerte man sammenhengen mellom forekomst av brystkreft og inntak av ulike fettsyrer (56). I studien utviklet 941 kvinner brystkreft under en oppfølgingstid på 6,3 år. CLA inntaket viste en svak positiv korrelasjon med kreftinsidensen (relativ risiko for inntak av CLA i den høyeste kvintilen sammenliknet med den laveste var 1,24 med p<0,02 før trend)(56). Dette tyder på at inntak av den naturlige isomeren cis9trans11 ikke hadde noen beskyttende effekt for utvikling av brystkreft hos kvinner.

Figur 2a.

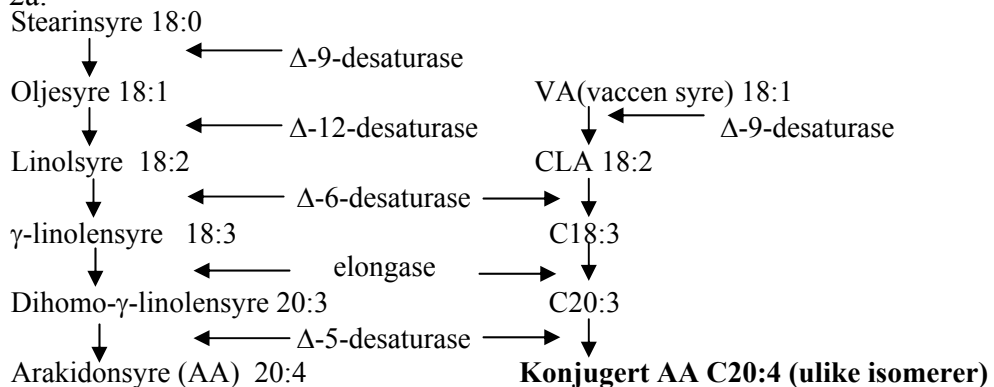
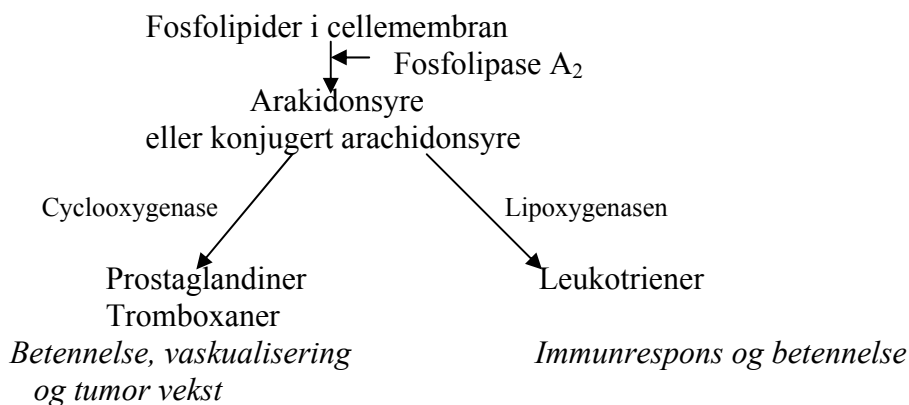


Fig 2b.



4. Lipidmønster

4.1 CLA forandrer lipidprofiler

Mens flere dyrestudier har vist at CLA bedrer blodlipidmønsteret og hemmer utviklingen av aterosklerose (57), har en studie på friske personer vist at plasma HDL-kolesterol reduseres, mens total-kolesterolet er uforandret (36). Det samme fant man i studier på menn med metabolsk syndrom (2). I en studie fra Irland ble 51 friske forsøkspersoner randomisert i tre grupper, hvor den ene gruppen fikk 3g CLA 50:50 med cis9trans11/trans10cis12, den andre gruppen fikk 3g av en blanding med 80:20 av cis9trans11/trans10cis12 og den tredje gruppen fikk placebo (linolsyre) (58). Resultatet etter 8 ukers supplementering viste at gruppen som hadde fått 80:20 blandingen hadde en signifikant reduksjon i VLDL-kolesterol, ellers fant man ingen forskjeller. Cis9trans11 ser muligens ut til å kunne ha en gunstig effekt som vil kunne virke forebyggende på den aterosklerotiske prosessen ved å redusere VLDL-kolesterol.

