

# Sluttrapport DOCMAR

## Delprosjekt: Fosfolipider og nukleotider

Anita Røyneberg<sup>1</sup>, Beate Klementsén<sup>1</sup> og Livar Frøyland<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES),  
Postboks 2029 Nordnes, 5817 Bergen, Norge.



**Kontaktperson:**

Anita Røyneberg

NIFES

Postboks 2029 Nordnes

5817 Bergen

Telefonnummer: 55905152

Epost: [aro@nifes.no](mailto:aro@nifes.no)

**Følgende bedrifter har bidratt:**

- EXIMO
  - marine fosfolipid
- Erik Løvaas ved Bio-Sea Management AS
  - marine fosfolipid
- Vesterålen Naturprodukt
  - etylestere
- Bjørge Biomarin
  - nukleotider

Prosjektet har vært delfinansiert av Rubin ([www.rubin.no](http://www.rubin.no)), Innovasjon Norge ([www.invanor.no](http://www.invanor.no)) og NIFES ([www.nifes.no](http://www.nifes.no))

# Innholdsfortegnelse

<b>1. BAKGRUNN</b> .....	<b>3</b>
FETTSYRER OG INFLAMMASJON .....	3
PROSTAGLANDINER OG CYTOKINER .....	3
OMEGA-3 OG GENUUTTRYKK .....	4
INFLAMMATORISK TARMSYKDOM (IBD).....	4
FORMÅL .....	5
PROSJEKTMÅL .....	5
<b>2. MATERIAL OG METODE</b> .....	<b>5</b>
2.1 MUSEFORSØK; DSS-INDUSERT KOLITT I UNGE MUS FÔRET MED MARINE FOSFOLIPID OG NUKLEOITIDER .....	5
<i>Bedømmelse av inflammasjon</i> .....	6
<i>Histologi</i> .....	7
<i>Fettsyreanalyse</i> .....	7
<i>Syreløselige nukleinsyrebaser</i> .....	7
<i>Real time RT-PCR</i> .....	7
2.2 ROTTEFORSØK DSS: EFFEKT AV OMEGA-3 I FORM AV MARINE FOSFOLIPID PÅ DSS-INDUSERT KOLITT HOS ROTTER .....	8
<i>Dietter</i> .....	8
<i>Studie design</i> .....	8
2.3 ROTTEFORSØK; ULIKE STRUKTURELLE FORMER AV OMEGA-3 PUFA OG FETTSYREPROFIL I HJERNE, LEVER OG RØDE BLOD CELLER (MASTEROPPGAVE ANITA RØYNEBERG) .....	9
<i>Studie design</i> .....	9
<i>Dietter</i> .....	10
<i>Fettsyreanalyse</i> .....	11
<b>3. RESULTAT OG DISKUSJON</b> .....	<b>11</b>
DSS-INDUSERT KOLITT I UNGE MUS .....	11
DSS-INDUSERT KOLITT I ROTTE .....	12
STRUKTURELL PÅVIRKNING AV MARINE OMEGA-3 FETTSYRER .....	14
<b>4. KOMMERSIALISERINGSPOTENSIALE</b> .....	<b>18</b>
<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>19</b>
<b>PUBLISERING</b> .....	<b>19</b>
<b>REFERANSER</b> .....	<b>20</b>

# 1. Bakgrunn

Inflamasjon er kroppens umiddelbare respons på infeksjoner eller skade. Det er en viktig respons for å eliminere patogener og toksiner, samt å reparere skadet vev. Inflamasjon og den inflammatoriske responsen er en del av den normale, medfødte immunresponsen. Det kan allikevel skje at inflammasjonen kommer ut av kontroll, og det er da sykdom oppstår.

## Fettsyrer og inflammasjon

Linken mellom fettsyrer og inflammasjon baseres på oppbygningen av cellemembranen til inflammatoriske celler. Cellemembranen består i stor grad av fosfolipider, og membranens fysikalske natur, også kalt fluiditet, reguleres i stor grad av fettsyresammensetningen i fosfolipidene. Membranens fluiditet påvirker aktiviteten til membranbundne proteiner som reseptorer, transportører og enzymer; som igjen kan endre den inflammatoriske celledens respons til stimuli. I tillegg genererer membranfosfolipidene eicosanoider fra fettsyrene som frigjøres og fungerer som mediatorer i celleresponser.

Inflammatoriske celler inneholder mye av arachidonsyre (AA; 20:4n-6), som er en omega-6 PUFA, og mindre av EPA (20:5n-3), som er av omega-3 PUFA familien. Økt inntak av fisk, eller fiskeoljer, som er rike på langkjedede flerumettede (PUFA) omega-3 fettsyrer, resulterer i økt mengde av EPA og DHA (22:6n-3) i fosfolipidene til inflammatoriske celler, delvis på bekostning av AA. Hovedfunksjonen til AA er som substrat for syntese av bioaktive mediatorer av eicosanoid familien. Metabolisme av AA av enzymet cyclooxygenase (COX) fører til prostaglandiner (PG) og tromboxaner (TX). Eicosanoider er med på å modulere intensitet og varighet av inflammasjonsresponsen. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) har en rekke proinflammatoriske egenskaper som inkluderer feber, økt vaskulær permeabilitet og vasodilatasjon. I en inflammatorisk tilstand øker produksjonsraten av AA-deriverte eicosanoider, og man finner økte nivåer av disse i blod og vev hos pasienter med ulike inflammatoriske plager og sykdommer. Ved en betydelig økning av inntaket av omega-3 PUFA øker også nivået av disse fettsyrene i cellenes fosfolipider på bekostning av AA, og det fører til at man får mindre substrat tilgjengelig for syntese av AA-deriverte eicosanoider. Det er vist at fiskeolje reduserer inflammatoriske cellers evne til å syntetisere eicosanoider fra AA, og det har ledet til en teori som sier at fiskeolje har anti-inflammatoriske egenskaper.

## Prostaglandiner og cytokiner

Fettsyren AA er utgangspunkt for dannelsen av de proinflammatoriske eicosanoidene PGE<sub>2</sub> og leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), via de enzymatiske banene, henholdsvis, COX og 5-lipoxygenase (5-LOX). PGE<sub>2</sub> kan gi smerte og vasodilatasjon, og LTB<sub>4</sub> er en chemoattraktant og neutrofil aktivator. Det gir at lipid mediatorer kan være involvert i smerte, rødhet, og opphovning som skjer i den akutte inflammasjonsreaksjonen.

EPA, som er en omega-3 homolog til AA, kan inhibere AA metabolisme fullstendig ved å fungere som substrat for COX og 5-LOX (et annet enzym som danner eicosanoider), som resulterer i en suppresjon av produksjonen av omega-6 eicosanoid inflammatoriske mediatorer. EPA er et potensielt COX substrat for syntese av PGE<sub>3</sub>, som også har inflammatorisk aktivitet, men PGE<sub>3</sub> syntesen skjer ved lav effektivitet, eller ikke i det hele tatt. EPA er også substrat for 5-LOX, som kan danne LTB<sub>5</sub>, men LTB<sub>5</sub> har liten inflammatorisk aktivitet sammenlignet med LTB<sub>4</sub> (Goldman, Pickett et al. 1983). Det gir at EPA deriverte eicosanoider er mindre biologisk aktive enn AA deriverte eicosanoider, og på denne måte gir et økt inntak av omega-3 fettsyrer en endring i balansen av eicosanoider som produseres, til en mindre inflammatorisk blanding av mediatorer.

Cytokinene IL-1 $\beta$  og TNF $\alpha$  har proinflammatoriske cellulære virkemåter. Mens eicosanoidene virker i den tidlige fasen av inflammasjon, er cytokinene implisert i den senere fasen. Et økt inntak av omega-3 fettsyrer via kosten undertrykker produksjonen av både IL-1 $\beta$  og TNF $\alpha$

### **Omega-3 og genuttrykk**

Studier viser at omega-3 PUFA kan redusere uttrykket av inflammatoriske gener for blant annet TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  og IL-6. I tillegg virker omega-3 PUFA direkte på intracellulære signalbaner som leder til aktivering av transkripsjonsfaktorer. Nucleare factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) er en transkripsjonsfaktor som er involvert i induksjonen av en rekke inflammatoriske gener som blant annet; COX-2, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  og IL-6 (Dubuquoy, Jansson et al. 2003). Nyere forskning tyder på at en av de anti-inflammatoriske egenskapene til fiskeolje er å redusere aktiviteten til NF $\kappa$ B. En annen gruppe transkripsjonsfaktorer som er av interesse i inflammasjonsprosessen er peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). PPAR foreligger i flere isoformer, PPAR $\alpha$  og PPAR $\gamma$ . Disse har vist å inhibere induksjon av en rekke inflammatoriske gener som TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 og COX. PPAR kan binde og reguleres av PUFA og eicosanoider. Mus som mangler PPAR $\alpha$  har en forlenget immunrespons til stimuli, og det er foreslått at PPAR $\alpha$  aktivering har anti-inflammatorisk egenskaper. Uttrykket av PPAR $\alpha$  og PPAR $\gamma$  i henholdsvis lever og fettvev, et vist å øke i mus føret med fiskeolje.

