
Rapport for pr.nr 55000 | Jennifer Mildenberger

FISKEOLJE UNDER LUPEN – PRE-KLINISKE EFFEKTER I HUMANE CELLER

RFF kvalifiseringsprosjekt 295891

TITTEL	Fiskeolje under lupen – pre-kliniske effekter i humane celler
DATO	12.12.2018 - 12.12.2019
FORFATTERE	Jennifer Mildenberger
PROSJEKTLEDER	Jennifer Mildenberger
SIDER	17
PROSJEKT NR.	55000 / RFF 295891
PROSJEKTITTEL	Fiskeolje under lupen- pre-kliniske effekter i humane celler
OPPDRAGSGIVER	RFF MIDT
ANSVARLIG UTGIVER	Møreforskning Ålesund AS
NØKKEWORD	Omega-3, fiskeolje, cellekultur, immunceller, tarmceller, simulert fordøyelse, opptak

SAMMENDRAG

Livstilrelaterte, kroniske sykdommer øker stadig og er en samfunnsøkonomisk utfordring. Derfor er det et behov for å utvikle nye, helse-støttende produkt i fremtiden. Kliniske studier er gullstandard for å dokumentere helseeffekter, men gjennomføringen av slike studier er både tidskrevende og kostbart. Pre-kliniske studier ved bruk av cellemodeller kan fungere som et bindeledd mellom produktutvikling og klinisk dokumentasjon og kan brukes til å kartlegge biologiske effekter av nye produkt, samt å sammenligne og optimalisere produkter.

Utfordringen med pre-kliniske cellebaserte analyser for marine oljer er å presentere oljene til cellene i den formen som er naturlig i kroppen. For at celler fra immunsystemet eller organer som hjerne og hud skal kunne ta opp marine oljer må disse være delt opp i frie fettsyrer. Prosjektet har kartlagt en metode til bearbeiding av marine omega-3 oljer som fører til en lipidform som er relevant og naturlig for perifere vevsceller som immunceller.

Prosjektet lyktes med å fordøye ulike olje substrat ved en internasjonal metode for simulert fordøyelse. Fra denne fordøyelsesvæsken kunne omega-3 fettsyrer bli tatt opp og anrikt i kultiverte tarmceller. Disse cellene er naturligvis i kontakt med fordøyelsesenzymer og kan dermed håndtere fordøyelsesvæskene. Videre ble frie fettsyrer kjemisk ekstrahert fra fordøyelsesvæsken og ble tatt opp i immunceller. I immuncellene viste de ekstraherte fettsyrene de samme funksjonelle tendensene som den rene omega-3 fettsyren DHA på antioksidant forsvar og betennelsessignalering. Dermed kan, ved videre optimalisering, funksjonen til fettsyrene analyseres i cellemodeller med utgangspunkt i den opprinnelige oljen.

© FORFATTAR/MØREFORSKING

Føresegnene i åndsverklova gjeld for materialet i denne publikasjonen. Materialet er publisert for at du skal kunne lese det på skjermen eller framstille eksemplar til privat bruk. Utan særskild avtale med forfatter/Møreforskning er all annen eksemplarframstilling og tilgjengeleggjering berre tillate så langt det har heimel i lov eller avtale med Kopinor, interesseorgan for rettshavarar til åndsverk.

INNHOLD

1. Bakgrunn	5
2. Material og metode.....	5
Prøvene.....	5
Cellene	6
Tillaging av marine olje substrat.....	7
Frie fettsyrer	9
Fettsyreprofil	9
Immunoblotting.....	9
ELISA	10
Real-time PCR	10
3. Resultat og diskusjon.....	10
Tillaging av marine olje substrat.....	10
Fettsyreprofil i cellene	11
Reproduksjon av kjente effekter i immunceller	13
Bedrift-spesifikke analyser.....	16
4. Konklusjon	16
6. Referanser	16

1. BAKGRUNN

Livstilrelaterte, kroniske sykdommer øker stadig og er en samfunnsøkonomisk utfordring. Derfor er det et behov for å utvikle nye, helse-støttende produkt i fremtiden. Kliniske studier er gullstandard for å dokumentere helseeffekter, men gjennomføringen av slike studier er både tidskrevende og kostbare. 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. Cellene dyrkes på laboratoriet og behandles til å etterligne et spesifikt aspekt av kroppens vanlige funksjon eller sykdom.

25 prosent av den globale omsetningen av omega-3 produkter kommer fra Møre og Romsdal¹. Mer forskningsaktivitet knyttet til utviklingen av marine produkt med dokumentert helseeffekt vil øke verdiskapingen i regionen. Epax, Arctic Nutrition og GC Rieber Oils er noen av de viktigste leverandører av omega-3 produkter i regionen som var involvert i prosjektet og representerer analysebehovet i klyngen og i industrien.

Helseeffekter til marin olje er godt omtalt i den vitenskapelige litteraturen, både med kliniske studier av markedsførte produkter og pre-klinisk forskning på virkningen til frie fettsyrer på cellenivå². Likevel har det, til vår kunnskap, ikke blitt etablert relevante analyser til bruk i produktutviklingen som kan gi svar på biologiske effekter av komplekse produkt i organspesifikke sammenhenger.

Utfordringen med pre-kliniske cellebaserte analyser er å presentere lipidene til cellene i den formen som er naturlig i kroppen. For at celler fra immunsystemet eller organer som hjerne og hud skal kunne ta opp marine oljer må disse være delt opp i frie fettsyrer. I kroppen skjer nedbrytingen til dette nivået gjennom fordøyelsesenzymer, inni tarmcellene og inni blodkarveggene³. Mye forskningsarbeid har blitt gjort på opptak og transport av lipider gjennom tarmepitelceller^{4,5} og på effekten av rensete frie fettsyrer på ulike vevsceller^{6,7}. Det finnes også forskning om virkningen av lipidemulsjoner på blodkarceller⁸. Disse emulsjonene blir brukt som venøse infusjoner som leverer fettsyrer til kritisk syke pasienter. Noe uttesting av nedbrytingsmetoder av n-3 produkter i cellesystemer er gjennomført tidligere, men i disse forsøkene har man i hovedsak fokusert på cellelinjer fra tarm og lever som naturlig har kontakt med ulike lipidformer⁹.