Både cis9trans11 og trans10cis12 er transfettsyrer. I en metaanalysestudie har man dokumentert at blodlipider og lipoproteiner påvirkes i negativ retning ved et økt inntak av industrielt fremstilte transfettsyrer (59). Denne metaanalysen viste at en økning på 2 energiprosent i inntak av transfettsyrer øker forholdet mellom LDL-kolesterol og HDL-kolesterol med 0,1, som svarer til en 5% økning i risiko for å utvikle hjertekarsykdom. Et inntak på 3,5 g CLA fettsyrer svarer til 1,5 energiprosent av et daglig inntak på 2000 kcal. Supplementering med CLA har derfor potensialet til å påvirke blodlipidene i negativ retning, hvilket også ser ut å bli dokumentert i humanstudiene.

En dose-responsstudie på rotter ble utført med serum lipoproteiner, fosfolipider i lever og kroppssammensetning som endepunktet (60). Med 10 rotter i hver gruppe ble gruppene randomisert til 0%, 1%, 3% eller 5% av formengden som CLA i erstatning for solsikkeolje i 5 uker. Mens man så liten effekt på kroppssammensetning og i gruppen som fikk 1% som CLA, ble mønsteret av CLA fettsyrer i fosfolipider forandret i 3% og 5% gruppen i stigende grad. Videre fikk man en dose-relatert reduksjon av totalt serum kolesterol og HDL-kolesterol, men ratio total kolesterol/HDL-kolesterol ble ikke forandret. Man fant en dose-relatert økning av blodglukose med økende CLA inntak. Dette styrker funnet fra

humanstudien som viser økt insulinresistens ved CLA supplementering til menn med metabolsk syndrom (1).

5. CLA og graviditet

5.1 CLA påvirker fosterveksten

I en studie hvor man har korrelert plasma CLA i navlestrengsblod med graviditetslengde, barnets lengde og vekt ved fødsel fant man negative korrelasjoner med alle tre variablene og CLA (61). Denne studien var ingen intervensjonsstudie og beregner kun effekten av cis9trans11, som kvinnene har fått gjennom sitt kostinntak. Man fant også at konsentrasjonen av CLA i TG i navlestrengsblod var 2 ganger så høy som i morens blod. På bakgrunn av denne studien har man beregnet at for hver prosent som CLA-konsentrasjonen øker vil barnets vekt minke med 310 g. Man fant også at barnets fødselslengde korrelerte negativt til CLA konsentrasjonen i TG. Fordi man ikke har sett liknende effekter av cis9trans11 isomeren i dyrestudier, konkluderer man med at andre faktorer enn CLA fra melkeprodukter og kjøtt kan forklare utfallet, men at man bør se nærmere på CLA i forbindelse med graviditet (61).

5.2 CLA påvirker melkproduksjonen

Fra studier på kyr har man sett at melkefettkonsentrasjonen i melk går ned samtidig som CLA konsentrasjonen går opp når man supplementerer dietten med CLA (62). For å undersøke om det samme gjelder for mennesker ble 9 ammende kvinner inkludert i en placebokontrollert "crossover" studie hvor kvinnene ble supplementert med 2 kapsler med Tonalin® eller olivenolje per dag i 5 dager med 7 dagers mellomrom. CLA supplementering førte til en signifikant reduksjon av total fettmengde i morsmelken sammenliknet med placebo, og med en økning av både cis9trans11 og trans10cis12 isomer konsentrasjonen (13).

6. Diskusjon

6.1 Generell vurdering av mulig helseskadelig effekt av CLA

Vårt oppdrag fra SNT har vært å vurdere mulige helseskadelige effekter av CLA supplementering etter at det er innrapportert 4 tilfeller med alvorlige bivirkninger til Statens legemiddelverk i forbindelse med CLA bruk.

