
RAPPORT NR. 2206 | Jennifer Mildenberger

FORSKNINGSBASERT UTVIKLING AV MEDISIN FRA MARINE INGREDIENSER

TITTEL	Forskningsbasert utvikling av medisin fra marine ingredienser
FORFATTERE	Jennifer Mildenberger
PROSJEKTLÉDER	Jennifer Mildenberger
RAPPORT NR.	2206
UTGIVELSEÅR	2022
SIDER	19
PROSJEKTNUMMER	2020-0349 (MF: 55138)
PROSJEKTTITTEL	Forskningsbasert utvikling av medisin fra marine ingredienser
OPPDRAGSGIVER	M&R fylkeskommune ved Marint miljøsikrings- og verdiskapingsfond
ANSVARLIG UTGIVER	Møreforskning AS
ISSN	0806-0789
ISBN	978-82-7830-362-7
DISTRIBUSJON	www.moreforskning.no
NØKKEWORD	Cellemodeller, marine ingredienser, immunceller, betennelse, hud, marine oljer, resolusjonsmediatorer

SAMMENDRAG

Forskningen viser at marine ingredienser i kostholdet har en balanserende effekt på betennelsestilstander og kan dermed forebygge utviklingen av relaterte kroniske sykdommer som hjerte- og karsykdommer, metabolsk syndrom og diabetes, flere kreftformer, samt auto-immune og nevrodegenerative sykdommer. Prosjektet har etablert relevante cellemodeller til forskning på helseeffekter av marine ingredienser. Det ble etablert metoder for isolering av monocytter og T-celler fra perifert blod som brukes i analyser knyttet til immunregulatoriske og betennelsesmodulerende effekter av marine ingredienser. I tillegg ble kommersielle 3D-modeller av hudceller testet som er grunnlaget for nye muligheter innen marine hudprodukter. I likhet vil også tarmvevmodeller kunne brukes til analysen av opptak av komponenter i tarmen. Prosjektet har bidratt til økt forskningskapasitet og etablering av regional infrastruktur for samarbeid med regionale næringsaktører i utviklingen av marine ingredienser til helsefremmende produkter.

© FORFATTER/MØREFORSKING

Forskriftene i åndsverkloven gjelder for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller framstille eksemplarer til privat bruk. Uten særlig avtale med forfatter/Møreforskning er all annen eksemplarframstilling og tilgjengeliggjøring bare tillatt så langt det har hjemmel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettighetshavere til åndsverk.

FORORD

Både regionale, nasjonale og europeiske strategier fokuserer på at langt mer av ressursene i havet må benyttes til matproduksjon og i utviklingen av nye bioteknologiske og medisinske produkter for å møte noen av de utfordringene samfunnet står overfor. I Forsknings- og innovasjonsstrategien til Møre og Romsdal er ett av de sentrale målene å bygge opp marin sektor gjennom bærekraftig utnyttelse av råstoff fra havet til mer høyverdige produkt som dermed bidrar til økt verdiskaping. Nærmere 10 % av den globale foredlingen av biomarine ingredienser skjer i regionen som dermed er svært godt posisjonert for å kunne utnytte verdiskapingspotensialet. Et viktig bidrag for å sikre dette er relevante forskningsmiljø som bidrar med kompetanse, kulturforståelse og som har tradisjon for oppdragsforskning. I 2019 ble «Regjeringa sin strategi for auka verdiskaping frå marint restråstoff» presentert, også her fokuseres det på potensialet i produksjon av mer høyverdige produkter for humant konsum. Produkt basert på marint restråstoff til humant konsum og til ingredienser rettet mot helsekost, kosmetikk og farmasi krever høy kvalitet på råstoffet gjennom hele verdikjeden. Produksjon av mer høyverdige produkt stiller høyere krav til kompetanse og prosesser, strenge krav til dokumentasjon og dermed også større investeringer og økte kostnader. Endringen fra fokuset på salg av lite bearbeidet råvarer til kunnskapsbaserte produkt krever investering i forskning og utvikling.

Vi takker Møre og Romsdal fylkeskommune for tildelingen av en ett-års postdoktorstilling til gjennomføring av prosjektet «Forskningsbasert utvikling av medisin fra marine ingredienser». Gjennom prosjektet har man bygget kompetanse og infrastruktur knyttet til forskning på marine ingredienser. I tråd med Møre og Romsdal sin FoI-strategi har prosjektet bidratt til å bygge kompetanse innen pre-klinisk dokumentasjon av helseeffekter og lagt grunnlaget for økt grunnforskning knyttet til de næringsmessige konkurransefortrinnene i regionen.

INNHold

Bakgrunn	7
Aktiviteter og resultater	8
Etablering av metoder for å arbeide med primære celler fra perifert blod	8
Etablering av T-cellemodellen	12
Uttesting av 3D cellemodeller	13
Analysemulighet for spesialiserte pro-resolusjons faktorer	15
Konferanser, publikasjoner, søknader og nye prosjekt	15
Konklusjoner.....	15
Referanser	16