### **Inflammatorisk tarmsykdom (IBD)**

I Norge lider ca 12 000 mennesker av kronisk inflammatorisk tarmsykdom (IBD). IBD er en kronisk sykdom i fordøyelsestrakten, og deles inn i to relaterte sykdommer; ulcerøs kolitt, som karakteriseres ved en betennelsesforandring i tykktarm og endetarm, og Crohns sykdom, som kan gi betennelsesforandringer fra munn til endetarm (Fiocchi 1998). Sykdommenes etiologi er ukjent, men en tror at en overdrevet immunrespons i tarmen til stimuli som ellers ikke er skadelige, spiller en viktig rolle i patofysiologien til disse sykdommene. Som følge av en overdrevet immunrespons oppreguleres syntese og utslipp av ulike profinflammatoriske mediatorer som eicosanoider og cytokiner. Karakteristisk for begge sykdommene er perioder med plagsomme symptomer, som diaré og magesmerter, og perioder med remisjon av symptomer.

Det finnes foreløpig ingen spesifikk kausal behandling av IBD, og behandlingene som gis er empiriske. Medisiner som brukes for håndtering av IBD har ofte alvorlige bivirkninger som begrenser bruken av disse (Stein and Hanauer 2000). Det gjør at en diettbasert håndtering/behandling av plagene som oppstår som følge av IBD kan være et godt alternativ til medisinsk behandling, uten negative bivirkninger. Flerumettede fettsyrer (PUFA) tilhørende omega-3 familien har vist seg å ha betennesdempende effekter i kroppen (Belluzzi 2004). Dette er også vist i en rekke studier hos pasienter med IBD (Belluzzi, Boschi et al. 2000; Bjorkkjaer, Brunborg et al. 2004). I de fleste studier med marine omega-3 fettsyrer blir disse gitt i form av etylestere, eller triacylglycerol fra fiske- eller selolje. Marine fosfolipider (MPL) er rik på langkjedede omega-3 fettsyrer, men denne formen av omega-3 er lite brukt i studier hvor det gis omega-3 supplement. Dette til tross for at flere studier (Lemaitre-Delaunay, Pachiardi et al. 1999; Wijendran, Huang et al. 2002) nå kan vise at denne formen av omega-3 ser ut til å ha en høyere biotilgjengelighet enn de andre formene.

Ulcerøs kolitt er en tilstand som ikke finnes naturlig hos rotte. Ved å gi rotter dextran sulfat sodium (DSS) blandet i drikkevannet induseres det betennelsesforandringer i tarmen til rottene som er svært lik de en finner ved ulcerøs kolitt hos menneske. DSS-indusert kolitt er den mest brukte dyremodellen for studier på IBD da metoden induserer en rask kolitt via

drikkevannet, og rottene blir ikke eksponert for bedøvelse nødvendig for intrarektal skade av tarm ved trinitrobenzesulfonuc syre (TNBS).

## **Formål**

Undersøke helse-effekten av marine fosfolipider og nukleotider.

## **Prosjektmål**

1. Produsere, fraksjonere og karakterisere marine fosfolipider og nukleotider fra fiskemelke og rogn.
2. Dyrestudier og hvis mulig kliniske pilotstudier
3. Nye bruksmåter for marine fosfolipider og nukleotider

## **2. Material og metode**

Det ble gjort 3 dyreforsøk i prosjektet. Det første var et museforsøk som ble gjennomført av Beate Klementsén. Hun ønsket å undersøke hvordan en kolitt-tilstand hos unge mus påvirkes av inntak av marine fosfolipid og marine nukleotider. Denne modellen ble brukt i et nytt forsøk med rotter som modelldyr, hvor ble det undersøkt om marine PL kan bedre sykdomsbilde av induert kolitt. I det siste forsøket ble det undersøkt om den strukturelle formen av omega-3 som gir påvirker inkorporering av disse fettsyrene i hjerne, lever og røde blod celler. I dette forsøket ble marine PL testet mot blant annet laks, selolje, tran og kapsler. I det siste dyreforsøket.

### **Marine fosfolipid og nukleotider**

Vi valgte å innhente marine fosfolipider (PL) og nukleotider (NU) fra produsenter i Norge fremfor å gjøre denne produksjons-, fraksjonerings- og karakteriseringsjobben selv. Produsentene som ble valgt i museforsøket var Eximo når det gjaldt PL og Bjørge Biomarin når det gjaldt NU. Eximo ble også brukt i det første rotteforsøket, mens marine PL fra Erik Løvaas ved Bio-Sea Management i Tromsø ble brukt i det siste rotteforsøket.

### **2.1 Museforsøk; DSS-indusert kolitt i unge mus føret med marine fosfolipid og nukleotider**

For å teste de helsemessige effektene av marine PL og nukleotider (NU) valgte vi en dyremodell som gir betennelsesforandringer i tarm som er ganske like dem man finner i den humane sykdomstilstanden ulcerøs kolitt. Det ble gjennomført et forsøk med mus i denne modellen. Dyrene ble først gitt eksperimentell diett i form av høy og lav konsentrasjon av hhv. PL, NU og soyalecitin i 2 uker, for så å gå over på standard-diett i 1 uke samtidig som de fikk induert kolitt med dextran sodium sulfat (DSS).

Det ble brukt 3- til 4 uker gamle hann BALB/C mus (Tactonic, Danmark) som veide  $14 \pm 2$ g ved start av forsøket. De ble holdt under standardiserte forhold med 12/12 timers lys/mørke, temperatur på  $21^{\circ}\text{C}$ , og en relativ luftfuktighet på  $65 \pm 15$  %. Dyrene hadde en akklimatiseringsperiode på 6 dager, hvor de fikk standard musediett. Dyrene hadde i denne perioden fri tilgang til mat og springvann. Etter akklimatiseringsperioden ble dyrene tilfeldig fordelt i 8 grupper, med 6 dyr i hver gruppe. Dyrene ble plassert i individuelle bur hvor de

fikk den eksperimentelle dietten som vist i tabell 1. Tabell 1 viser den fullstendige sammensetningen av diettene.

**Tabell 1. Sammensetning av de eksperimentelle diettene**

g/kg diet	Experimental groups						
	Control	High PL <sup>a</sup>	Low PL <sup>b</sup>	High NU <sup>c</sup>	Low NU <sup>d</sup>	High soya <sup>e</sup>	Low soya <sup>f</sup>
<b>Protein</b>	227.0	227.0	227.0	227.0	227.0	227.0	227.0
<b>Soybean oil<sup>1</sup></b>	100	80	95.1	97.56	99.76	80	95.1
<b>Sucrose</b>	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2	90.2
<b>Vitamins<sup>2</sup></b>	10	10	10	10	10	10	10
<b>Minerals<sup>3</sup></b>	35.09	35.09	35.09	35.09	35.09	35.09	35.09
<b>Cellulose</b>	50.13	50.13	50.13	50.13	50.13	50.13	50.13
<b>Dextrin</b>	472.04	472.04	471.94	471.97	472.03	472.04	471.94
<b>PL<sup>4</sup></b>	-	20	5	-	-	-	-
<b>NU<sup>5</sup></b>	-	-	-	2.51	0.25	-	-
<b>Soy<sup>6</sup></b>	-	-	-	-	-	20	5
<b>Supplement</b>	10.03	10.03	10.03	10.03	10.03	10.03	10.03
<b>L-cysteine</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>Cholin (tartrat)</b>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<b>t-butylhydrat</b>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

<sup>1</sup> Fettsyresammensetning i soyaolje (g/100 g fat): 18:2n-6 (56.8), 18:1n-9 (20.0), 16:0 (11.1), 18:3n-3 (6.3), 18:0 (3.4), 18:1n-7 (1.5), 22:0 (0.5), 20:0 (0.3), 20:1n-9 (0.2) <sup>2</sup> Vitaminer (mg/kg diet): 8 mg vit A (4 000 IU), 2 mg vit D3 (1 000 IU), 60 mg vit E (30 IU), 0.1 mg vit K (0.05 IU), 1000 mg choline hydrogentartrate, 4 mg thiamine, 3 mg riboflavin, 6 mg pyridoxine, 20 mg niacin, 8 mg Ca-pantotenal, 1 mg folin, 5 mg vit B12 (0.05 IU) <sup>3</sup> Mineraler (g/kg diet): 8.5 g CaCO<sub>3</sub>, 6.2 g CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 12.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.4 g MgCO<sub>3</sub>, 0.4 g NaCO<sub>3</sub>, 0.8 g NaCl, 0.02 g CuCO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.0002 g KI, 0.2 g FeSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O, 0.05 g ZnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O <sup>4</sup> PL: fosfolipider fra lodderogn (EXIMO AS, Tromsø, Norway) <sup>5</sup> NU: nucleotide-mix (DNA hydrolysate) fra fiskerogn (Bjørge Biomarin AS, Ellingsøy, Norway) <sup>6</sup> Soy: L-α-phosphatidylcholine fra soyabønne fosfolipid (Sigma) <sup>a</sup> High PL: 20% av totalt fett i diett <sup>b</sup> Low PL: 5% av totalt fett i diett <sup>c</sup> High NU: 2.5% av diett <sup>d</sup> Low NU: 0.25% av diett <sup>e</sup> High soy: 20% av totalt fett i diett <sup>f</sup> Low soy: 5% av totalt fett i diett.