Til dette arbeid har vi brukt tilgjengelig litteratur på PubMed, fordi studier publisert i vitenskapelige godkjente tidsskrifter med "referee" ordning gir en første kvalitetskontroll. Ved kun å bruke PubMed kan studier som viser helseskadelige effekter av CLA supplementering ha bli oversett, men de artikler som har blitt funnet utenom PubMed har kun vært studier for å dokumentere positiv helseeffekt. Totalt har vi funnet 12 supplementeringsstudier på mennesker med 19 tilhørende publikasjoner. Resultatene av disse studiene må sies å være skuffende ut fra løfte om CLA som et middel som skal "bedre balansen mellom fettvev og muskelvev". Kun i 6 av 10 studier hvor man målte vekt og fettmasse kunne man dokumentere redusert fettmasse, men i samtlige av disse kan metodikk

og klinisk relevans diskuteres (26;28;30;63). For oversikt over de kliniske studiene se Appendix I.

Med henblikk på mulige helseskadelige effekter er det to momenter som må sammenliknes nemlig isomersammensetningen i produktene og dosene som er brukt. I de fleste studiene (9 st.) er det brukt Tonalin® med 2 isomerer i form av frie fettsyrer (2;26-28;30;63;64). I 5 av disse er det brukt 4,2-4,5 g av CLA produktet (27;28;30), og i de resterende studiene lavere doser (1,5-1,8g/dag), bortsett fra studien til Blankson som var en dose-respons studie med 1,7-6,8 g CLA/dag. I de resterende 3 studiene er det brukt en 4 isomerblanding i en studie (65), en 2 isomer blanding produsert av en tysk produsent (TrofoCell) i en studie (36) og i den siste studien 2 isomer produkter med forskjellig konsentrasjon av cis⁹trans¹¹ og trans¹⁰cis¹² isomerene produsert av et nederlandsk firma (Loders Crooklann) (58). Tonalin® har nå et produkt hvor CLA fettsyrene er bundet som triglyserider. Produsenten hevder at dette er et mer naturlig produkt sammenliknet med Tonalin® hvor CLA foreligger som frie fettsyrer. Imidlertid må det påpekes at det ikke foreligger noen studier som kan bekrefte en slik påstand.

I samtlige studier hvor man har målt en reduksjon av fettvev ved CLA supplementering og samtidig har målt blodlipidmønsteret, ser man en negativ forandring av dette. I de fleste av disse studiene har man funnet en reduksjon av HDL-kolesterol (2;26;36), mens man i studien til Smedman og medarbeidere fant forandringer i fettsyresammensetningen i serum og trombocytter som svarer til minket aktivitet av Δ -6 og Δ -9 desaturasen og økt aktivitet av Δ -5 desaturasen. I tillegg viste studien til Riserus og medarbeidere at et inntak på 2,08 g trans¹⁰cis¹² CLA/dag gir et økt insulinresistenssvar og et redusert HDL-kolesterol (1;2). I denne studien fant man ikke noen signifikant forandringer hos de forsøkspersonene som fikk en lavere dose av trans¹⁰cis¹² isomerene (0,98 g/dag). Resultatene tyder på at trans¹⁰cis¹² isomerene er en mer aktiv metabolitt når det gjelder disse effektene og dette bekreftes også av funn i dyrestudier.

I studiene til Riserus og medarbeidere hvor man har målt utskillelsen av 8-iso-PGF_{2 α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2 α} i urin fant man denne forhøyet hos menn med metabolsk syndrom (1;29). Utskillelse av 8-iso-PGF_{2 α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2 α} i urin er et mål på både enzymatisk og ikke enzymatisk katalysert fettoksidasjon. Resultatet er ikke bekreftet av andre forskergrupper, dvs. metabolittene har ikke blitt målt av andre forskergrupper. Dette kan tyde på at et ikke fysiologiske inntak av CLA kan forårsake metabolsk stress og ha proinflammatorisk effekt på mennesker.