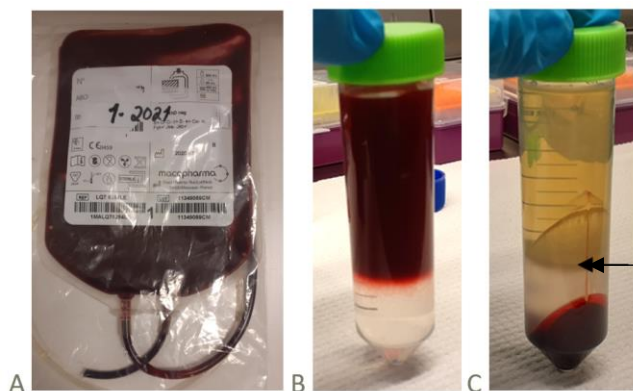
BAKGRUNN

Med forandringer gjennom moderne livstil og økende alder blir såkalte ikke-smittsomme og aldersrelaterte kroniske sykdommer mer utbredt og representerer en utfordring for helsesystemet og samfunnet. Miljøfaktorer, kosthold og lite aktivitet kan utløse underliggende kroniske betennelsestilstander og føre til cellulære skader. Underliggende betennelse er en risikofaktor for de fleste kroniske sykdommene som hjerte- og karsykdommer, metabolsk syndrom og diabetes, flere kreftformer, samt auto-immune og nevrodegenerative sykdommer¹. Forskingen viser at marine ingredienser i kostholdet har en balanserende effekt på betennelsestilstander og kan dermed forebygge utviklingen av disse sykdommene². Rapporten «Verdiskaping basert på produktive hav i 2050»³ estimerer at den marine ingrediensindustrien kommer til å mangedoble sin verdi frem til 2050 og er den delen av næringen som er forventet størst vekst i årene fremover. I Møre og Romsdal er hele den marine verdikjeden fra fangst og oppdrett til foredling og utvikling av biomarine ingredienser representert. Dette gir vår region en unik posisjon i å utnytte mer biomasse fra havet til bærekraftig og lønnsom produksjon av nye høyverdige produkt, og flere av medlemmene i næringsklyngen NCE Blue Legasea har satt seg som mål å utvikle kosttilskudd og legemidler fra marine ingredienser. En av utfordringene for helse-relatert innovasjon i næringslivet er å tiltrekke seg tilstrekkelig kunnskap for å kunne utnytte verdiskapingspotensialet på best mulig måte. Som påpekt i Forskings- og innovasjonsstrategien 2016-2020 (Fylkeskommune Møre og Romsdal, 2016) vil langsiktig grunnleggende forskning være en viktig faktor for å sikre de næringsmessige konkurransefortrinnene i regionen. Dokumentasjonen av helserelevante effekter i eksisterende og nye produkt og optimalisering av nye produkt mot spesifikke anvendelser vil i framtida bli enda viktigere for verdiskapingen. Marine produkt har potensiale til å bidra vesentlig til reduksjonen av kroniske sykdommer, men det kreves målrettede og definerte produkt. Nye marine produkter, anvendelsesområder og markeder stiller strenge krav til dokumentasjon. Pre-kliniske studier ved bruk av cellebiologiske analyser kan fungere som et bindeledd mellom produktutvikling og klinisk dokumentasjon. Cellemodeller kan brukes til å kartlegge biologiske effekter av nye produkt, samt å sammenligne og optimalisere produkter, eller skaffe molekylær kunnskap og bakgrunnsinformasjon om kjente ingredienser. Spesielt i utviklingen av marine produkt mot legemiddelmarkedet vil det være nødvendig å kunne påvise stoffet med biologisk aktivitet og dens virkningsmekanisme. Målet med prosjektet var å videreutvikle metoder knyttet til en cellebiologisk plattform og øke regional kompetanse i utviklingen av nye marine helserelevante produkter.

AKTIVITETER OG RESULTATER

ETABLERING AV METODER FOR Å ARBEIDE MED PRIMÆRE CELLER FRA PERIFERT BLOD

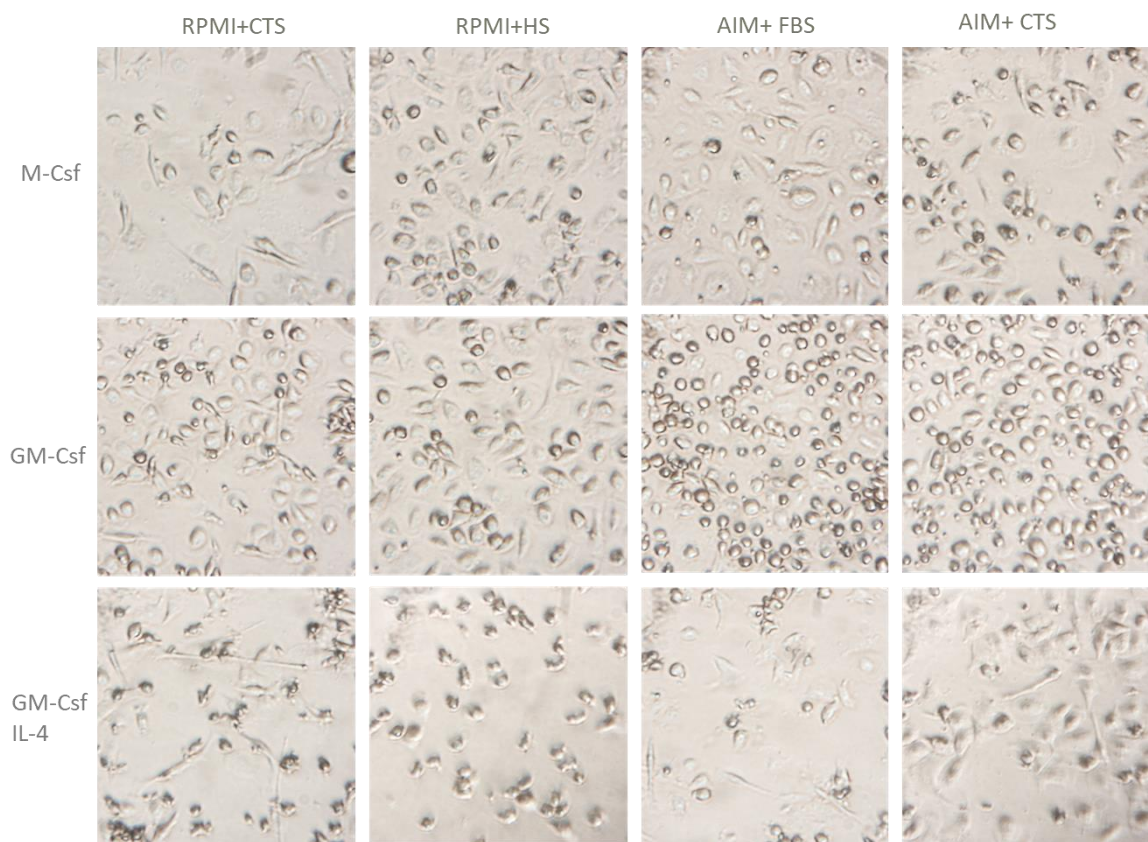
Cellene fra perifert blod (e.g. monocytter og T-celler) er noen av de lettest tilgjengelige primære cellene, dvs. celler som kommer rett fra kroppen uten å ha blitt forandret. Det er i motsetning til modifiserte cellelinjer som har fordelen å kunne dyrkes nesten uendelig på laboratoriet, men som også kan ha forandringer i de intracellulære signalveiene sine. Begge metodene har fordeler og ulemper og gir omfattende analysemuligheter til sammen. Immunceller fra perifert blod er godt egnet til undersøkelser av betennelsesreaksjoner relatert til det som skjer i kroppen. Det ble søkt og mottatt godkjenning fra de regionale etiske komiteene (REK) for å kunne bruke blod fra blodbanken Ålesund til isolasjon av primære celler. Videre ble det etablert en avtale og prosedyre med blodbanken og totalt to blodprøver ble hentet samme dag etter de har gjennomgått viruskontrollen (Figur 1A). Perifere mononukleære blodceller (PBMC) som er monocytter og lymfocytter (B-, T- og NK celler) ble isolert ved sentrifugering gjennom en gradient (Lymphoprep), som fører til at røde blodceller samler seg i bunnen og PBMC i en interfase (Figur 1B og C).