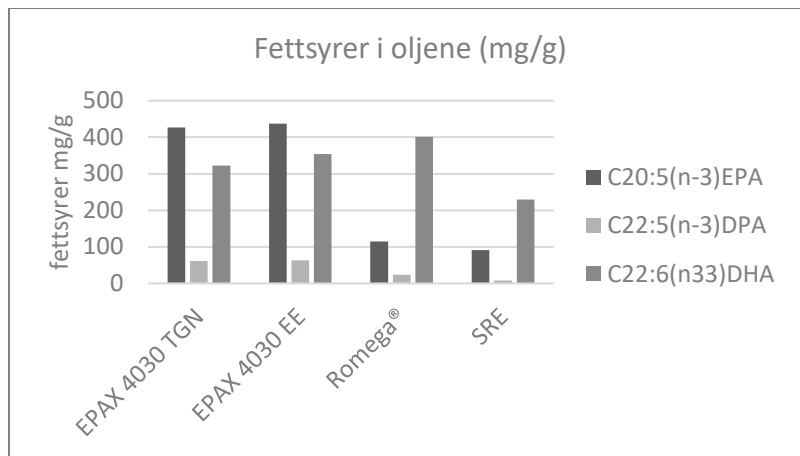
Prosjektet har, basert på denne fragmenterte kunnskapen om ulike typer nedbryting, kartlagt en metode til bearbeiding av marine omega-3 oljer som fører til en lipidform som er relevant og naturlig for opptak i tarmceller. Videre ble det ved ekstraksjon av frie fettsyrer etter fordøyelsen funnet en metode for opptak i perifere vevsceller som immunceller. I immuncellene viste de ekstraherte fettsyrene de samme funksjonelle tendensene som den rene omega-3 fettsyren, bare med svakere effekt. Til slutt fikk de involverte bedriftene muligheten til uttesting av konkrete helse-relaterte aspekt med et ønsket produkt.

2. MATERIAL OG METODE

PRØVENE

Prøvene som ble brukt til uttesting var en triglyseridolje og en etylesterolje med 400mg/g EPA og 300mg/g DHA fra EPAX, Romega® fosfolipidolje (470mg/g total omega-3 fettsyrer, hvorav 340mg/g omega-3 fosfolipider) og rent silderognekstrakt (SRE) fra Arctic Nutrition AS. Mengden av de viktigste

omega-3 fettsyrene (EPA, DPA og DHA) i oljene ble analysert ved gasskromatografi (GC) og er vist i Figur 1. Oljene ble alltid flushed med nitrogen og oppbevart på -20°C etter åpning. Rent DHA (Cayman Chemical) ble brukt som positiv kontroll i de funksjonelle analysene.

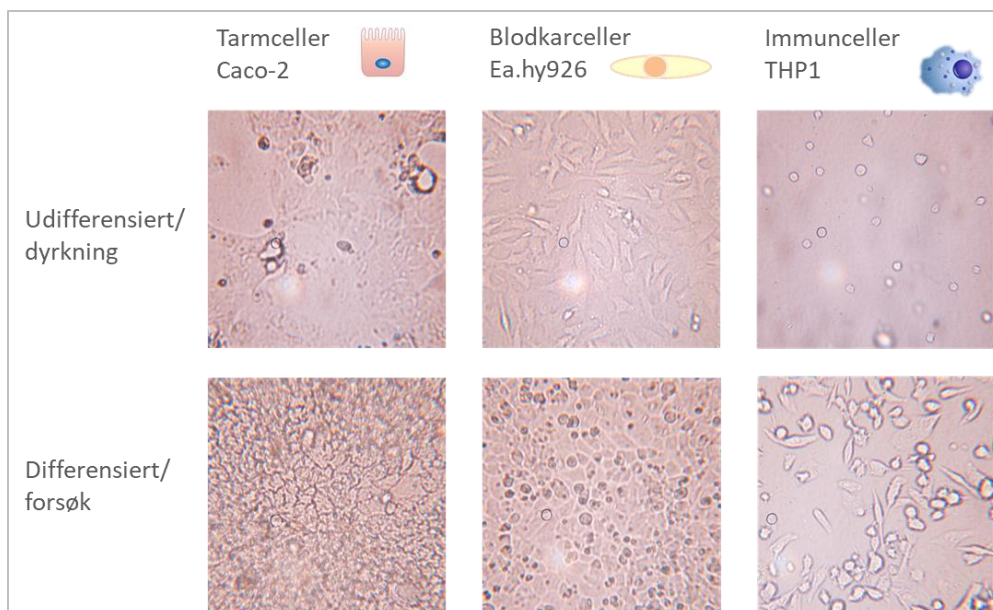


Figur 1: Omega 3 fettsyrene EPA, DPA og DHA (mg/g) i de testete oljene.

CELLENE

Cellelinjene som ble brukt er tykktarmkreftcellerlinje Caco-2 (ATCC), som er en etablert modell for næringsopptak i tynntarmen. Cellene ble dyrket i EMEM (Sigma M5650) tilsatt med 10% FBS (Sigma F0804), 100U penicillin + 0.1mg streptomycin, 2mM L-Glutamine, 1mM Sodium Pyruvate og 1x NEAA (Sigma M7145) i en 5% CO₂ inkubator på 37°C. Videre ble hybrid-endotelcellerlinjen Ea.hy926 (ATCC) brukt som en modell for blodkarveggen og dyrket i EMEM (Sigma M5650) tilsatt med 10% FBS, 100U penicillin + 0.1mg streptomycin, 4mM L-Glutamine, 1mM Sodium Pyruvate, 1x NEAA (M7145, Sigma) og 3,5g/L Glukose. Til opptaksforsøk ble cellene kultivert på filtermembraner mellom to kompartmenter med cellemedium (Transwell®, Corning) i 14 dager for å få dannet et sammenhengende cellelag som representerer respektive tarm- og blodkarvegger. Mediet ble byttet hver 3.-4. dag (Figur 2).

Monocytcellerlinjen THP-1 (TIB-202™, ATCC) ble brukt som mottaksceller til uttesting av de tillagete olje substratene og dyrket i RPMI-1640 (Sigma R0883) tilsatt med 10% FBS, 100U penicillin + 0.1mg streptomycin, 2mM L-Glutamine, 1mM Sodium Pyruvate, 2,5g/L Glukose, 50µM BME og 8mM HEPES. Til forsøkene ble cellene differensiert med 40ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma P8139) i 3 dager og 1.5 dager i nytt medium uten PMA (Figur 2).



Figur 2: Cellene som ble brukt i prosjektet i udifferensiert og differensiert tilstand.