Dyrene fikk daglig like mye fôr, som ble tilpasset dyrenes vekstbehov. Etter 14 dager med eksperimentelt fôr, ble dyrene satt tilbake på standard diett. Samtidig ble kolitt induisert ved å erstatte springvann med en 4 % løsning (w/v) med dextran sulfat sodium (DSS) (MW 44 000, TdB, Consultancy AB, Uppsala, Sverige) som var løst i vann. Alle gruppene med unntak av en kontrollgruppe fikk DSS i 5 dager. Etter DSS-behandlingen fikk musene springvann i 2 dager.

### Bedømmelse av inflammasjon

Dyrene som fikk DSS ble undersøkt daglig. Det innebar å undersøke konsistens av feces, og synlig blod i avføring. Dyrenes vekt ble målt ved start av DSS-behandling, og ved avslutning av forsøket. På dag 7 etter starten på DSS-behandlingen ble dyrene avlivet. De ble anestesert subkutan med 1:1 Hypnorm/Dormicum (Fentanyl/Fluanisone-Mizadolam, 0.075 ml/100g kroppsvekt) etterfulgt av cervikal dislokasjon. Kolon ble fjernet fra ceco-colonic junction til rektum, målt, kuttet longitudinalt og vasket forsiktig før den ble transversalt delt for histologi, fettsyre analyse, analyse for fettløselige nukleinsyrer og mRNA analyser.

## Histologi

Histologi ble utført på den distale delen av kolon. Prøvene ble umiddelbart fiksert 24 timer i 4 % formaldehyd før prosessering og innsetting i en parafinblokk. Deler på 5 µm ble farget med hematoxylin og eosin, og undersøkt i lysmikroskop. De histologiske evalueringene ble utført blindet etter et validert scringssystem (Onderdonk and Bartlett 1979; Murthy, Cooper et al. 1993).

## Fettsyreanalyse

Fett ble ekstrahert fra kolon etter Folch (Lees, Folch et al. 1959) prosedyre, ved bruk av kloroform/metanol (2/1 v/v) til et endelig volum 20 x volumet av prøven. Lipid ekstraktet ble forsåpet med 0,5M NaOH ved 100°C i 15 min, og transmetylert med 20 % BF<sub>3</sub> ved 100°C i 5 min. Esterene ble ekstrahert fra løsningen ved å tilsette 2 ml hexan og 2 ml vann (Lie and Lambertsen 1991).

Metylestere ble analysert med gasskromatografi ("cold on column" injeksjon, 60<sup>25°C/min</sup> 160<sup>25°C/min</sup> 190<sup>25°C/min</sup> 220<sup>25°C/min</sup>) pakket med en 50 m CP sil 88 (Chrompack) silica kapillær kolonne. Fettsyrene ble identifisert etter retensjonstid ved hjelp av en standardløsning av metylestere (NU-Check-Prep, Elyan, MN, USA). Fettsyresammensetningen ble kalkulert ved hjelp av en integrator (TotalChrom Navigator, Version 6.2.1) koblet til gasskromatografen.

## Syreløselige nukleinsyrebaser

Syreløselige nukleinsyrebaser ble ekstrahert fra kolonprøver etter metode som er beskrevet av Windmueller (Windmeuller 1965). På grunn av lite prøvemateriale ble kolonprøvene fra hver gruppe poollet før analyse. Kolonprøvene ble pulverisert og homogenisert i 5 % sulfosalicylin syre, holdt på is i 30 min og sentrifugert ved 5000g<sub>av</sub> i 15 min. 200 µl av supernatanten, som inneholder syreløselige nukleinsyrer, ble blandet med 200 µl 0.4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og hydrolysert i 2 timer ved 110 ± 2°C for å frigjøre purine og pyrimidine baser. Nukleinsyre basene ble separert i et isokratisk HPLC system, utstyrt med en 150\*4.6 mm id Platinum EPS C18 kolonne (Alltech USA), med 0.1M fosforsyre og 0.2M natrium perklorat som buffer (pH2.0). Basene ble detektert ved 260 nm og kvantifisert med eksterne standarder (Sigma).

## Real time RT-PCR

Totalt RNA ble rensert fra kolon med Trizol (Gibco BRL/Life Technologies som anbefalt av leverandør). Revers transkripsjon ble utført i 25 µl reaksjoner som inneholdt Invitrogen 1<sup>st</sup> Stand Buffer, 6 µM av oligo d(T) (Applied Biosystems), 10mM dithiothreitol, 40 enheter av RNAGuard (Amersham Pharmacia Biotech), 0,9mM dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech), 1 µg av total RNA og 200 enheter med Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Reaksjonene stod 10 min i romtemperatur, etterfulgt av innkubering ved 37°C i 1 time. Etter cDNA syntese ble reaksjonene fortynnet med 50 µl vann og frosset ved -80°C. PCR ble gjort i 25 µl reaksjoner som inneholdt SYBR Green Mastermix (Applied Biosystems), 1.5 µl fortynnet cDNA og 300nM av hver primer. Reaksjonsløsningene ble forvarmet til 95°C i 10 min. Denaturering ble etterfulgt av 40 sykluser med smelting: 95°C i 15 s; annealing: 60°C i 30 s; elongering 72°C i 60 s (ramp 45 s mellom 72°C og 78°C); målinger 78°C i 30 s. Alle resultat ble normalisert til TATA-box protein (TBP).

## 2.2 Rotteforsøk DSS: Effekt av omega-3 i form av marine fosfolipid på DSS-indusert kolitt hos rotter

Hensikten med forsøket var å vurdere beskyttende og anti-inflammatoriske effekter av marine fosfolipid i en rottemodell for ulcerøs kolitt. Da det ikke ble funnet noen effekt av marine nukleotider i det første museforsøket valgte vi å bare jobbe videre med marine PL.

Voksne Wistar hannrotter (Tactonic, USA) som veide 200 g ved forsøkets start ble etter 5 dagers akklimatisering oppstallet i enkeltbur. De ble holdt under samme forhold som de andre 2 forsøkene. Dyrene ble handlet daglig, og gikk samlet gruppevis noen timer hver dag for sosialisering.

### Dietter

Dyrene ble tilfeldig delt i 3 diettgrupper; kontroll, marine fosfolipid (MPL), vegetabilsk fosfolipid (VPL). Hver diett inneholdt 18 % protein (casein, Sigma), 20.05 % grunnblanding, 4 % fett (hvorav 25 % i form av fosfolipid), og ca 55 % karbohydrat (dextrin, Sagogryn, Asko Hannevik AS). En fullstendig oversikt over ingrediensene som ble tilsatt i fôrene er gitt i tabell 4. De marine fosfolipidene (MPL) som ble brukt ble gitt av Erik Løvaas ved Bio-Sea Management i Tromsø (for full produktbeskrivelse se vedlegg 1), mens de vegetabiliske fosfolipidene (VPL), basert på soyabønner, var fra Sigma. Løvaas utførte acetonfelling på både MPL og VPL for å felle ut triacylglycerol. Etter acetonfellingen tilsatte Løvaas 58 % soyaolje (Mills) og 17 % olivenolje (YBARRA, jomfruolje) til fosfolipidene som. Fôret ble gitt i pulverform til dyrene.

**Tabell 2. Mengde av ingredienser i fôr (g/kg)**

Diett	Protein	Soyaolje	Olivenolje	MPL <sup>1*</sup>	VPL <sup>2*</sup>	GB <sup>3</sup>	Karbohydrat
Kontroll	201,6	33,2	6,8			200,5	557,9
MPL	201,6			40		200,5	557,9
VPL	201,6				40	200,5	557,9

<sup>1</sup>MPL: marine fosfolipid, <sup>2</sup>VPL: vegetabilsk fosfolipid, <sup>3</sup>Både MPL og VPL er allerede er tilsatt soyaolje og olivenolje i et forhold på 58 % soyaolje og 17 % olivenolje. <sup>3</sup>GB: grunnblanding (mineraler og vitaminer nødvendige for en fullverdig kost).