Figur 1. A) Blodprøve fra blodbanken. B) Blodblandingen på gradienten før sentrifugering og C) etter sentrifugering med PBMC i interfasen (pil).

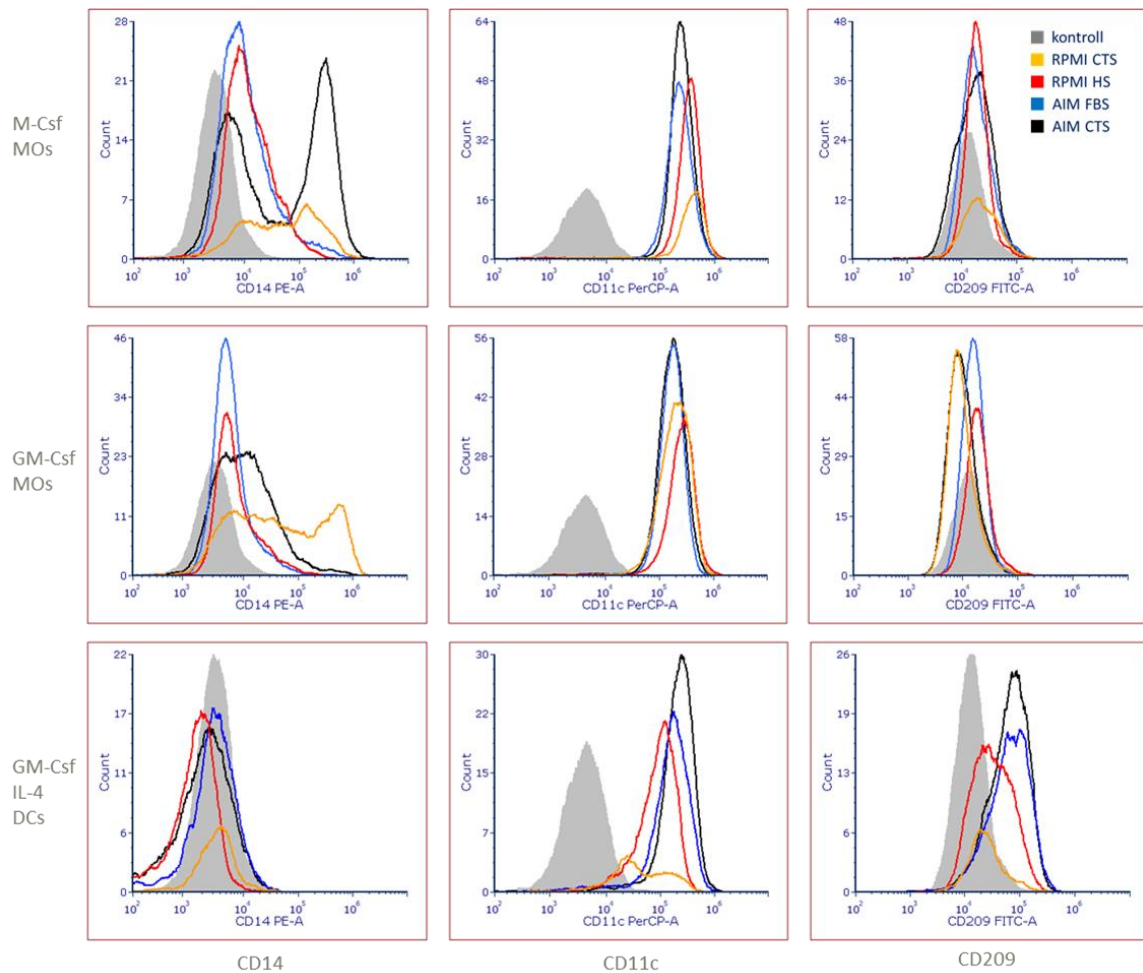
Monocytter ble videre isolert ved at de fester seg til kulturbrettet, mens andre celler blir vasket bort som tidligere beskrevet⁴. Når det oppstår en skade eller en infeksjon i kroppen fører alarm signaler til at monocytter forlater blodbanen og utvikler seg videre til makrofager i vevet. Sammen med lokale makrofager i vevet blir så skaden fjernet og reparert, mens utskillelse av mange ulike signalstoffer tiltrekker ytterligere celler og koordinerer immunreaksjonen. Makrofager har dermed en sentral rolle og stort signaleringsrepertoar i betennelsesreaksjoner. Til monocytt-makrofag differensiering *in vitro* er både M-Csf og GM-Csf ofte brukt og det finnes litteratur på at M-Csf fører til mer konsistent utvikling av nøytrale makrofager, mens GM-Csf polariserer makrofagene til en mer betent status^{5,6}. Likevel er det også kjent at makrofagene endrer polariseringen igjen ved tilsetning av de tilsvarende cytokinene⁷. Det finnes mange ulike kultiveringsprotokoller i litteraturen som er også avhengig av tilgang til reagensene.