TILLAGING AV MARINE OLJE SUBSTRAT

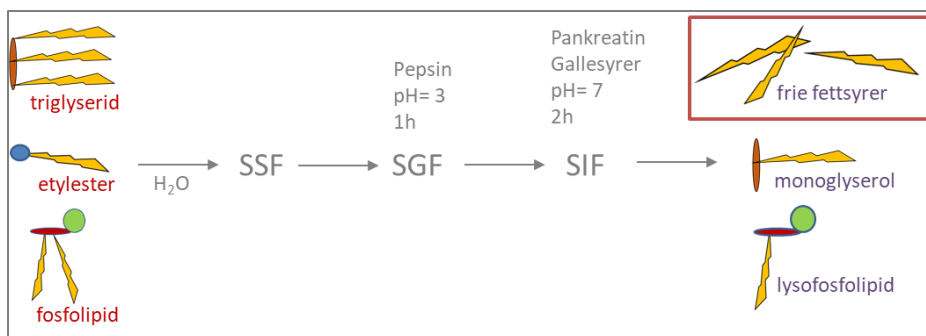
Kjemisk fordøyelse

Kjemisk hydrolyse ble gjennomført i basisk miljø etter Salimon *et al.*¹⁰. 500mg olje ble blandet med 3ml etanolisk KOH (1,75M) og inkubert på 37°C for 2 timer. Deretter ble 2ml dH₂O tilsatt og ikke-saponifisert materiale ekstrahert med 1ml heksan. PH ble justert til 1 ved tilsatt av 6M HCl og fettsyrene ble ekstrahert med 1ml heksan. Heksanfasen ble vasket med dH₂O til nøytral pH og tørket med natrium sulfat (NaSO₄). Heksan ble så fordampet under nitrogen og de frie fettsyrene løst i etanol til lagring eller i cycloheksan til måling av frie fettsyrer.

Enzymatisk fordøyelse

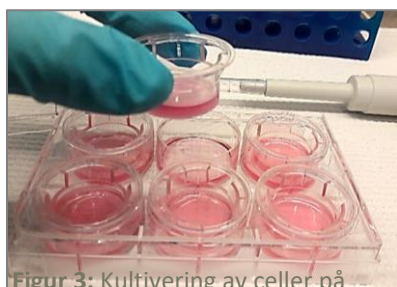
Enzymatisk hydrolyse ble gjennomført etter en internasjonal standardprotokoll for *in vitro* fordøyelse (Infogest)¹¹ (Figur 3). Fordøyelsesvæskene ble preparert med de anbefalte saltkonsentrasjonene. Til fordøyelse ble oljene blandet 3:2 med dH₂O og tilsatt i 1ml «simulated salivary fluid, SSF» til en total sluttmengde av 15ng omega-3 fettsyrer. Fordøyelsesfasen i munnen ble utelatt siden det ikke var karbohydrater til stede. Væsken ble justert på pH 3 og «Simulated gastric fluid, SGF» ble tilsatt 1:1 med pepsin i en sluttkonsentrasjon på 2000U/ml. Prøvene ble flushed med nitrogen og inkubert 1 time på 37°C i mørket for å simulere fordøyelse i magen. Deretter ble pH justert på 7 og «simulated intestinal fluid, SIF» med pancreatin (sluttkonsentrasjon 10mg/ml = 36U/ml) og gallsyrer (sluttkonsentrasjon 8.3mg/ml = 9.5mM) tilsatt 1:1 til prøvene og disse inkubert på 37°C i 2 timer (flushed og mørkt). Etter end fordøyelse ble prøvene fryst ned.

Det ble også gjennomført en test med lipoprotein lipase fra *Pseudomonas sp.* (LPL_{psp}, Sigma 62335) som hydrolyserer alle fettsyrer. 0,3g olje ble blandet med 200µl emulsjonsløsning (0.1% Tween80 i SSF¹²) og ristet ved 3000rpm i 2min. 189µl emulsjon (100mg olje) og 5U/ml LPL_{psp} ble tilsatt per ml 25mM Tris buffer og inkubert i opptil 24h.



Figur 3: Simulert fordøyelse av ulike oljetyper etter Infogest protokollen.

Simulert tarm- og blodkarvegg



Figur 3: Kultivering av celler på filtermembraner i transwell brett.

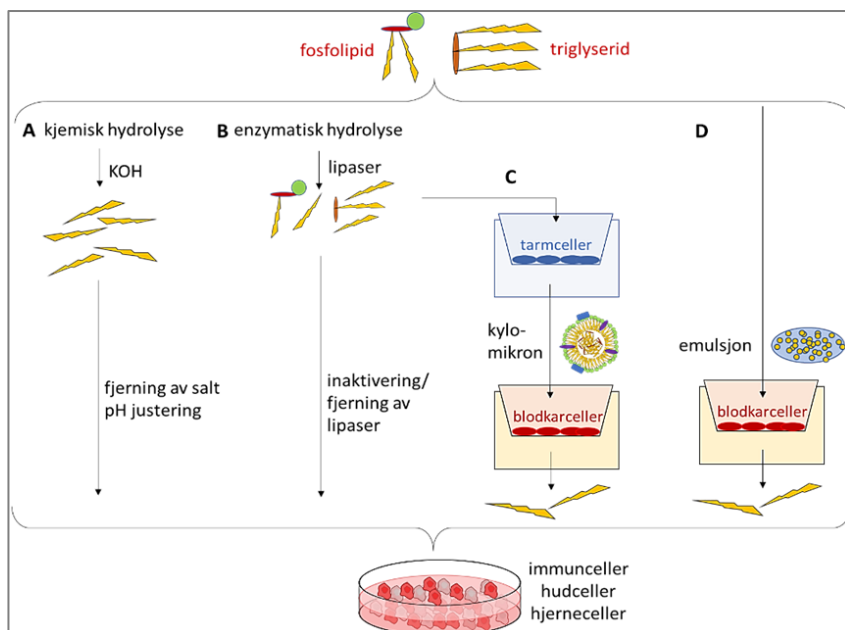
Caco-2 tarmceller og Ea.hy926 endotelceller ble sådd ut til konfluens i Transwell®-plater (Figur 4) og differensiert i 14 dager. Hydrolysatene ble tilsatt 1:5 i det apikale mediet til Caco-2 cellene og inkubert i 6h. Det basale mediet fra Caco-2 cellene ble tilsatt på Ea.hy926 cellene med tilskudd av 5U bovine lipoprotein lipase (LPLb, Sigma L2254) og inkubert over natt. Det basale mediet fra Ea.hy926 cellene ble tilsatt overnatt på differensierte THP1-celler.

Direkte opptak via blodkarvegg

Til direkte tilsetning av oljeemulsjon på Ea.hy926 cellene ble 0,3g olje blandet med 200µl dH₂O eller emulsjonsløsning (0.1% Tween80 i SSF¹²) og ristet ved 3000rpm i 2min. 189µl oljeemulsjon (=100mg olje) ble blandet i Ea.hy926 medium og 10U LPL tilsatt. Cellene ble inkubert over natt.

Ekstraksjon av frie fettsyrer til direkte tilsetning på immunceller

De frie fettsyrene etter end simulert fordøyelse ble ekstrahert til direkte tilsetning på målcellene. Fordøyelsesvæsken ble justert til pH 9 og de polare ufordøyete komponentene ble ekstrahert med 1ml heksan. Prøvene ble så justert på pH 1 og de frie fettsyrene isolert med 1ml heksan. Heksan ble fordampet under nitrogen og de frie fettsyrene løst i etanol til lagring eller i cycloheksan til måling av frie fettsyrer. Til tilsetning av frie fettsyrer på celler, ble det pipettert ut en mengde tilsvarende en sluttkonsentrasjon av 140µM (målt som µmol oljesyre) i cellemediet. Løsemiddelet ble avdampet og fettsyrene løst i cellemedium.