### Studie design

36 rotter ble fordelt på 3 dietter, hvorav hver diett bestod av 2 grupper, som ga totalt 6 grupper. Hver diett bestod av 6 dyr i hver gruppe. I hver diett fikk en gruppe den angitte dietten, og en gruppe fikk den angitte dietten, og fikk i tillegg indusert kolitt. Alle dyrene ble fôret i 5 uker. Dyrene ble pair-fed, dvs. at fôrmengden som ble gitt ble justert i forhold til den gruppen som spiste minst. Etter 5 ukers fôring ble det indusert kolitt i halvparten av dyrene, en gruppe pr diett. Kolitt ble indusert ved å løse dextran sulfat natrium (DSS) (MV 44000, TdB Consultancy AB, Uppsala, Sverige) i drikkevannet (destillert vann) til en konsentrasjon på 5 %, som ble gitt *ad libitum*. DSS-løsningen ble laget ny hver dag for å forhindre at den ble sur. Dyrene hadde kontinuerlig tilgang på DSS-løsningen i 7 dager. I løpet av denne perioden ble dyrenes helse undersøkt daglig og feces ble undersøkt for blod (Hemofec). Feces ble også samlet til analyse av GMP (granolocytt marker protein, en inflammasjonmarkør).

Etter totalt 6 uker ble forsøket avsluttet og dyrene avlivet ved hjertetapping. Blodet ble sentrifugert i 10 min ved 4 °C, og fraksjonene av røde blod celler og serum ble separert og lagret på -80°C for videre analyser. Tarmen ble tatt ut og vasket ren før den ble kuttet opp



longitudinalt. Det ble tatt snitt for histologi. De histologiske undersøkelsene, samt fettanalyse ble gjort som beskrevet i museforsøket.

**Tabell 3: Oppsett av grupper og dietter**

Gruppe	Diett	Behandling
1	Kontroll	
2	Kontroll	DSS
3	Vegetabilsk PL	
4	Vegetabilsk PL	DSS
5	Marine PL	
6	Marine PL	DSS

Grad av sykdom som følge av DSS-behandling regnes ut ved hjelp av DAI score (disease activity index). Sykdomsaktivitets indeks (DAI) er kombinerte resultat av vekttap, konsistens av avføring og blødning fra endetarm dividert med 3. Tabell 4 viser hvordan DAI scoren regnes ut.

**Tabell 4. Scoring av sykdomsaktivitets indeks (DAI)**

Score	Vekttap	Feces konsistens	Rektal blødning
0	Ingen	Normal	Normal
1	1-5 %		
2	5-10 %	Løs avføring	Hemocult +
3	10-20%		
4	> 20 %	Diaré	Kraftig blødning

Adaptert fra Cooper et al. 1993(Cooper, Murthy et al. 1993)

### **2.3 Rotteforsøk; Ulike strukturelle former av omega-3 PUFA og fettprofil i hjerne, lever og røde blod celler (masteroppgave Anita Røyneberg)**

Hensikten med forsøket var å undersøke om ulike strukturelle former av omega-3, fra forskjellige kilder, påvirket inkorporering av langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer i hjerne, lever og røde blod celler hos rotte. Forsøket resulterte i mastergraden til Anita Røyneberg som ble fullført ved Universitetet i Bergen og NIFES juni 2005.

Hann Wistar rotter (Tactonic, USA) som veide 200 g ved forsøkets start ble huset 5 i hvert bur under de første dagene av akklimatiseringsperioden. Etter 3 dager med akklimatisering ble rottene huset to og to per bur, hvor de stod ut forsøket. Under akklimatiseringsperioden ble rottene føret standard rottefôr. Dyrene ble holdt under standardisert forhold som nevnt i museforsøket.

#### **Studie design**

Dyrene ble tilfeldig fordelt i 7 grupper med 6 dyr i hver gruppe. Hver gruppe ble gitt en av diettene som er listet i tabell 5. Dyrene fikk det eksperimentelle føret i 21 dager. Hvert bur fikk 50g fôr per dag, og dyrene hadde fri tilgang på springvann. Fôrintaket og vekt ble registrert daglig.

**Tabell 5. Grupper, fettkilde og strukturell form av omega-3 PUFA**

Gruppe	Fettkilde	Form av omega-3
A	Soya olje	TAG
B	Laks	TAG
C	Torsk	PL
D	Etylester	EE
E	Marine fosfolipid	PL
G	Selolje	TAG
H	Tran	TAG

TAG: triacylglycerol, PL: fosfolipid, EE: etylester

## Dietter

Alle diettene inneholdt ca 20 % protein (kasein, Sigma), 10 % fett (forskjellige kilder, se tabell 2), 20.05 % grunnblanding, og 50 % karbohydrat (dekstrin, Sagogryn, Asko Hannevik AS, Norge). En fullstendig oversikt over mengde tilsatt av de ulike ingrediensene er vist i tabell 6.

De ulike diettene inneholdt forskjellige kilder av fett. De ulike fettkildene inneholdt ulike strukturelle former for omega-3, da i form av triacylglycerol (TAG), fosfolipid (PL) eller etylester (EE), som vist i tabell 5. I diettene hvor omega-3 kilden ikke utgjorde 10 % av ønsket fettmengde ble maisolje brukt som en nøytral fettkilde for å supplere til ønsket fettprosent.

Fiskediettene ble balansert på protein; begge diettene ble tilsatt like mye kasein. Dette var på grunn av svært ulik mengde fett i fiskene (laks; 13.4 g/100 g fisk, torsk; 0,3 g/100 g fisk). Marine fosfolipid (MPL) og etylester (EE) diettene skulle balanseres på mengde EPA og DHA, ut fra hvor mye det er av disse fettsyrene i 10 % tran og selolje (2.5 g/kg/dag). Førene ble laget før eksperimentet startet og ble lagret ved -10°C under forsøket.

*Diett A:* Diett A inneholdt vanlig soyaolje (Mills Soya Olje), kjøpt på REMA. 10 % soyaolje ble tilsatt den tørre blandingen av kasein, dekstrin og grunnblanding og blandet godt.

*Diett B og C:* Diett B og C inneholdt henholdsvis laks og torsk, som ble kjøpt i en lokal fiskebutikk (Strandkaien Fisk A/S i Bergen). Fisken ble filetert, før den ble malt i en food processor. Den malte fiskefileten ble frysetørket, og det tørkede materialet ble igjen malt til pulverkonsistens. Fiskepulveret ble så blandet med kasein, dekstrin og grunnblanding. Til torskedietten ble også maisolje tilsatt de tørre ingrediensene.

*Diett D:* Etylesterne (Fri Flyt, Vesterålens Naturprodukter, Sortland, Norge) som ble brukt i forsøket ble gitt av Vesterålen Naturprodukt. Etylesterne ble tatt ut av kapslene ved hjelp av ei nål, og lagret på -10 °C før bruk. Etylesterne ble tilsatt til en konsentrasjon av 2.5g/kg/dag, og maisolje ble tilsatt for å nå en total fettprosent på 10 %.

*Diett E:* I diett E var omega-3 kilden marine fosfolipid (MPL-50Ca, som ble gitt av EXIMO AS, Tromsø, Norge). Den ble tilsatt til en konsentrasjon av 2.5g/kg/dag. De marine fosfolipidene ble varmet/smeltet langsomt i maisolje til flytende konsistens som ble blandet i pulverfôret.

*Diett F:* Selolje (Arctic Omega-3 Selolje) ble brukt som eneste fettkilde, og oljen ble tilsatt de tørre ingrediensene og blandet godt.

*Diett G:* Den siste dietten bestod av tran (Møller's Tran), kjøpt på REMA, som eneste fettkilde, og oljen ble tilsatt de tørre ingrediensene og blandet godt.

**Tabell 6: Mengde av ingrediensene i de ulike fôrene.**

Ingrediens	g/kg diett						
	Soya olje	Laks	Torsk	EE	MPL	Selolje	Tran
<b>Kasein</b>	224	66	66	224	224	224	224
<b>Grunnblanding<sup>1</sup></b>	234	234	234	234	234	234	234
<b>Fett (omega-3 kilde<sup>2</sup>)</b>	100	246 <sup>3</sup>	148 <sup>3</sup>	33	57	100	100
<b>Maisolje</b>	-	-	98	75	43	-	-
<b>Dekstrin</b>	475	487	488	467	475	475	475

<sup>1</sup> inneholder nødvendige mineraler og vitaminer som gir en fullverdig diett. <sup>2</sup> omega-3 kilde; fiskefilet, oljer, etylester, marine fosfolipid. <sup>3</sup> Fiskefilet tilsatt. EE: etylester, MPL: marine fosfolipid.