Det ble derfor testet kultivering av cellene i ulike media (RPMI-1640 med humant AB serum (Sigma-Aldrich) og AIM-V med FBS eller CTS™ Immune Cell SR (Thermo Fisher Scientific)) og tilsetning av vekstfaktorene M-Csf og GM-Csf (10 ng/ml, Miltenyi Biotech) i totalt 6 dager med delvis bytte av medium etter tre dager til å differensiere monocytterne til makrofager. En kombinasjon av GM-Csf og IL-4 blir brukt til å differensiere monocytterne til dendritiske celler^{8,9} som fungerer som forbindelse mellom det medfødte og ervervete immunsystemet ved å presentere antigener og aktivere T-cellene og også dette ble testet. Bildene av de differensierte celle er vist i Figur 2. Generelt hadde de M-Csf differensierte celle en lengre form, mens GM-Csf differensierte cellene var mer runde. De dendritiske cellene ble veldig flate med en del lengre «armer» og noen satt veldig løst på bunnen.

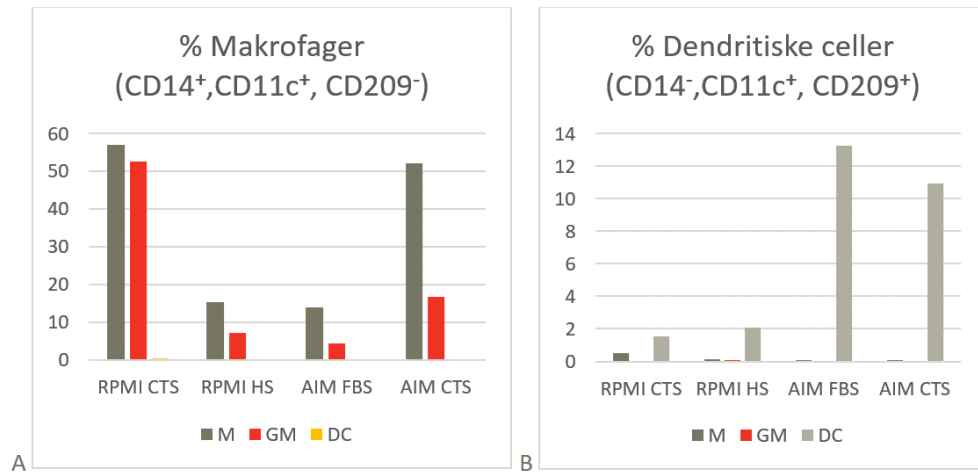


Figur 2. Lysmikroskopi av monocytter differensiert til makrofager (10ng/ml M-Csf eller GM-Csf) eller dendritiske celler (800U/ml GM-Csf + 250U/ml IL-4) etter 6 dager. Halvparten av mediet ble byttet på tredje kultiveringsdag.

Cellene ble også karakterisert ved Flowcytometri analyse gjennomført på en BD accuri hos NTNU Ålesund og med hjelp av Dr. Yanran Cao. Cellene ble farget for CD11c (markør på dendritiske celler), CD14 (markør på monocytter og makrofager) og CD209 (markør på dendritiske celler)¹⁰. Nesten alle cellene (90-99%) hadde et like høyt nivå av CD11c, som kan skyldes at også monocytter kan uttrykke CD11c¹¹ og isolering ved å feste seg på kulturbrettet kan selektere for CD11c positive celler¹². Ingen av makrofagene hadde CD209 og ingen av de dendritiske cellene hadde CD14 (Figur 3 og 4) som stemmer overens med markørene for begge celletypene. Differensiering med M-Csf førte generelt til et høyere nivå av CD14, særlig ved bruk av syntetisk CTS serum (ca. 50% av cellene). De GM-Csf differensierte cellene hadde bare et tilsvarende nivå i RPMI med CTS. Den høyeste andelen CD209 positive celler (10-11%) ble observert i cellene kultivert i AIM medium med FBS eller CTS (Figur 4).