Figur 5: Ulike metoder for tillaging av marine olje substrat.

FRIE FETTSYRER

Frie fettsyrer i de marine olje substrat ble bestemt ved en mikrometode etter Lowry og Tinsley¹³ med modifikasjoner av Bernardez *et al.*¹⁴. De ekstraherte frie fettsyrene fra 5-10mg olje ble løst i 3ml cyclohexan og tilsatt 1ml kobber-acetat-pyridin reagens. Etter sentrifugering ble absorpsjonen til den øverste fasen avlest ved 710nm. Prosent frie fettsyrer i prøven ble uttrykt som oljesyre, molekylvekt 282g/mol, basert på en standardkurve med oljesyre.

FETTSYREPROFIL

Fettsyreprofil i oljene og i cellene ble bestemt ved gasskromatografi. Etter end behandling ble cellene høstet i PBS + 0,01% BHT og pelleten flushed med nitrogen og lagret på -20°C. For GC analysen ble pelleten overført til et glassrør med internstandart C23. 250µl BF3 og 250µl heksan ble tilsatt, rørene flushed med nitrogen, blandet og inkubert i 10 minutter på 100°C. Rørene ble avkjølt og 1ml isooktan med 0,01% BHT tilsatt. Isooktanfasen ble overført til nye rør og inndampet til å konsentrere prøven. GC analysen ble utført ved hjelp av gasskromatografi. Relative verdier (areal %) av fettsyrene ble bestemt ved å bruke en bundet polyetylen-glykol stasjonær fase i en fleksibel silica kolonne (AOCS, 2009).

IMMUNOBLOTTING

Cellene ble lysert i 8M Urea buffer (8 M urea, 0.5% Triton X-100, 100mM DTT) for å ekstrahere proteinene. Proteinkonsentrasjonen ble målt ved Take3™ Micro-Volume Plate protein assay på Synergy HTX S1LFA plateleser (BioTek) og 50µg protein ble separert på 4-15% mini-protean TGX geler (BioRad) og overført på nitrocellulose membraner i Trans-Blot® (BioRad) ved semi-dry metoden. Membranen ble farget med Ponceau S for å bestemme den totale proteinmengde og så blokkert med 3% BSA i TBS. Membranen ble farget med primære antistoff (e.g. anti-HMOX1, Santa Cruz Biochemicals, sc-136960) overnatt ved 4°C og anti-mus HRP eller anti-mus C647 (Sigma SAB4600351) i en time ved romtemperatur. Membranen ble fremkalt ved Clarity Western ECL Substrate (Biorad) og/eller scannet på Gel-Doc™ (Biorad). Signalintensiteten ble kvantifisert i Image lab (BioRad).

ELISA

Mediet fra de behandlede cellene ble samlet inn, sentrifugert ned og lagret ved -20°C. Ulike fortynninger av en positiv kontroll ble testet til å finne den fortynningen som ligger innafor standardkurven. Mediet ble fortynnet tilsvarende og analysert i duplikat med CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA (R&D Dy266) i henhold til manualen. Elisaanalysis.com ble brukt til å lage en 4-parameter logistisk regresjons standardkurve til interpretasjon av analyseresultatene.

REAL-TIME PCR

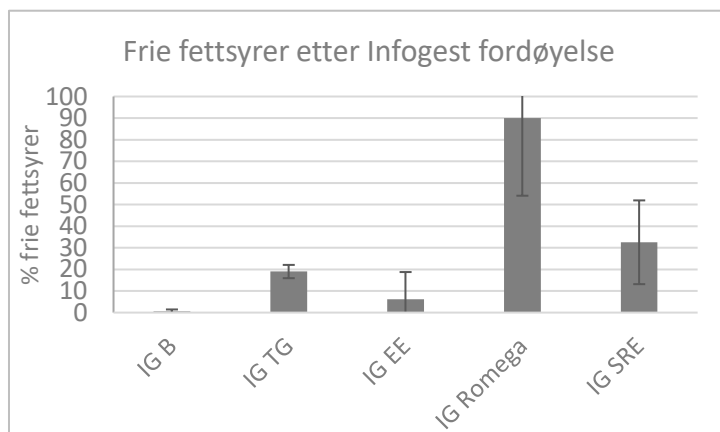
(brukt i bedriftsspesifikk uttesting)

Cellene ble lysert og RNA ekstrahert ved Quick-RNA Miniprep Kit (Zymo research). RNA konsentrasjon ble målt ved Take3™ Micro-Volume Plate RNA assay på Synergy HTX S1LFA plateleser (BioTek). cDNA ble laget ved iScript cDNA kit (BioRad) på en C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). CDNA ble analysert med PrimePCR™ Probe Assays og SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix på CFX96 Touch (alle BioRad).

3. RESULTAT OG DISKUSJON

TILLAGING AV MARINE OLJE SUBSTRAT

Frie fettsyrer kunne detekteres etter fordøyelse av oljene med alle utprøvde metoder. Kjemisk fordøyelse førte til deteksjon av 40% frie fettsyrer. Fordøyelse med LPLsp førte til opptil 22% frie fettsyrer fra TG oljen ved reaksjon i 20 timer, men mindre for alle andre oljer. Fordøyelse etter Infogest (IG) protokollen førte til $19 \pm 3\%$ frie fettsyrer (3 forsøk) fra TG oljen, som tilsvarer resultater fra litteraturen^{15,16}. Tilsetning av emulgatorer (Tween-80 eller fosfo-lecitin) gav varierende resultat og ble dermed utelatt. Generelt ble mindre frie fettsyrer detektert i fordøyet etylesterolje som kan skyldes dårligere fordøyelse eller hemmet deteksjon. Frigjøring av fettsyrer fra fosfolipidoljene varierte sterkt og det er kjent at fosfolipider kan interferere med analysen¹⁷ (Figur 6). Ved tilsetning på cellene ble fettsyrekonsentrasjon justert på likt nivå, løsemiddel avdampet og fettsyrene løst i cellemedium.