Ved avslutningen av forsøket ble dyrene anestesert intraperitonealt med pentobarbital natrium (0.3 ml/ 100 g). Ingen cornea eller bakbeinsrefleks ble brukt som indikator på dyp anestesi. Når full narkose var nådd ble dyrene avlivet med cardiac puncture; sternum ble klippet opp og en nål ble plassert i hjertet for å samle blod. Hjerte, lever, milt, tarm, hjerne, hippocampus og cerebellum ble tatt ut og frosset i flytende nitrogen. Vevet ble lagret ved -80 °C.

Blod ble samlet i sentrifugerør som inneholdt EDTA som antikoagulant, og ble umiddelbart sentrifugert ved 3000 rpm og 4 °C i 10 min. Det sentrifugerte blodet ble separert i 3 fraksjoner; plasma på topp, hvite blod celler i midten, og røde blod celler (RBC) i bunn av rør. Plasma og RBC ble tatt ut for analyse og lagret på -80 °C.

### Fettsyreanalyse

Fettsyreanalysen som ble gjort på lever og RBC ble utført på samme måte som beskrevet i museforsøket. Hjernevevet ble homogenisert og fettene ble først ekstrahert i metanol og ristet 1 time i romtemperatur, før kloroform ble tilsatt til et endelig volum av kloroform/metanol 2:1, og løsningen ble ristet enda en time ved romtemperatur. Den videre fettsyreanalysen ble gjort på samme måte som beskrevet i forsøket over.

## 3. Resultat og diskusjon

### DSS-indusert kolitt i unge mus

Det er kjent at omega-3 PUFA har en forbedrende effekt på betennelseskomponenter (Belluzzi, Boschi et al. 2000; Belluzzi 2002; Gil 2002). Denne effekten ble ikke funnet i det første museforsøket. Grunnen til at det ikke funnet noen klar effekt av fôring med marine PL eller NU på sykdomsbildet (fig 1) kan være den korte tiden med fôring. 2 uker kan ha vært for kort tid til å se noen effekt, og spesielt da dyrene fikk standard diett under DSS-behandlingen og ikke de eksperimentelle fôrene. Det kan ha ført til en utvasking av effekten av fôringen. Dette støttes av fettsyreanalysene av tarmen, som ikke viser noe tydelige forskjeller mellom gruppene, til tross for ulik fettsyreprofil i fôrene. Det var forventet å finne effekter på induksjonen av kolitt som følge av de ulike diettene, men som vist i figur 1 er det ingen signifikante forskjeller mellom de eksperimentelle gruppene. Det at det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller kan forklares med at dyrene som ble brukt i forsøket var svært unge,

og kan derfor ha hatt en underutviklet tarm, som kan ha ført til at 2 ukers forbehandling med PL eller NU ikke var nok til å påvirke skadene i tarmen som følge av DSS-behandlingen.

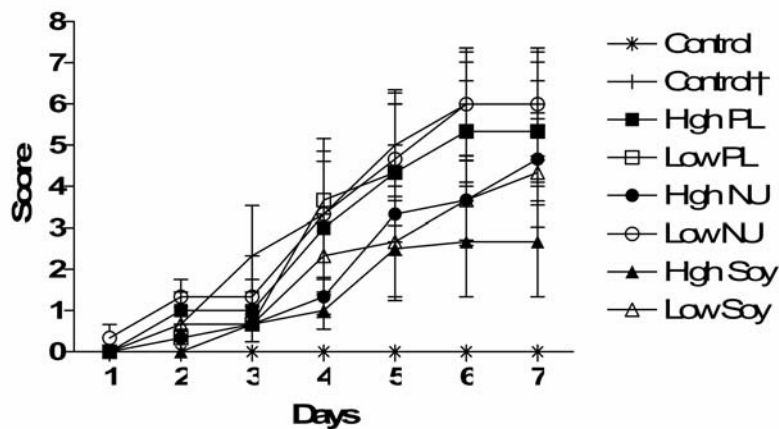


Fig 1. Endringer i sykdomsscore, målt som konsistens av avføring, og blod eller ikke blod i avføring etter behandling med DSS. Control† (kontroll som fikk DSS).

Uttrykket av NFκB responsive gener; inducible nitric oxide synthase (iNOS) og interleukine-6 (IL-6) ble funnet å være oppregulert av DSS-administrasjon. Men både lav marine PL og lav soya PL hemmet uttrykket signifikant i forhold til de andre gruppene (fig 2a). Begge de marine PL diettene (høy og lav konsentrasjon) holdt nivået av IL-6 nede på samme nivå som kontroldietten som ikke fikk DSS (fig 2a). Uttrykket av PPARγ og PPARγ/δ- responsive genet CD36 ble nedregulert, som vist i figur 2b. Det at uttrykket av iNOS påvirkes av begge PL diettene og lav soya viser at lipider fungerer som ligander for PPARs. Ved å endre sammensetningen av fett i kosten kan man påvirke genuttrykk i tarmen som kan resultere i en redusert inflammatorisk respons ved å hemme NFκB, som igjen hindrer produksjon av en rekke cytokiner som er involvert i inflammasjonsprosessen.

### DSS-indusert kolitt i rotte

Beate Klementsens konkluderte etter sitt museforsøk at det bare er tendenser til en positiv effekt av PL supplement, og da både lav marine PL og lav soya PL, i en DSS-modell for eksperimentelt induert kolitt i mus. På bakgrunn av resultatene i museforsøket ble det besluttet å kjøre et nytt forsøk med samme kolittmodell, men denne gang i voksne rotter. Forsøksoppsettet ble endret, og dyrene ble føret de eksperimentelle diettene i 5 uker før de ble satt på DSS-behandling, og de fikk det eksperimentelle føret også under DSS-administrasjonen. Siden det ikke ble funnet noen effekt av nukleotider i museforsøket valgte vi å bare fortsette videre med fosfolipider. Vi valgte å også inkludere en gruppe med soya PL, for å se om en eventuell effekt skyldes den strukturelle formen av fosfolipider heller en kilde.

Granulocyte marker protein (GMP) brukes som en inflammasjonsmarkør etter eksponering med DSS. Vi fant ingen forskjeller mellom gruppene, og verdiene for de ulike gruppene er gitt i tabell 7.

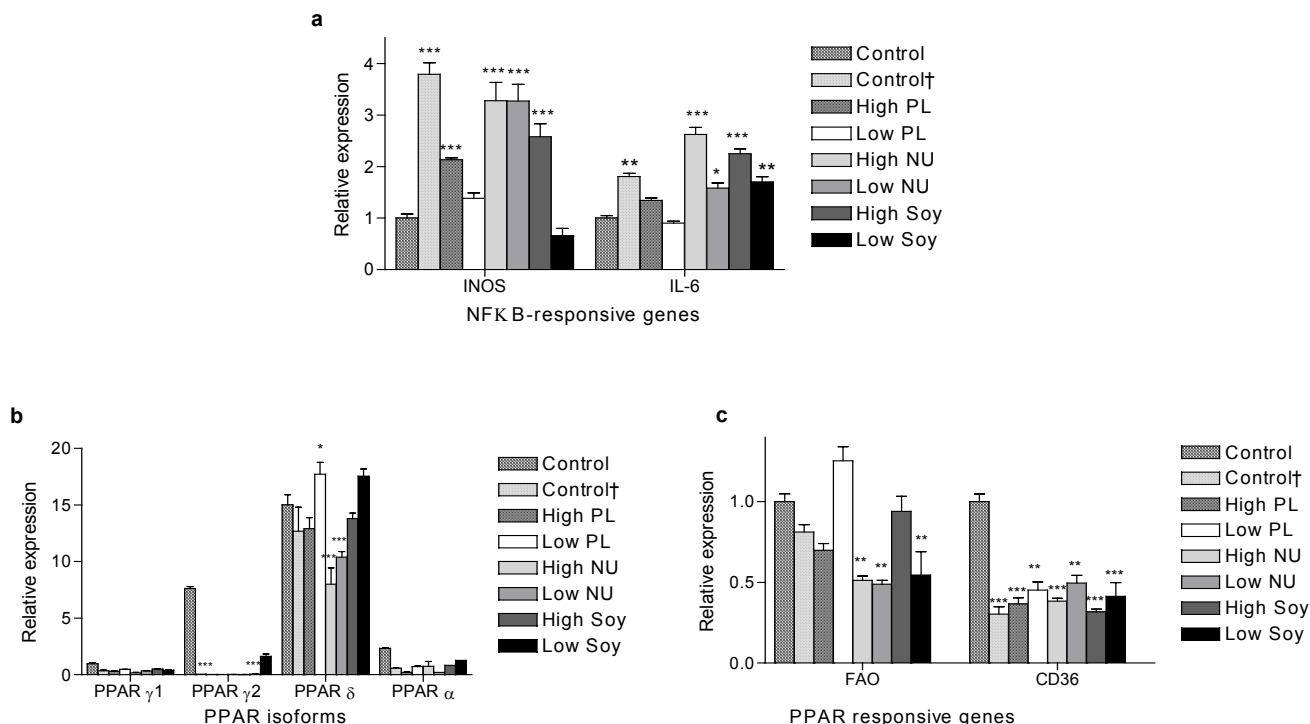


Fig 2. Relativt uttrykk av NFκB responsive gener, iNOS, IL-6 (a), PPAR isoformer PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\delta$  og PPAR $\alpha$  (b), og PPAR responsive gener fatty acyl CoA oxidase (FAO) og CD36 (c) i de eksperimentelle gruppene. kontroll† (kontroll som fikk DSS). Resultatene er gitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ . \*\*:  $p < 0.01$ . \*\*\*:  $p < 0.005$ .