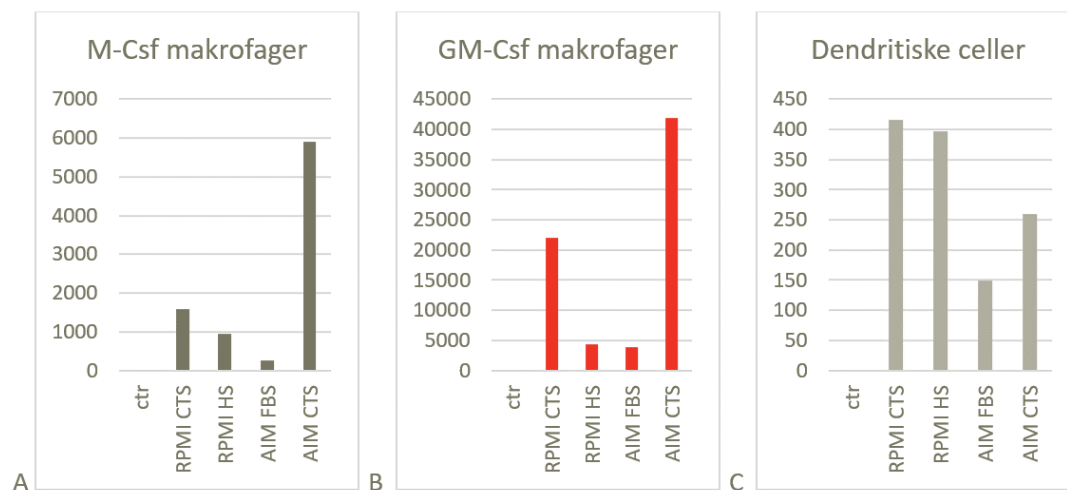


Figur 3. Flowcytometri analyse av monocytter differensiert til makrofager (MOs) (10ng/ml M-Csf eller GM-Csf) eller dendritiske celler (DCs) (800U/ml GM-Csf + 250U/ml IL-4) etter 6 dager og farget for CD14, CD11c og CD209.



Figur 4. Flowcytometri analyse av monocyttar differensiert til makrofager (M og GM) eller dendritiske celler (DC). I figuren vises (A) andelen CD14 og CD11c positive og CD209 negative celler for makrofagene (CD14⁺, CD11c⁺, CD209⁻) og (B) andelen CD14 negative og CD11c og CD209 positive celler for de dendritiske cellene (CD14⁻, CD11c⁺, CD209⁺).

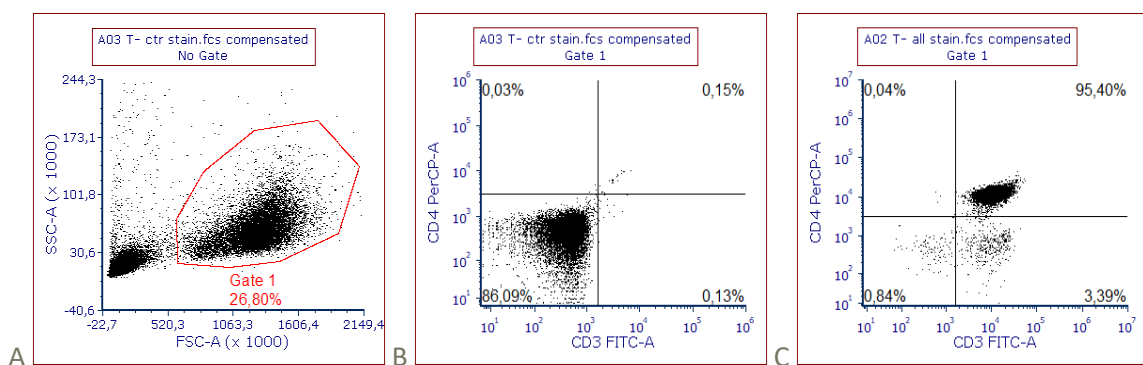
Videre ble cellene stimulert med den betennelsesinduserende komponenten LPS fra bakterieveggen og andre cytokiner og utskillelse av signalstoffet IL-23 ble analysert ved ELISA (R&D systems). Alle cellene produserte IL-23 som kunne detekteres i medium etter 24 timer (Figur 5), men ikke etter 48 timer (ikke vist). GM-Csf differensierte celler produserte mest IL-23, fulgt av M-Csf makrofagene og de dendritiske cellene med lavere nivåer. Makrofagene laget mest IL-23 når de var kultivert i AIM medium med CTS ved både M-Csf og GM-Csf differensiering. I de dendritiske cellene var det mindre forskjeller i de ulike media, med minst IL-23 produsert i AIM med FBS. Videre vil det være interessant å teste flere stimuleringer og flere kortere tidspunkt.



Figur 5. Utskillelse av signalstoffet IL-23 analysert ved ELISA i monocyttar differensiert til makrofager (ved M-Csf og GM-Csf) eller dendritiske celler og stimulert med LPS i 24 timer.