Mekanismene for CLA isomerenes påvirkning på fettmetabolismen er foreløpig ikke dokumentert. At det må være andre mekanismer enn ved naturlig vektreduksjon virker sannsynlig, siden man finner redusert konsentrasjon av HDL-kolesterol, økt insulinresistens og økt fettoksidasjon. Man har imidlertid ikke sett forandringer på leverenzymmer eller elektrolytter som følge av CLA-supplementering (27).

Kun i en studie vurderes påvirkning av CLA supplementering på morsmelk (13). En signifikant reduksjon av fettkonsentrasjon i morsmelken er helt i tråd med hva man har funnet hos kuer ved CLA supplementering (62). En slik reduksjon i fettinnholdet er meget uheldig.

6.2 Vurdering av innrapporterte bivirkninger fra Legemiddelverket

På grunnlag av foreliggende dokumentasjon kan leversteatose innrapportert til Statens legemiddelverk i forbindelse med CLA supplementering være forenlig med årsakssammenheng med CLA inntaket. Pulmonal hypertensjon og pankreatitt finner vi derimot ikke beskrevet i litteraturen

6.3 Konklusjon

Produsenter og distributører av CLA-produkter kommer med feilaktige påstander ved å hevde at man erstatter kostholdet med et produkt som har blitt forringet gjennom moderne matproduksjon. Isomeren trans10cis12 har aldri forekommet naturlig i den konsentrasjonen som man blir anbefalt å supplementere kosten med. Den samme isomeren ser ut å være den aktive isomeren i forhold til å redusere fettvev og å forårsake steatose i dyrestudier. Dessuten ser denne isomeren ut til å ha den mest uheldige effekten på metabolske parametere i menneske

Det foreligger få humanstudier som bakgrunn for å vurdere mulige helseskadelige effekter eller fravær av slike. I studiene hvor man kan vise til en ønsket fettvevsreduksjon ser man også metabolske forandringer som reduksjon av HDL-kolesterol, økt insulinresistens og økt utskillelse av 8-iso-PGF_{2α} og 15-oxo-dihydro-PGF_{2α} i urin. Dokumentasjonen tyder foreløpig på at CLA supplementering kan ha meget uheldige virkninger på menn med metabolsk syndrom, gravide og ammende kvinner. Det bør også opplyses at HDL-kolesterol nivået kan bli redusert ved bruk av CLA.

7. Oppsummering

- Ulike CLA isomerer har ulike biologiske effekter.
- Studiene er vanskelige å tolke på grunn av at CLA produktene som brukes inneholder forskjellige mengder av de ulike CLA isomerene.
- Det foreligger kun et fåtall korttidsstudier på mennesker (12 uker)
- CLA supplementering har dokumentert uheldige effekter i overvektige menn med metabolsk syndrom.
- Konsistente funn av CLA som et fettvevsreduserende middel hos overvektige foreligger ikke, men bruk av CLA innebærer øket risiko for insulinresistens, økt konsentrasjon av CRP og steatose (dyremodeller).
- Feilaktig reklame ved å hevde at man erstatter kostholdet med et produkt som har blitt forringet gjennom moderne matproduksjon. Isomeren trans10cis12 har aldri forekommet naturlig i den konsentrasjonen som man supplementerer med.
- CLA isomerene cis9trans11 og trans10cis12 er transfettsyrer. En reduksjon av HDL-kolesterolet som følge av CLA supplementering i humanstudiene, tyder også på at disse produktene har en negativ effekt på lipidmønsteret.