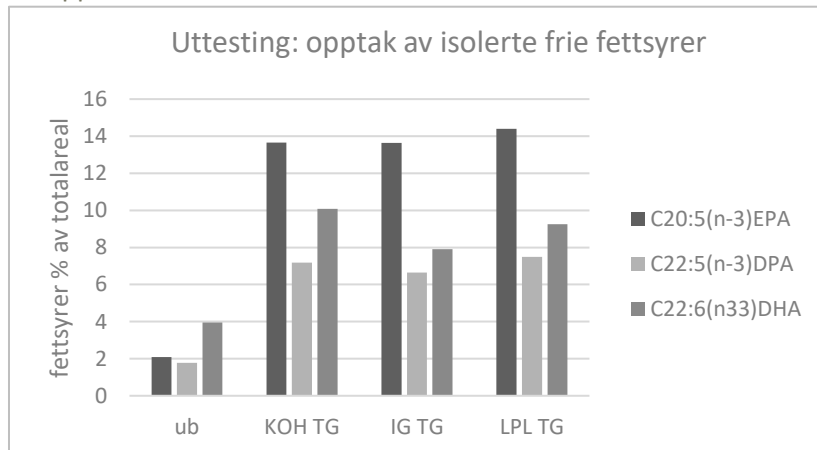


Figur 6: Andel frie fettsyrer etter Infogest (IG) fordøyelse i triglyserid (TG), etylester (EE), Romega® olje og silderognekstrakt (SRE), blank (B) er isolert fra fordøyelsesvæsken uten tilsetning av olje og fungerer som kontroll.

FETTSYREPROFIL I CELLENE

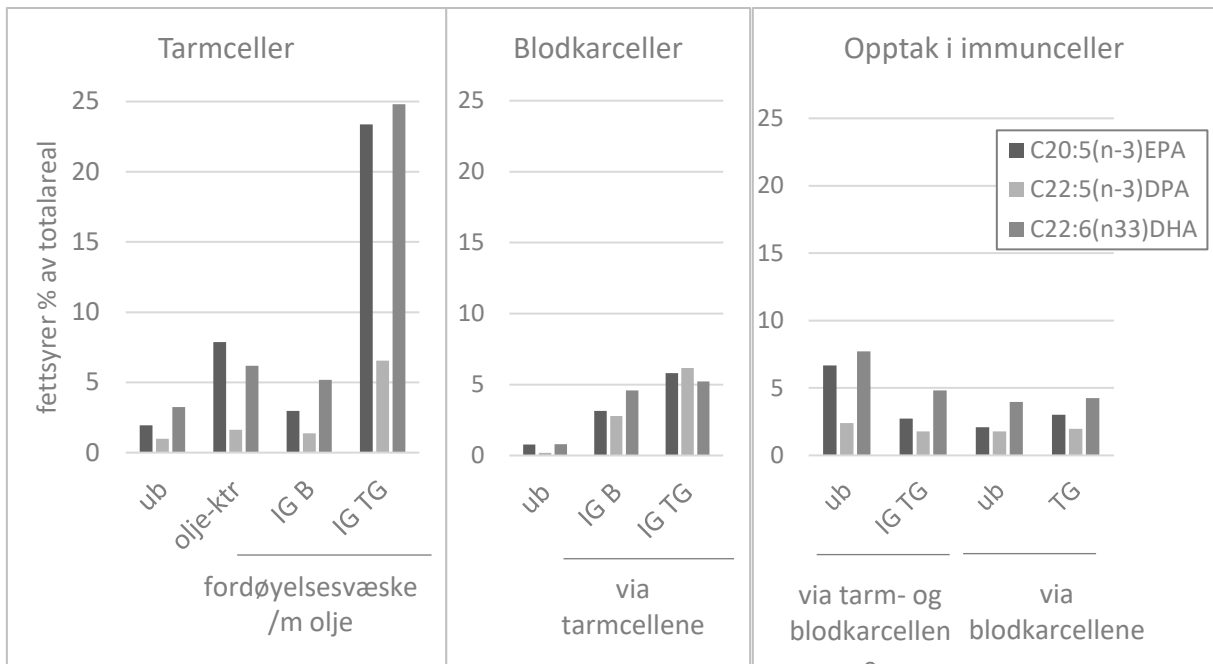
Uttesting av de ulike metodene

Direkte opptak av isolerte frie fettsyrer fra kjemisk fordøyelse (KOH), Infogest fordøyelse (IG), og lipoprotein lipase fordøyelse (LPL) ble testet på immuncellene ved tilsetning av like mengder frie fettsyrer overnatt og analyse av fettsyreprofilen. Figur 7 viser en nokså like økning av omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA i de behandlede cellene med alle tre metodene. Det tyder på at de ekstraherte frie fettsyrene har like andeler av omega-3 fettsyrer, som også kan bli tatt opp i cellene. Dermed ble det bestemt å fortsette med Infogest protokollen, siden dette simulerer best situasjonen i kroppen.



Figur 7: Andel av EPA, DPA og DHA i THP1 celler behandlet med frie fettsyrer isolert gjennom kjemisk fordøyelse (KOH), Infogest fordøyelse (IG) eller lipoprotein lipase fordøyelse (LPL) av triglyseridolje. ub= ubehandlet.

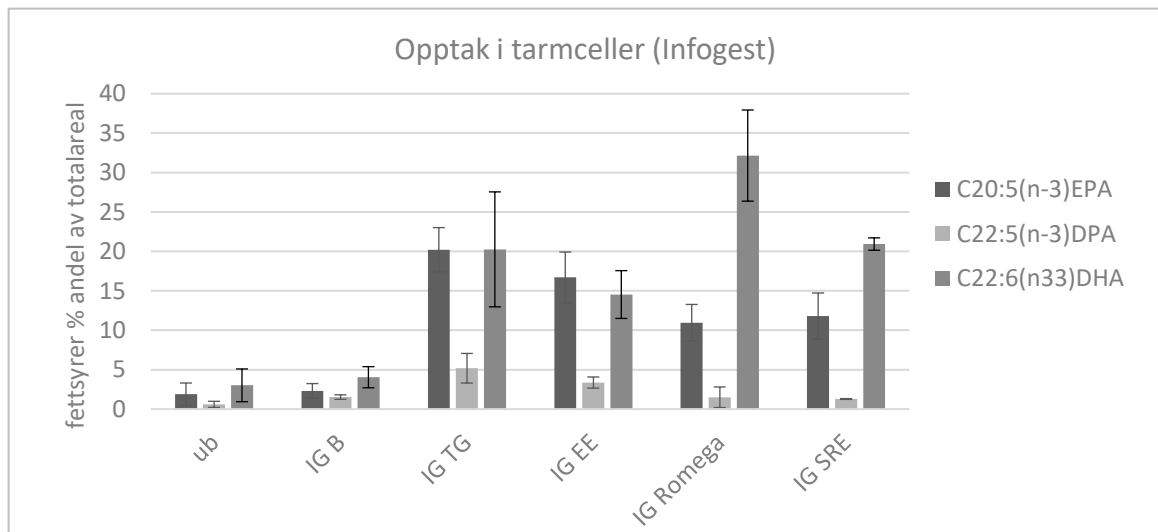
Videre ble det testet opptak og transport fra de fullstendige fordøyelsesvæskene gjennom tarmveggmodellen og blodkarveggmodellen med opptak i immuncellene (Figur 8). Som kontroll for at olje ikke henger i hovedsak på utsiden av cellene ble det tilsatt fordøyelsesvæske i 5 minutt og vasket bort igjen (olje-ktr). En ser at det blir en liten økning, men langt under økningen med TG olje behandling i 6 timer. Det tyder på at olje blir tatt opp over tid. For å kunne sikkert si at all forandring i fettsyreprofilen representerer opptak kunne bare fosfolipidene fra cellen analyseres som er en mer utfyllende analyse. En ser at det blir en tydelig anrikning av omega-3 fettsyrer i tarmcellene. Ved overføring av den basale fraksjonen fra tarmcellene til blodkarcellene blir det bare en minimal forskjell når TG olje var tilsatt i fordøyelsesvæsken på tarmcellene. Ved overføring av den basale fraksjonen av disse blodkarcellene til immuncellene blir det heller en nedgang enn noe opptak av omega-3 fettsyrer i immuncellene. Blodkarveggen kan hydrolysere triglyserider i blodet. Dermed ble det også testet tilsetningen av en oljeemulsjon på blodkarcellene. Overføring av den basale fraksjonen fra de emulsjon behandlede blodkarcellene førte ikke heller til opptak i immuncellene. Dermed blir fettsyrer fra fordøyelsesvæsken tatt opp i tarmceller, men ikke transportert effektivt nok til å kunne tas opp i videre celler. Opptak fra fordøyelsesvæsken i tarmceller og opptak av ekstraherte frie fettsyrer i immunceller var de to mest lovende metoder og ble gjentatt for å teste reproduserbarheten.