**Tabell 7. Fekale GMP verdier før og etter DSS eksponering**

Gruppe	Basal GMP	7d DSS
Kontroll	8,8 $\pm$ 2,8	113,1 $\pm$ 16,1
Marine PL	11,7 $\pm$ 10,7	123,8 $\pm$ 24,5
Soya PL	10,1 $\pm$ 5,0	98,4 $\pm$ 28,7

7 dager med DSS-administrasjon ga en vektreduksjon i alle gruppene, men det var ingen signifikant forskjell mellom gruppene (tabell 8). Dyrene som fikk soya PL gikk mest ned i vekt. I denne gruppen gikk alle dyrene ned i vekt, mens i kontroll og marine PL var vektreduksjonen noe mindre, og 2 dyr i hver av disse gruppene gikk noe opp i vekt (henholdsvis 1 og 9 g, og 2 og 13 g) i løpet av DSS-perioden. Sykdomsaktiviteten (DAI score), som er en verdi basert på vekttap, konsistens av avføring og blødning fra endetarm, resulterte ikke i store forskjeller mellom gruppene (tabell 9). Dyrene som ble føret med soya PL ser ut til å ha blitt litt sykere enn rottene føret med kontroll og marine PL, men vi kan ikke gi noe klart svar på hvordan de ulike diettene påvirker tarmbetennelse før vi har histologieresultatene. Histologieresultatene er foreløpig ikke klare, da de fortsatt analyseres. (Disse resultatene forventes å være klare i august 2007.)

**Tabell 8. Vektreduksjon som følge av DSS-administrasjon**

Gruppe	Start DSS (g)	7d DSS (g)	Vektreduksjon (g)
Kontroll +DSS	320,5 $\pm$ 19,5	318,9 $\pm$ 19,5	- 1,7 $\pm$ 6,2
Marine PL + DSS	319,4 $\pm$ 10,8	315,3 $\pm$ 16,8	- 4,1 $\pm$ 11,4
Soya PL + DSS	321,4 $\pm$ 8,4	309,2 $\pm$ 7,8	- 12,2 $\pm$ 13,7

**Tabell 9. Sykdomsaktivitet indeks (DAI score)**

Gruppe	DAI score
Kontroll + DSS	2
Marine PL + DSS	2
Soya PL + DSS	3

Resultatene fra forsøket viser at det er mulig å endre fettsyreprofilen i tarmen, noe som kan endre tarmcellenes egenskaper i forhold til betennelse. Når vi undersøkte fettsyreprofilen i tarmene til syke og friske dyr fant vi at dyr som bare fikk marine PL hadde høyere nivå av de langkjede omega-3 fettsyrene EPA, DPA og DHA sammenlignet med alle de andre gruppene (tabell 10). Dyrene med tarmbetennelse som fikk marine PL hadde et høyere nivå av EPA, DPA og DHA sammenlignet med de andre diettene (kontroll og VPL), men de hadde et signifikant lavere nivå enn de friske dyrene som fikk marine PL. Det kan tyde på at i en betennelsestilstand i tarmen brukes de langkjede omega-3 fettsyrene. EPA kan inhibere metabolismen av AA (20:4n-6) ved å fungere som et substrat for enzymene som danner betennelsesfremmende eicosanoider fra AA. Dette vil resultere i EPA deriverte eicosanoider som er mindre biologisk aktive enn AA deriverte eicosanoider. De mulig anti-inflammatoriske effektene ved en kostintervensjon kan skyldes flere mekanismer som synergistisk bedrer skade i tarm som følge av DSS-behandling. Disse inkluderer antioksidativ aktivitet, i tillegg til inhibering av produksjon og/eller frigjøring av proinflammatoriske mediatorer (eicosanoider og cytokiner). Inkorporering av omega-3 fettsyrer i membran fosfolipider kan også modulere lipidrelaterte intracellulære signalveier, som inkluderer ulike sekundære signalstoff eller transduksjonsveiere, i tillegg kan også genuttrykket endres. Alle disse mekanismene er med på å modulere den inflammatoriske responsen (Calder 2003). På denne måten vil et økt inntak av omega-3 fettsyrer kunne endre balansen av eicosanoider som produseres i en betennelsestilstand til mindre betennelsesfremmende mediatorer. Det er derfor viktig i en betennelsestilstand å øke inntaket av omega-3 fettsyrer, samtidig som inntaket av omega-6 fettsyrer reduseres (Gil 2002).

Men det er først når vi får histologieresultatene at vi sikkert kan si om marine fosfolipider har en betennesedempende effekt i tarmen.

**Tabell 10. Omega- 6 og omega-3 fettsyrer i tarm hos friske og syke dyr føret med kontrollfôr, marine PL og vegetabilsk PL**

Fettsyre	Kontroll	MPL	VPL	Kontroll DSS	MPL DSS	VPL DSS
18:2n-6	16,3 ± 3,2 <sup>a</sup>	9,9 ± 1,4 <sup>b</sup>	17,6 ± 2,8 <sup>a</sup>	15,8 ± 2,2 <sup>a</sup>	16,3 ± 4,8 <sup>a</sup>	19,2 ± 4,2 <sup>a</sup>
20:4n-6	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,8	1,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,8	1,8 ± 1,0	2,3 ± 1,2 <sup>a</sup>
18:3n-3	0,8 ± 0,1 <sup>a,c</sup>	0,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	0,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,3 <sup>a</sup>
20:5n-3	-	0,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	-	-	0,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	-
22:5n-3	-	0,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	-	-	0,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	-
22:6n-3	0,1 ± 0,0 <sup>a^</sup>	1,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	0,0 ± 0,1 <sup>a*</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>

Forskjellige bokstaver indikerer statistisk signifikans,  $p < 0,05$ .

### Strukturell påvirkning av marine omega-3 fettsyrer

Tidligere studier har vist at det er mulig å påvirke fettsyreprofilen i hjerne, lever (Bourre, Bonneil et al. 1990; Alsted and Hoy 1992) og RBC (Connor, Neuringer et al. 1990) gjennom diettmanipulasjon, og det er vist at fiskeolje kan endrer PUFA sammensetningen i hjerne og lever dramatisk (Bourre, Bonneil et al. 1988). Det er en generell enighet om at den fysiologiske aktiviteten til fiskeoljer kan tilskrives EPA og DHA, men det er hevdet av den molekylære strukturen av omega-3 fettsyrene som inntas kan ha en tydelig effekt på

lipidproduksjon og dens rate og total mengde som absorberes. Det gir at de fysiologiske og farmakologiske egenskapene til omega-3 fettsyrer kan påvirkes av den strukturelle formen de inntas i. I det andre dyreforsøket, som var mastergraden til Anita Røyneberg, ønsket vi å undersøke hvordan omega-3 PUFA fra marine kilder, som var forskjellige i fettsyresammensetning og intramolekylær struktur, påvirker fettsyreprofilen i hjerne, lever og røde blod celler (RBC) hos rotte. De forskjellige strukturelle formene inkluderte omega-3 i form av marine fosfolipid (fra torsk og marine PL), etylestere (kapsler) og TAG (laks, selolje og tran).