- Dokumentasjon viser at et høy inntak av CLA gjennom kosten hos gravide kvinner, dvs uten supplementering, er assosiert med lavere fødselsvekt og lengde.
- Hos ammende kvinner går fettprosenten i morsmelken ned ved CLA supplementering, også ved relativt lav dose (1,5 g CLA /dag dvs 2 kapsler Tonalin/dag)

Referanse list

1. Riserus U, Basu S, Jovinge S, Fredrikson GN, Arnlov J, Vessby B. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation* 2002;106:1925-9.
2. Riserus U, Arner P, Brismar K, Vessby B. Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2002;25:1516-21.
3. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu.Rev.Nutr.* 2002;22:505-31.
4. Ma DW, Wierzbicki AA, Field CJ, Clandinin MT. Conjugated linoleic acid in canadian dairy and beef products. *J.Agric.Food Chem.* 1999;47:1956-60.
5. Sehat N, Kramer JK, Mossoba MM et al. Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids* 1998;33:963-71.
6. Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KV, Bauman DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. *J Nutr* 2000.Sep.;130.(9.):2285.-91.130:2285-91.
7. Herbel BK, McGuire MK, McGuire MA, Shultz TD. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 1998;67:332-7.
8. Adlof RO, Duval S, Emken EA. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids* 2000;35:131-5.
9. Turpeinen AM, Mutanen M, Aro A et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002;76:504-10.
10. Fogerty A, Ford G, Svoronos D. Octadeca-9-11-dienoic acid in foodstuff and in lipids of human blood and breast milk. *Nutr Reports Int* 1988;38:937-44.
11. Chin S, Liu J, Storkson Y, Ha M, Pariza MW. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Comp Anal* 1992;5:185-97.
12. Gaullier JM, Berven G, Blankson H, Gudmundsen O. Clinical trial results support a preference for using CLA preparations enriched with two isomers rather than four isomers in human studies. *Lipids* 2002;37:1019-25.

13. Masters N, McGuire MA, Beerman KA, Dasgupta N, McGuire MK. Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. *Lipids* 2002;37:133-8.
14. Christie WW, Dobson G, Gunstone FD. Isomers in commercial samples of conjugated linoleic acid. *Lipids* 1997;32:1231.
15. Kramer JK, Sehat N, Dugan ME et al. Distributions of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid chromatography. *Lipids* 1998;33:549-58.
16. Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997;32:853-8.
17. Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J.Nutr.* 2001;131:1668-74.
18. Park Y, Storkson JM, Albright KJ, Liu W, Pariza MW. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 1999;34:235-41.
19. Pariza MW, Park Y, Cook ME. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 2000;223:8-13.
20. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000;49:1534-42.
21. Clement L, Poirier H, Niot I et al. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J.Lipid Res.* 2002;43:1400-9.
22. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J.Nutr.* 2000;130:1548-54.
23. de Deckere EA, van Amelsvoort JM, McNeill GP, Jones P. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster. *Br.J.Nutr.* 1999;82:309-17.
24. Banni S, Carta G, Angioni E et al. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *J.Lipid Res.* 2001;42:1056-61.
25. Benito P, Nelson GJ, Kelley DS, Bartolini G, Schmidt PC, Simon V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 2001;36:229-36.

26. Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J.Nutr.* 2000;130:2943-8.
27. Berven, G., Bye A, Hals O, Blankson, H., Fagertun, H., Thom, E., Wadstein, J., and Gudmundsen, O. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. *Eur.J.Lipid Sci.Technol* 102, 455-462. 2000.
28. Riserus U, Berglund L, Vessby B. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.* 2001;25:1129-35.
29. Basu S, Riserus U, Turpeinen A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in men with abdominal obesity. *Clin.Sci.(Lond)* 2000;99:511-6.
30. Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids* 2001;36:773-81.
31. Basu S, Smedman A, Vessby B. Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett.* 2000;468:33-6.
32. Zambell KL, Horn WF, Keim NL. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on fatty acid and glycerol kinetics. *Lipids* 2001;36:767-72.
33. Kelley DS, Simon VA, Taylor PC et al. Dietary supplementation with conjugated linoleic acid increased its concentration in human peripheral blood mononuclear cells, but did not alter their function. *Lipids* 2001;36:669-74.
34. Medina EA, Horn WF, Keim NL et al. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* 2000;35:783-8.
35. Benito P, Nelson GJ, Kelley DS, Bartolini G, Schmidt PC, Simon V. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids* 2001.Mar.;36.(3.):229.-36.36:229-36.
36. Mougios V, Matsakas A, Petridou A et al. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J.Nutr.Biochem.* 2001;12:585-94.
37. Ding ST, McNeel RL, Mersmann HJ. MODULATION OF ADIPOCYTE DETERMINATION AND DIFFERENTIATION-DEPENDENT FACTOR 1 BY SELECTED POLYUNSATURATED FATTY ACIDS. *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 2002;38:352-7.