Figur 8: Opptak av fettsyrer i tarmcellene, blodkarcellene og immuncellene ved transport gjennom de ulike modellene.

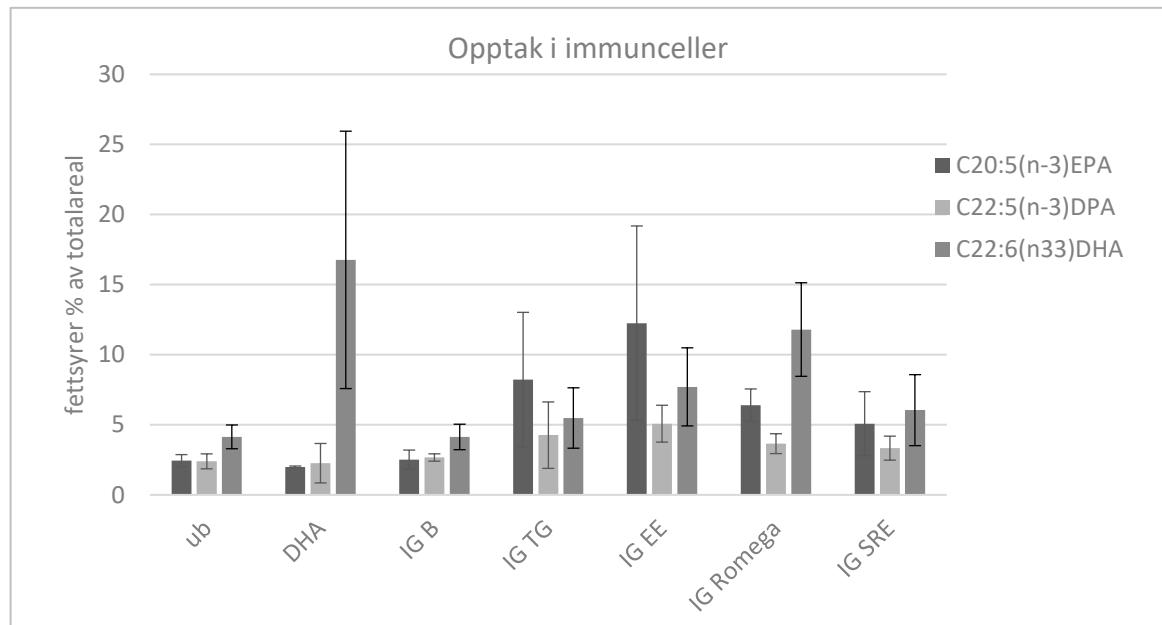
Resultater for opptak av frie fettsyrer fra fordøynelsesvæskene i tarmceller og ekstraherte frie fettsyrer i immunceller

Opptak i tarmcellene lar seg reproducere og viser en anriking av omega-3 fettsyrene tilsvarende fettsyreprofilen i de ulike oljene (Figur 9). Totalnivået av omega-3 fettsyrer ligger på rundt 30-40% for alle oljesubstrat. For videre verifisering av modellen kunne ulike konsentrasjoner og tilsetningstider testes. Det ville også vært spennende med funksjonelle effekter på e.g. inflammasjon i tarmcellene.



Figur 9: Opptak av omega-3 fettsyrer i tarmceller fra Infogest fordøyet olje (3 forsøk).

Opptak i immuncellene viste en del mer variasjon og lavere andel omega-3 fettsyrer opptatt enn tarmcellene (Figur 10). Rent DHA (fri fettsyre) ble brukt som kontroll og viser bra opptak. Den økte variasjonen skyldes trolig de videre steg med ekstraksjon og analysen av frie fettsyrer som begge kan introdusere avvik. Ved videre bruk av metoden burde den optimaliseres ytterligere for oljen som skal analyseres, samt å kjøre et forsøk med opptak fra forskjellige tilsetningskonsentrasjoner.



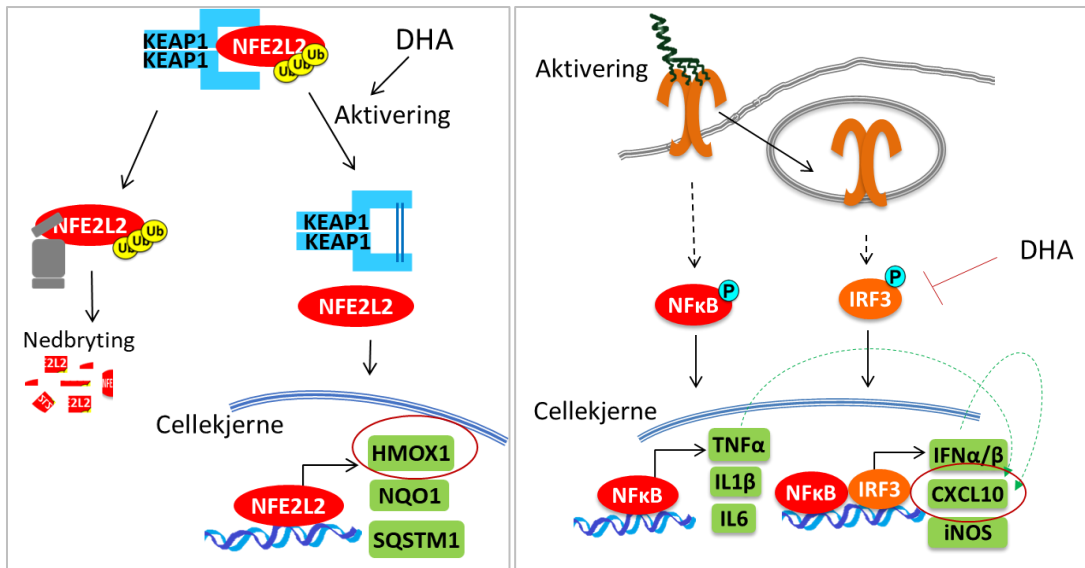
Figur 10: Opptak av omega-3 fettsyrer i immunceller av ekstraherte frie fettsyrer fra Infogest fordøyet olje (3 forsøk, untatt EE: 2 forsøk)