Hovedutfordringen i dette forsøket var å lage 7 sammenlignbare dietter. Det lot seg ikke gjøre da de ulike kildene ikke bare varierte i fettprosent (som gjorde at enkelte av diettene fikk tilsatt ekstra maisolje, som tilførte mye 18:2n-6), men også i intern distribuering av de ulike omega-3 PUFA. Mengden omega-6 og omega-3 PUFA i de ulike diettene er vist i tabell 6, og man kan se at etylestere inneholdt mest EPA, mens selolje- og laksdietten inneholdt mer DPA enn de andre kildene. Laks og tran inneholdt mest DHA, mens MPL inneholdt minst DHA. Dietten med de marine PL hadde den laveste konsentrasjonen av total mengde EPA, DPA og DHA.

**Tabell 11. Mengde av omega-6 og omega-3 PUFA i de eksperimentelle diettene**

Diett	18:2n-6	20:4n-6	18:3n-3	20:5n-3 (EPA)	22:5n-3 (DPA)	22:6n-3 (DHA)	∑ EPA, DPA og DHA
<b>Soyaolje</b>	51	n.d	5.4	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>Laks</b>	4.6	0.7	1.1	6.9	3.3	11.0	21.1
<b>Torsk</b>	49.9	0.2	1.1	0.4	n.d	1.2	1.6
<b>Etylester</b>	37.8	0.5	1.1	9.6	0.6	6.6	16.2
<b>Marine PL</b>	22.1	0.2	0.6	4.4	0.4	5.4	9.8
<b>Selolje</b>	1.7	0.4	0.5	6.4	3.6	7.5	17.5
<b>Tran</b>	1.6	n.d	0.9	7.9	1.1	12.5	21.5

Resultatene er gitt i mg. n.d: not detected.

Resultatene fra dette forsøket er veldig interessante. DHA i form av PL ser ut til å ha høy biotilgjengelighet i hjernen, i forhold til TAG. Dette fordi vi fant like høye nivå av DHA i dyr føret med MPL som dyr som fikk tran, selolje og laks (figur 3a), til tross for betydelig lavere konsentrasjon i føret (tabell 11). Dette er i samsvar med andre studier som viser at omega-3 i form av PL inkorporeres mer effektivt enn TAG. I lever og RBC ser det ut til at mengden DHA som inkorporeres er avhengig av konsentrasjon i dietten (figur 4), heller enn struktur av fettsyrene. Det kan tyde på at ulike strukturelle former av omega-3 påvirker ulike organ forskjellig (figur 5). Rottene som fikk etylester fikk høyest konsentrasjon av EPA, men resultatene viser at den høye konsentrasjonen ikke resulterte i mer EPA i vevet enn de andre diettene, snarer tvert i mot (figur 3b, 4). I hjernen ble det ikke funnet noe EPA i dyrene som fikk etylester, mens både marine PL, laks, selolje og tran økte konsentrasjonen i forhold til soya (kontroll). Etylester dietten resulterte i høyt nivå av DPA i RBC, noe som kan skyldes at EPA i form av etylester her lettere omdannes videre til DPA. Etylester finnes sjelden i naturlige produkter, men er en vanlig form av omega-3 i kapsler. omega-3 i form av etylestere brukes i mange studier hvor det gis omega-3 supplement. Resultatene fra dette forsøket tyder på at den strukturelle formen som omega-3 presenteres i spiller en viktig rolle når det gjelder biotilgjengeligheten til disse fettsyrene, da særlig i hjernen.

Det er vist at endringer i kostens fettsyreprofil påvirker fettsyreprofilen i cellulære membraner og igjen egenskapene til ulike membrankomponenter som reseptorer og enzymer. Endringer i kostholdet kan derfor ha store konsekvenser for kognitive funksjoner, som læring og hukommelse. Disse effektene på kognitive funksjoner har hovedsakelig vært vist i dyr som

mangler omega-3 PUFA, som da resulterer i forstyrrede læringsevner (Moriguchi, Greiner et al. 2000). Studier har vist at DHA og fiskeolje forbedrer spatial hukommelse og andre typer hukommelse i normale og eldre dyr (Jensen, Skarsfeldt et al. 1996; Carrie, Guesnet et al. 2000).

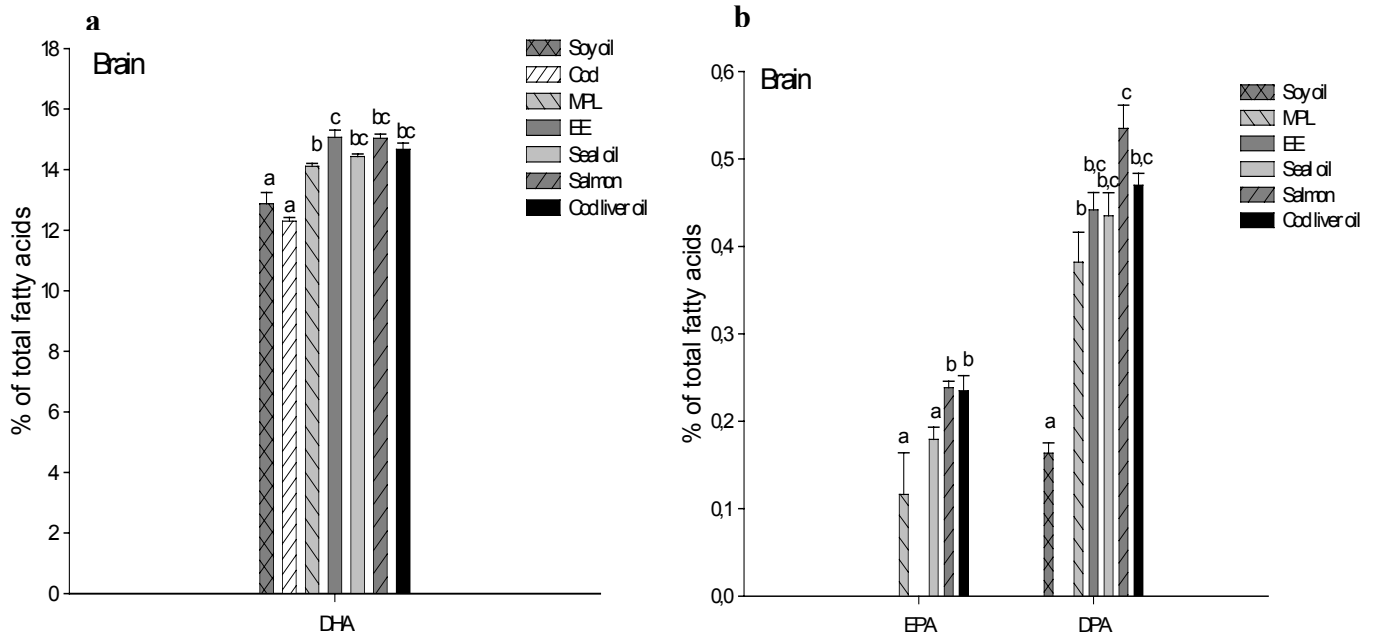


Fig 3. Nivået av DHA i hjerne (a), og nivået av EPA, DPA i hjerne (b) som følge av fôring med ulike dietter. Nivået av DHA økte signifikant i gruppene som ble fôret med langkjedede n-3 fettsyrer, i forhold til soya olje (kontroll) og torsk som er en mager fisk med lite n-3. EPA ble bare funnet i dyr som ble gitt fôr med n-3, bortsett fra dyr fôret med EE. MPL: marine fosfolipid, EE: etylester. Ulike bokstaver viser statistisk signifikans. Resultatene er gitt som gjennomsnitt  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$