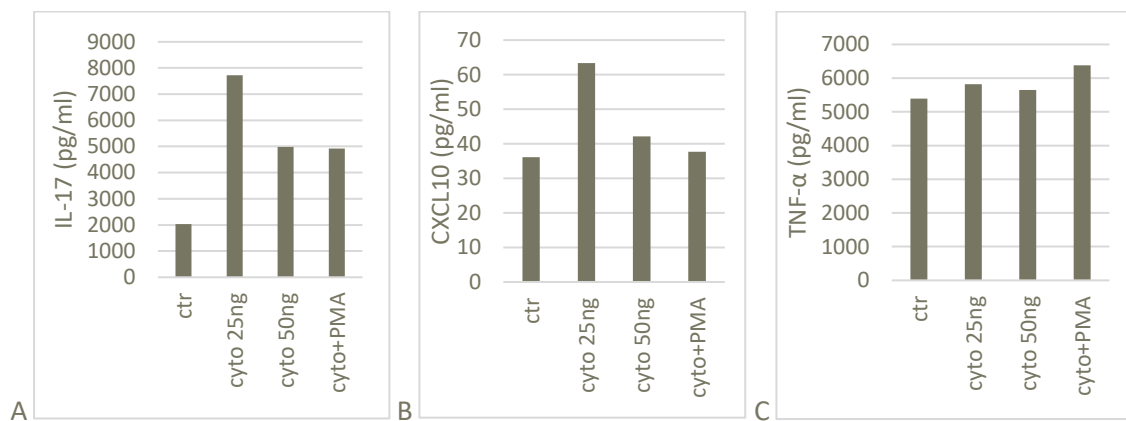
ETABLERING AV T-CELLEMODELLEN

En annentype blodceller og viktig bestanddel av immunforsvaret er T-celler, som er del av det ervervete immunsystemet. T-cellene deles inn i cytotoksiske (CD8+) celler som gjenkjenner og dreper infiserte celler og T-hjelper (CD4+) celler som modulerer aktiveringen av B- og T-celler. T-hjelper celler kan utvikles til ulike regulatoriske eller pro-inflammatoriske typer ettersom hvilke signaler de får fra andre celler og spiller ofte en rolle i autoimmune sykdommer¹³. I den autoimmune hudbetennelsen Psoriasis blir signalstoffer som cytokinet IL-23 skilt ut fra makrofager og dendritiske celler og polariserer T-cellene som igjen skiller ut IL-17^{14,15}. Økt aktivitet i denne signalveien bidrar til en vekselvidig overaktivering av hudceller og makrofager som utgjør hudbetennelsen (Figur 1)¹⁶. Arctic Bioscience AS produserer kosttilskudd av restråstoffet silderogn og har lovende resultater i uttesting av kosttilskuddet mot milde varianter av Psoriasis^{17,18}. Til den videre utviklingen til et legemiddel er det behov for cellemodeller som kan opplyse molekylære mekanismer av produktet. Samtidig med utviklingen av tilgang og metoder til isolering av blodceller, ble det dermed også isolert CD4+ T-celler ved at uønskete celletyper fra PBMC isolasjonen (kultivert overnatt) ble merket med magnetiske kuler og fjernet ved hjelp av en magnetisk kolonne (CD4+ isolation kit, Miltenyi Biotech). Renheten av isolasjonen ble sjekket ved Flowcytometri. T-cellene ble dyrket i RPMI medium tilsatt humant serum og aktivert med CD3/CD28 Dynabeads™ (Thermo Fisher Scientific) og PMA/ionomycin Cell Stimulation Cocktail (500X) (eBioscience™, Invitrogen). Ved intracellulær farging ble Protein Transport Inhibitor Cocktail (500X) (eBioscience™, Invitrogen) tilsatt 4 timer før slutten av stimuleringen. Prosedyren ble først gjennomført under et kompetansebesøk i forskningsgruppen til Prof. Trude Flo ved NTNU Trondheim og med hjelp av Markus Haug, PhD og senere ved Møreforskning AS i Ålesund, hvor den Flowcytometriske analysen ble gjennomført med hjelp av Dr. Yanran Cao ved NTNU Ålesund. T-celle isolasjonen i Ålesund resulterte i forholdsvis få isolerte T-celler, som trolig også skyldes for mange blodplater blant PBMC. Likevel ble det oppnådd 95% CD4+ T-celler (positive for CD3 og CD4), når celledbris og blodplater var ekskludert (Figur 6). Videre er det planlagt å farge cytokinene inni T-cellene når utskillelse er blokkert slik at disse også kan detekteres ved Flowcytometri.



Figur 6. Flowcytometri analyse av T-celle isolasjonen. A) Gating av cellepopulasjonen av interesse, eksklusjon av debris og blodplater, vist for kontroll farging. B) og C) Dot plot med CD3 vs CD4 markørene i kontroll (B) og fargete celler (C).

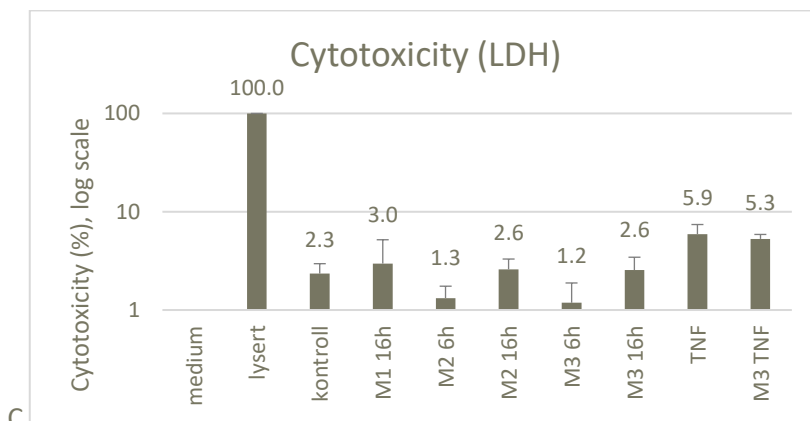
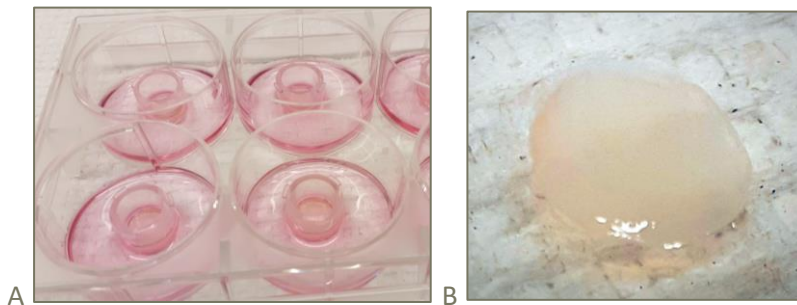
Utskillelse av IL-17, CXCL10 og TNF- α ble også testet i supernatanten ved ELISA (R&D Systems) som vist i Figur 7. IL-17 ble detektert i relativt høye mengder og viser en økning ved tilsetning av cytokiner. At det ble detektert mer IL-17 i prøven med tilsetning av den lavere konsentrasjonen kan også skyldes mindre celler. PMA/ionomyosin som skal sette i gang mange signalveier, hadde ikke noen ytterlig effekt, som kan skyldes for kort behandling. CXCL10 ble detektert i lavere mengder og TNF- α i veldig høye mengder i alle prøver som viser at aktiveringen med Dynabeads™ alene fører allerede til utskillelse av signalstoffene og IL-17 økes videre av cytokinene. Videre vil det være interessant å se på effekten av de enkelte cytokinene separat og da spesielt effekten av IL-23, samt å inkludere ikke-aktiverede celler.