Til sammen ble det etablert en metode i labben som virker for opptak av omega-3 fettsyrer fra fordøyete marine oljer i tarmceller. Fordelen med opptak fra den fullstendige fordøyelsesvæsken er at cellene potensielt kan ta opp alle komponenter fra oljen. Til opptak i perifere vevsceller som immunceller kunne bare de ekstraherte frie fettsyrene brukes. Ved denne metoden blir alle andre komponenter enn de frie fettsyrene fjernet som kan være en begrensning i forhold den biologiske effekten til den fullstendige oljen. For fosfolipider (som har samme formen som lipidene i cellemembranen og som kan danne en emulsjon i vann) består muligheten å tilsette en emulsjon av ufordøyet olje direkte på cellene og en preliminær test tyder på at denne metoden kan føre til opptak. Ved videre interesse for optimalisering av metoden som ivaretar alle komponenter fra triglyseridolje kan kommersielle modeller av primære tarmceller med bedre transportegenskaper være en mulighet som kan testes.

REPRODUKSJON AV KJENTE EFFEKTER I IMMUNCELLER

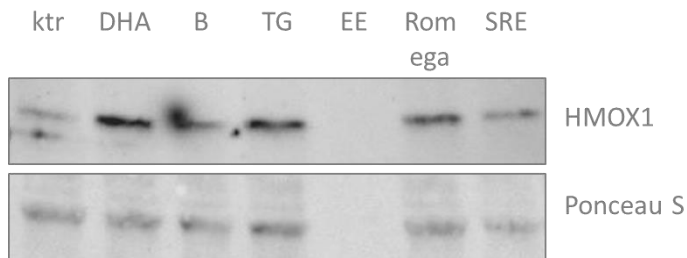
Til å validere opptaksanalysene ble det testet noen av effektene som er kjent for DHA som aktivering av antioksidant forsvaret i cellen og demping av betennelsessignaler.

DHA øker nivået av hemoksygenase 1 (HMOX1) som er et enzym i antioksidant forsvaret i cellen (Figur 11, venstre). DHA viste tidligere også sterk nedregulerende virkning på signalstoffet C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) som blir induisert av mange betennelsesrelaterte signalveier (Figur 11, høyre)^{18,19}.

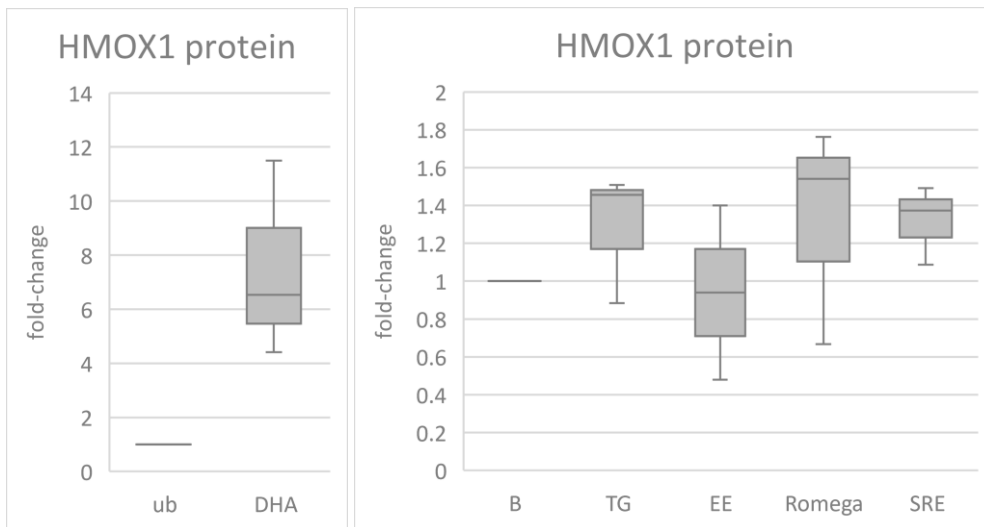


Figur 11: Aktivering av antioksidant forsvar ved tilskudd med DHA (venstre) og reduksjon av CXCL10 produksjon ved tilskudd med DHA under en betennelsesreaksjon (høyre)

Effekten til DHA på HMOX1 nivåene kunne bli reproduisert ved immunoblot analyse (Figur 12,13 venstre). Effekten til de ekstraherte fettsyrene varierer mer og er i snitt mye lavere enn effekten til DHA (Figur 13, høyre). Likevel finnes det en svak tendens til økte nivåer av HMOX1 med TG, Romega® og SRE når en sammenligner effekten direkte med cellene som fikk ekstraksjonen uten tilsatt olje (blank, B). EE førte til veldig høy økning i HMOX1 nivå i ett forsøk som ikke er tatt med i figuren (dobbel så høyt som DHA), mens resten av forsøkene gav økende og minkende nivåer.



Figur 12: HMOX1 nivå i immunceller med tilskudd av DHA og ekstraherte fettsyrer frå marint olje, analysert ved immunoblot, eksempel for ett forsøk. DHA, TG og Romega fører til økt intensitet i dette forsøket. EE hadde for lite protein for å kunne bli analysert.