38. Roche HM, Noone E, Sewter C et al. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRalpha. *Diabetes* 2002;51:2037-44.
39. Park Y, Pariza MW. The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice. *Biochim.Biophys.Acta* 2001;1533:171-4.
40. Yamasaki M, Mansho K, Mishima H et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *J.Agric.Food Chem.* 2000;48:6367-71.
41. Thiel-Cooper RL, Parrish FC, Jr., Sparks JC, Wiegand BR, Ewan RC. Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J.Anim Sci.* 2001;79:1821-8.
42. Martin JC, Gregoire S, Siess MH et al. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids* 2000;35:91-8.
43. Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids* 2001;36:583-7.
44. Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM et al. Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes* 2001;50:1149-57.
45. West DB, Blohm FY, Truett AA, DeLany JP. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J.Nutr.* 2000;130:2471-7.
46. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 1987;8:1881-7.
47. Evans M, Brown J, McIntosh M. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J.Nutr.Biochem.* 2002;13:508.
48. Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J.Nutr.* 2002;132:2995-8.
49. Petrik MB, McEntee MF, Johnson BT, Obukowicz MG, Whelan J. Highly unsaturated (n-3) fatty acids, but not alpha-linolenic, conjugated linoleic or gamma-linolenic acids, reduce tumorigenesis in Apc(Min/+) mice. *J.Nutr.* 2000;130:2434-43.
50. Ip C, !Lost Data, !Lost Data, Thompson HJ, !Lost Data, Scimeca JA. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis* 1996;17:1045-50.

51. Ip C, Banni S, Angioni E et al. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J.Nutr.* 1999;129:2135-42.
52. Durgam VR FG. The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett.* 1997;116:121-30.
53. Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M, Yamada K. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. *Lipids* 1998;33:521-7.
54. Liu KL, Belury MA. Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes. *Cancer Lett.* 1998;127:15-22.
55. Urquhart P, Parkin SM, Rogers JS, Bosley JA, Nicolaou A. The effect of conjugated linoleic acid on arachidonic acid metabolism and eicosanoid production in human saphenous vein endothelial cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1580:150-60.
56. Voorrips LE, Brants HA, Kardinaal AF, Hiddink GJ, van den Brandt PA, Goldbohm RA. Intake of conjugated linoleic acid, fat, and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am.J.Clin.Nutr.* 2002;76:873-82.
57. Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, Tso P, Czarnecki SK. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J.Am.Coll.Nutr.* 2000;19:472S-7S.
58. Noone EJ, Roche HM, Nugent AP, Gibney MJ. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Br.J.Nutr.* 2002;88:243-51.
59. Ascherio A, Katan MB, Zock PL, Stampfer MJ, Willett WC. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N.Engl.J.Med.* 1999;340:1994-8.
60. Stangl GI. High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid class profile and cholesterol-carrying serum lipoproteins of rats. 2000;11:184-91.
61. Elias SL, Innis SM. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoleic acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. *Am.J.Clin.Nutr.* 2001;73:807-14.
62. Perfield JW, Bernal-Santos G, Overton TR, Bauman DE. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J.Dairy Sci.* 2002;85:2609-17.
63. Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J.Int.Med.Res.* 2001;29:392-6.

64. Kreider RB, Ferreira MP, Greenwood M, Wilson M, Almada AL. Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *J.Strength.Cond.Res.* 2002;16:325-34.
65. Zambell KL, Keim NL, Van Loan MD et al. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 2000.Jul.;35.(7.):777.-82.35:777-82.