Figur 7. Utskillelse av A) IL-17, B) CXCL10 og C) TNF- α fra T-celler stimulert med 25ng eller 50ng av cytokinene IL-6, IL-1B og IL-23 (cyto) for 48 timer, hvor indikert med tilsetning av PMA/ionomyosin de siste 4 timene (PMA) (uttesting i n=1).

UTTESTING AV 3D CELLEMODELLER

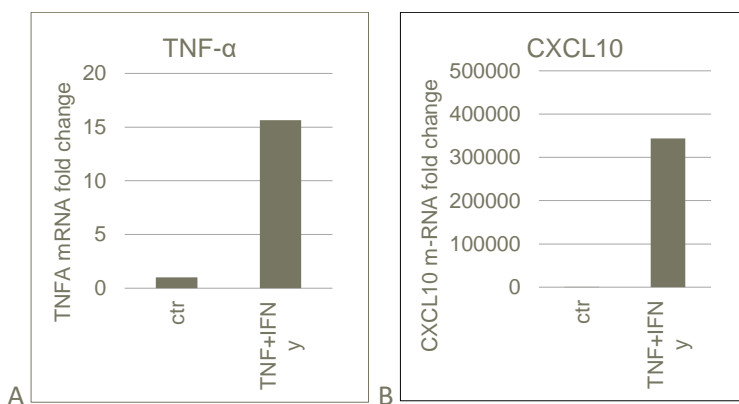
En annen aspekt av fysiologiske cellemodeller som gjenspeiler kroppens funksjon best mulig er anordningen av cellene. I organene danner cellene tredimensjonale strukturer i motsetning til den todimensjonale anordningen i konvensjonell celledyrkning. Dette er spesielt viktig hvis cellene utgjør en vevsfunksjon som i tarmen eller huden^{19,20}. Tredimensjonale cellemodeller av tarmveggen eller huden som kommer fra humant donormateriale og som blir dyrket ved overgangen av væske og luft (e.g. Mattek EpiIntestinal™ og EpiDerm™) kan kjøpes inn. Disse modellene kan gi ytterligere vevsspesifikke resultater enn den grunnleggende uttestingen med cellelinjer som transport gjennom tarmveggen eller inn i huden. Under prosjektet ble det kjøpt inn EpiDerm™ modellen og behandlet med ulike marine oljer (M1-3) fra Epax AS. Cellenes toleranse for behandlingen ble testet ved utskillelse av det intracellulære enzymet laktat dehydrogenase (LDH) i tilfelle av celledøds (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}, Roche) (Figur 8). I den positive kontrollen som gir størst utslag ble alle cellene lysert ved hjelp av detergent. Testen viser at modellene tålte tilskuddet med marine oljer bra med maksimalt 2,6 % dødelighet uten forskjell til den ubehandlede kontrollen. Stimulering med cytokinet TNF-alpha førte til en liten økning i celledød, som stemmer med sin apoptotiske og nekroptotiske effekt²¹.



Figur 8. A) Bilde av kulturbrettet med hudmodellene. B) Bilde av et hudvev løst fra brettet C) Celledød i hudcellemodellen ved behandling med marine oljer (M1-3) for 6 eller 16 timer og stimulering med cytokinet TNF, analysert som utskillelse av LDH (n=3).

Det var planlagt å teste inkorporering av de marine fettsyrene i cellene ved gasskromatografi, men det andre forsøket denne analysen skulle koordineres med ble utsatt, slik at dette først vil gjennomføres når instrumentet er satt i gang igjen.

Videre ble induksjon av signalstoffene TNF- α og CXCL10 testet ved qrt-PCR i en av replikatene (Figur 9). Stimulering med cytokinene TNF- α og IFN γ førte til moderat TNF- α produksjon i hudcellene og veldig høy produksjon av CXCL10, som viser at cellene var responsive for stimulering av betennelsessignaler.



Figur 9. m-RNA endring av signalstoffene TNF- α og CXCL10 i 3D hudmodellene stimulert med TNF- α of IFN γ for 24 timer analysert ved qrt-PCR (uttesting i n=1).

ANALYSEMULIGHET FOR SPESIALISERTE PRO-RESOLUSJONS FAKTORER

Betennelsesreaksjoner er nødvendig for å beskytte kroppen for infeksjoner, men må også bli begrenset for å unngå skader i vevet. Avslutningen av en betennelsesreaksjon er en aktiv prosess med produksjon av lipid mediatorer som fremmer reparasjon av vevet. Disse stoffene blir dannet fra omega-3 fettsyrer og kalles for spesialiserte pro-resolusjons mediatorer (SPM)²². Mange av disse, samt deres balanserende funksjon på betennelsen har blitt oppdaget i de siste årene. Det har også vært forsket mye på forstyrrelser i SPM produksjon i ulike sykdommer²³ og den positive effekten man ser av tilskudd med SPM²⁴. Nylig ble det også publisert hvordan SPM-produksjon i kroppen blir påvirket etter inntak av marine omega-3 fettsyrer^{25,26}. Det å kunne lage en profil av hvilke SPM som blir produsert etter tilskudd av marine olje er viktig dokumentasjon som kan bidra til økt verdiskaping ved kommersialisering av marine lipid ingredienser. Det ble etablert kontakt med Prof. Jesmond Dalli ved Queen Mary University of London, som ble videre involvert i et NFR-innovasjonsprosjekt (tilsagn 2021), sammen med Arctic Bioscience AS og Nofima AS, hvor en vil se på SPM forløpere i sildrognekstraktet og dannelse av SPM gjennom immuncellene.