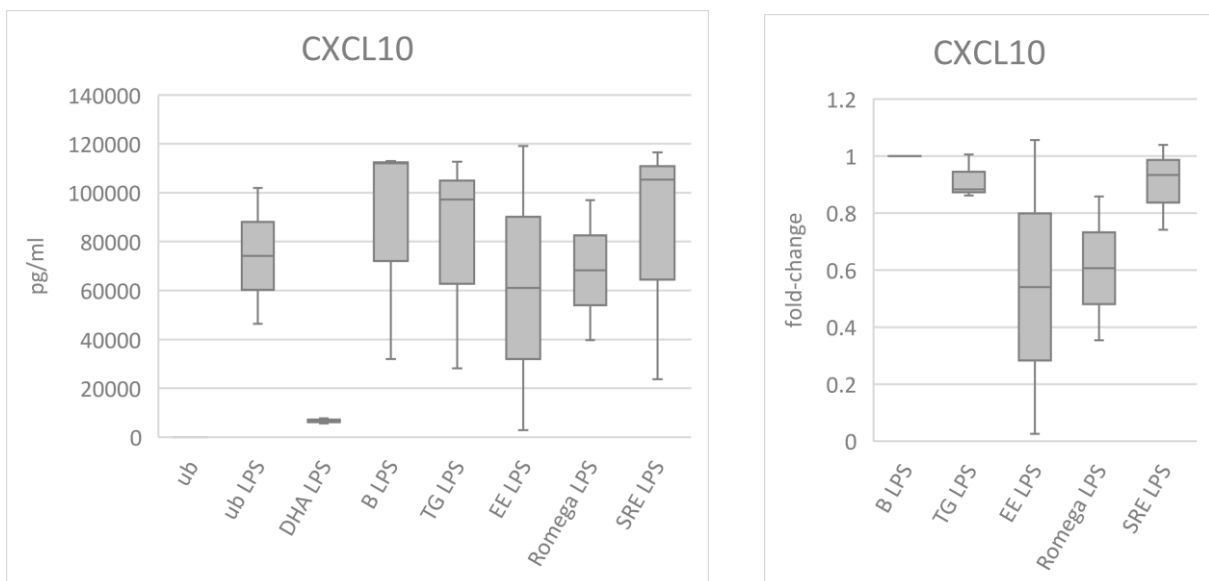


Figur 13: HMOX1 nivå i immunceller med tilskudd av DHA og ekstraherte fettsyrer fra marint olje, analysert ved immunoblot og kvantifisert i 3 forsøk.

Høyre: effekten av de ekstraherte fettsyrer direkte sammenlignet med cellene behandlet med blank (B).

Effekten av DHA på CXCL10 nivåene kunne reproduseres ved ELISA som viser en sterk økning av CXCL10 når betennelsen ble igangsatt med LPS (ub LPS) og en tydelig nedregulering når cellene først ble behandlet med DHA (DHA LPS). De ekstraherte fettsyrene viser den samme tendensen, men med mye mindre effekt enn DHA (Figur 14).

For begge analysene antas det at effektene vil bli mer tydelige ved ytterligere optimalisering for behandlingkonsentrasjonen. I forsøkene som ble kjørt her er faktisk innhold av omega-3 fettsyrer i de ekstraherte frie fettsyrene ukjent, noe som burde analyseres i videre studier. I tillegg ble analysene kjørt i slutten av prosjektet og lagring av de ekstraherte fettsyrene har muligens en negativ effekt på innholdet av omega-3 fettsyrer. Det antas at ekstraksjon og mer direkte bruk vil føre til bedre resultat.



Figur 14: Absolut CXCL10 nivå (pg/ml) skillt ut fra immunceller med tilskudd av DHA eller ekstraherte fettsyrer, analysert ved ELISA (ventre). Høyre: direkte sammenlignet med cellene behandlet med blank (B).

BEDRIFT-SPESIFIKKE ANALYSER

Til slutt ble det testet noen produkt og helse-relaterte aspekt som var av interesse for de involverte bedriftene. Konfidensielle rapporter om resultatene ble sendt til de involverte. Resultatene er stort sett lovende og kan gi anledning til videre prosjekt.

4. KONKLUSJON

Prosjektet lyktes med å etablere to laboratoriemetoder for opptak av omega-3 fettsyrer fra fordøyete marine oljer i tarmceller og immunceller. Tarmcellene kunne ta opp fettsyrer fra den fullstendige fordøyelsesvæsken med fordelen at cellene potensielt kan ta opp alle komponenter fra oljen. Til opptak i perifere vevsceller som immunceller kunne bare de ekstraherte frie fettsyrene brukes. Ved denne metoden blir alle andre komponenter enn de frie fettsyrene fjernet som kan være en begrensning i forhold den biologiske effekten til den fullstendige oljen.

Det ser ut som det er mulig å analysere biologiske effekter av ekstraherte fettsyrer fra marine oljer i cellemodeller. Til videre bruk må denne metoden optimaliseres ytterligere i forhold til innhold av de ekstraherte fettsyrene og tilsetningskonsentrasjoner for den konkrete oljetypen av interesse for å redusere variasjonen og øke effektene. Muligens kunne de funksjonelle analysene knyttes direkte til opptak av fettsyrer for å forklare eventuelt avvik bedre.

Resultatene fra den bedriftsspesifikke uttestingen er stort sett lovende og vil bli fulgt opp videre.

Prosjektet har gitt et godt grunnlag til etablering av flere cellebiologiske analysemodeller til den marine næringen. Takk til Sparebanken Møre, som støttet utvikling av laboratorieinfrastruktur og etablering av metodene som dette prosjektet kunne profitere av.

6. REFERANSER

1. Richardsen. Norwegian marine ingredient industry. Norwegian title: Norsk marin ingrediensindustri. *SINTEF* p22 (2014).
2. Calder. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1851**, 469–484 (2015).
3. Wang *et al.* New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 1203–1223 (2013).
4. Luchoomun & Hussain. Assembly and Secretion of Chylomicrons by Differentiated Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 19565–19572 (1999).
5. van Greevenbroek *et al.* Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **141**, S9–S16 (1998).
6. Saito-Sasaki *et al.* Maresin-1 suppresses imiquimod-induced skin inflammation by regulating IL-23 receptor expression. *Sci. Rep.* **8**, 5522 (2018).
7. Pizato *et al.* Omega-3 docosahexaenoic acid induces pyroptosis cell death in triple-negative breast cancer cells. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
8. Harvey *et al.* Modulation of endothelial cell integrity and inflammatory activation by commercial lipid emulsions. *Lipids Health Dis.* **14**, 9 (2015).
9. Ruyter *et al.* *Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler.* (Rubin, 2010).

10. Salimon *et al.* Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chem. Cent. J.* **5**, 67 (2011).
11. Minekus *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct. Food Funct* **5**, 1113–1124 (2014).
12. Vinarov *et al.* Effects of emulsifier charge and concentration on pancreatic lipolysis: 2. Interplay of emulsifiers and biles. *Langmuir* **28**, 12140–12150 (2012).
13. Lowry & Tinsley. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **53**, 470–472 (1976).
14. Bernárdez *et al.* Modified Method for the Analysis of Free Fatty Acids in Fish. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1903–1906 (2005).
15. Lefils *et al.* Dietary DHA: Time course of tissue uptake and effects on cytokine secretion in mice. *Br. J. Nutr.* **104**, 1304–1312 (2010).
16. Jumpsen *et al.* Fatty acids in blood and intestine following docosahexaenoic acid supplementation in adults with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **5**, 77–84 (2006).
17. Falholt *et al.* An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clinica Chimica Acta* **46**, (1973).
18. Johansson *et al.* The marine n-3 PUFA DHA evokes cytoprotection against oxidative stress and protein misfolding by inducing autophagy and NFE2L2 in human retinal pigment epithelial cells. *Autophagy* **11**, 1636–1651 (2015).
19. Mildemberger *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).



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