KONFERANSER, PUBLIKASJONER, SØKNADER OG NYE PROSJEKT

Siden prosjektet ble i hovedsak gjennomført i 2021 var det pga. Covid-pandemien ikke mulig å delta på en internasjonal konferanse fysisk. I stedet ble deltagelse på en rekke ulike webinarer og virtuelle konferanser gjennomført, bla. med Prof J. Dalli og "Marine biotechnology - marine products for health" organisert av Centre for Sea and Society, Maritime Cluster of West Sweden, Kristineberg Center og Innovatum Science Park. Under prosjektet ble 2 publikasjoner ferdigstilt, men som ikke er direkte relatert til prosjektet^{27,28}. Arbeidet med prosjektet var likevel avgjørende for å kunne legge grunnlaget for videre publikasjoner som vil følge de neste årene. Det ble sendt inn to IPN søknader til NFR som bygger på metodene etablert i prosjektet, hvorav en med Arctic Bioscience AS og Nofima AS ble innvilget og er i gang nå (NFR 327953). I tillegg er vi partner i et Horizon Europe prosjekt som ble sendt inn i 2021 og innvilget i januar 2022, hvor vår deltagelse er relatert til uttesting av marine produkter i in-vitro modeller, blant annet 3D-hudmodeller.

KONKLUSJONER

Det overordnede målet med prosjektet var etablering av ulike cellemodeller som forskningsverktøy i utviklingen av høyverdige marine produkt. Blant annet er det etablert rutiner for isolering av monocytter og T-celler fra perifert blod. Den grunnleggende uttestingen og optimaliseringen er gjennomført og modellene er allerede tatt i bruk i nye prosjekt. Dermed har prosjektet bidratt til å bygge kompetanse og infrastruktur hos Møreforskning som har resultert i økt samarbeid og nye prosjektmuligheter for regionalt næringsliv.

REFERANSER

1. Nathan & Ding. Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).
2. Hosomi *et al.* Seafood Consumption and Components for Health. *Glob. J. Health Sci.* **4**, 72–86 (2012).
3. Olafsen *et al.* *Verdiskaping basert på produktive hav i 2050.* (2012).
4. Mildenerger *et al.* N-3 PUFAs induce inflammatory tolerance by formation of KEAP1-containing SQSTM1/p62-bodies and activation of NFE2L2. *Autophagy* **13**, 1664–1678 (2017).
5. Vogel *et al.* Human macrophage polarization in vitro: Maturation and activation methods compared. *Immunobiology* **219**, 695–703 (2014).
6. Mily *et al.* Polarization of m1 and m2 human monocyte-derived cells and analysis with flow cytometry upon mycobacterium tuberculosis infection. *J. Vis. Exp.* **2020**, 1–20 (2020).
7. Jaguin *et al.* Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* **281**, 51–61 (2013).
8. Miltenyi Biotec GmbH. *Generation of Mo-DCs.* *miltenyibiotec.com* (2016).
9. Nair *et al.* Isolation and generation of human dendritic cells. *Curr. Protoc. Immunol.* **07**, Unit7.32 (2012).
10. Guilliams *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* **45**, 669 (2016).
11. Drutman *et al.* Inflammatory Spleen Monocytes Can Upregulate CD11c Expression Without Converting into Dendritic Cells. *J. Immunol.* **188**, 3603–3610 (2012).
12. Delirez *et al.* Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J.* **15**, 218–223 (2013).
13. Raphael *et al.* T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**, 5–17 (2015).
14. Hawkes *et al.* Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *J. Immunol.* **201**, 1605–1613 (2018).
15. Hu *et al.* The Role of Helper T Cells in Psoriasis. *Frontiers in Immunology* **12**, (2021).
16. Schön & Erpenbeck. The interleukin-23/interleukin-17 axis links adaptive and innate immunity in psoriasis. *Frontiers in Immunology* **9**, 1323 (2018).
17. Tveit *et al.* A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Clinical Study to Investigate the efficacy of Herring Roe Oil for treatment of Psoriasis. *Acta Derm Venereol.* (2020). doi:10.2340/00015555-3507
18. Steinar Tveit *et al.* Long Term Efficacy and Safety of Herring Roe Oil in the Treatment of Psoriasis, a 39-week Open-label Extension Study. *Int. J. Clin. Exp. Med. Sci.* **7**, 13 (2021).
19. Ayehunie *et al.* Human Primary Cell-Based Organotypic Microtissues for Modeling Small Intestinal Drug Absorption. *Pharm. Res.* **35**, (2018).
20. Markus *et al.* Human small intestinal organotypic culture model for drug permeation, inflammation, and toxicity assays. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* **1** (2020). doi:10.1007/s11626-020-00526-6
21. Kumari & Pasparakis. Epithelial Cell Death and Inflammation in Skin. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **403**, 77–93 (2017).
22. Serhan *et al.* The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology* **27**, 200–215 (2015).
23. López-Vicario *et al.* Leukocytes from obese individuals exhibit an impaired SPM signature. *FASEB J.* **33**, 7072–7083 (2019).
24. Motwani *et al.* Pro-resolving mediators promote resolution in a human skin model of UV-killed

- Escherichia coli-driven acute inflammation. *JCI insight* **3**, (2018).
25. Souza *et al.* Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Circ. Res.* **126**, 75–90 (2020).
 26. Schaller *et al.* Treatment With a Marine Oil Supplement Alters Lipid Mediators and Leukocyte Phenotype in Healthy Patients and Those With Peripheral Artery Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **9**, e016113 (2020).
 27. Mildenberger *et al.* Antioxidative activities , phenolic compounds and marine food allergens in the macroalgae *Saccharina latissima* produced in integrated multi-trophic aquaculture systems. *Aquaculture* **546**, 737386 (2021).
 28. Mildenberger *et al.* Self-assembly potential of bioactive peptides from Norwegian sea cucumber *Parastichopus tremulus* for development of functional hydrogels. *LWT* **148**, 111678 (2021).



MØREFORSKING AS
Postboks 5075
6021 Ålesund
Tlf. +47 70 11 16 00
www.moreforsk.no
NO 991 436 502