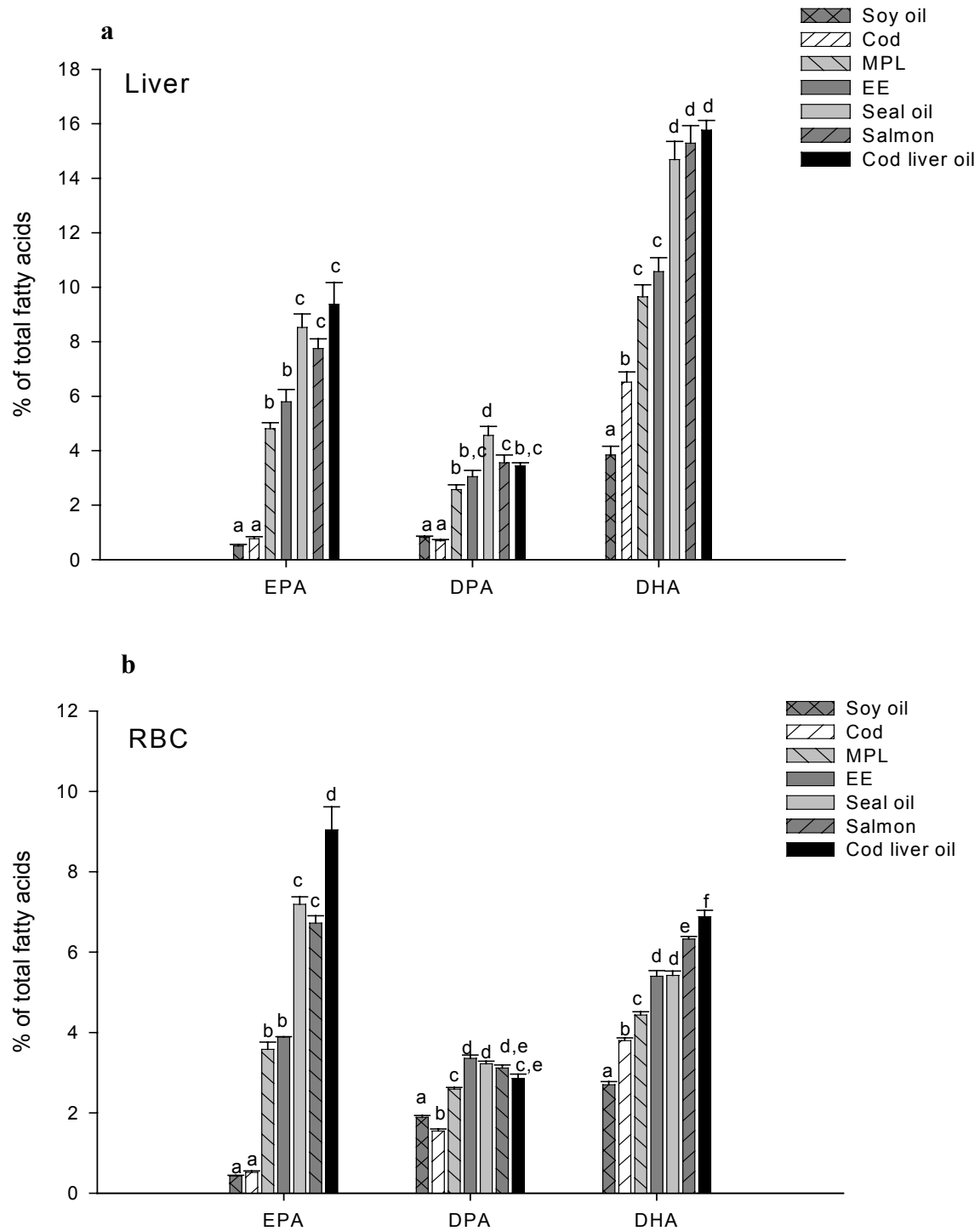


Fig 4. Nivået av EPA, DPA og DHA i lever (a) og RBC (b) som følge av fôring med ulike dietter. Fôring med marine n-3 fettsyrer økte nivået av EPA, DPA og DHA signifikant i forhold til soya olje (kontroll) i både lever (a) og RBC (b). MPL: marine fosfolipid, EE: etylester. Ulike bokstaver viser statistisk signifikans. Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± SEM.  $P < 0.05$

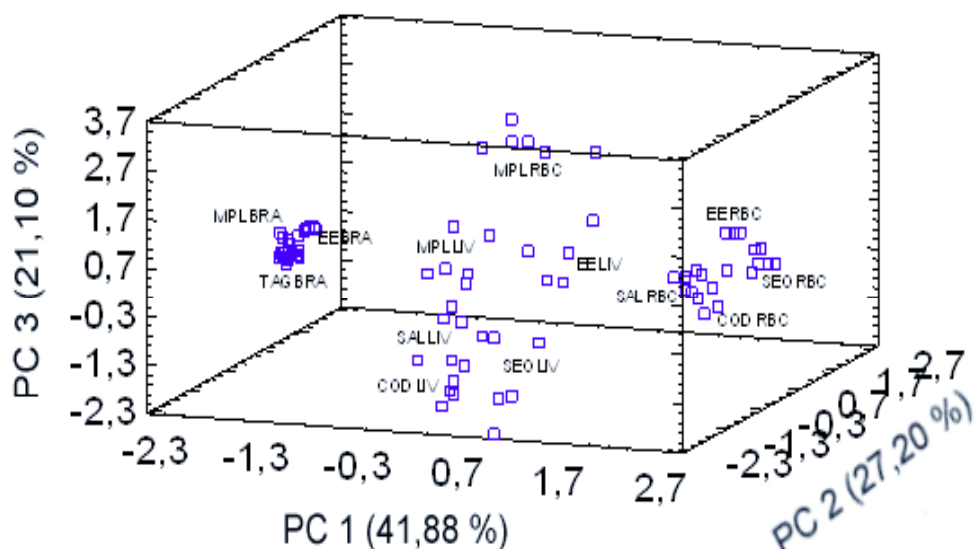


Fig 5. Principal component analysis (PCA-plot) som grafisk viser en sammenligning av hvordan EPA, DPA og DHA i ulike diettene påvirker hjerne, lever og RBC forskjellig. Klusteret (TAG BRA, MPL BRA og EE BRA) til venstre i figuren viser hjernen, klusteret til høyre viser RBC, og det spredte klusteret i midten viser de ulike diettene i leveren. Den tydelige delingen av diettene i klart definerte kluster som representerer de ulike organene viser at de ulike diettene påvirker hjerne, lever og RBC forskjellig. MPL: marine fosfolipid, EE: etylester, TAG: triacylglycerol, BRA: hjerne, LIV: lever, RBC: røde blod celler, SEO: Selolje, COD: tran.

#### 4. Kommersialiseringspotensiale

Inflamasjon står for både akutte og kroniske plager i humane sykdommer, og karakteriseres av produksjon av inflammatoriske cytokiner, AA-deriverte eicosanoider, andre inflammatoriske mediatorer og molekyler. Omega-3 PUFA reduserer produksjonen av inflammatoriske mediatorer og uttrykk av inflammatoriske gener. De virker både direkte ved å erstatte AA som eicosanoid substrat og inhiberer AA metabolisme, og indirekte ved å endre uttrykk av inflammatoriske gener gjennom transkripsjonsfaktorer. Det gir at omega-3 PUFA er potensielt kraftige anti-inflammatoriske agenter, som kan brukes terapeutisk i en rekke akutte og kroniske settinger. I tillegg er det mye som nå tyder på at den strukturelle formen som omega-3 presenteres i har betydning for biotilgjengeligheten. Det er hevdet at den molekylære strukturen av omega-3 fettsyrene som inntas kan ha en tydelig effekt på lipidproduksjon og dens rate og total mengde som absorberes. Det gir at de fysiologiske og farmakologiske egenskapene til omega-3 fettsyrer kan påvirkes av den strukturelle formen de inntas i. Det er derfor av stor betydning å finne den strukturelle formen av omega-3 som gir maksimale helse-effekter, og det er viktig at industrien har et bevisst forhold til den strukturelle formen av omega-3 som brukes i kommersielle produkter og matvarer.

Få studier har undersøkt akkumulering av EPA og DHA i ulike vev som funksjon av strukturelle form av disse fettsyrene, og resultatene er motsigende. PUFA inkorporering i hippocampus ser ut til å være avhengig av konsentrasjon i dietten, heller enn den strukturelle formen av DHA (TAG eller PL) (Aid, Vancassel et al. 2005). Det er vist at det ikke er noe forskjell mellom TAG og PL når det gjelder biotilgjengelighet av omega-3 PUFA i plasma lipider hos spebarn gitt morsmelkerstatning (Sala-Vila, Castellote et al. 2004). På den andre side er det vist at DHA i form av PL har høyere biotilgjengelighet for inkorporering i RBC

hos menneske sammenlignet med TAG (Lemaitre-Delaunay, Pachiardi et al. 1999), og at AA i form av PL gav større mengde i hjernen hos bavianer enn AA i form av TAG (Wijendran, Huang et al. 2002). Til tross for motstridende resultat er det mye som tyder på at den strukturelle formen av omega-3 er av betydning når det gjelder biotilgjengelighet, og at ulike vev responderer forskjellig på ulike strukturelle former av omega-3. Marine PL er en alternativ form som det er forsket lite på i forhold til TAG og etylestere. Det er en naturlig form, i motsetning til etylester som er relativt sjelden i naturlig mat, men vanlig i kosttilskudd. I dagens samfunn er det økt etterspørsel etter naturlige produkter og råvarer. Marine PL fra naturlige kilder som rogn og melk kan derfor være et godt alternativ.

## KONKLUSJON

Det trengs mer forskning før man kan konkludere at marine PL gir bedre helse-effekter i betennelsessykdommer enn andre former (TAG, EE). Det må gjøres forsøk hvor marine PL sammenlignes med TAG og EE, og eventuelt kliniske forsøk som kan sammenlignes med det som allerede er gjort med selolje (Arslan, Brunborg et al. 2002; Bjorkkjaer, Brunborg et al. 2004) og tran (upubliserte data) i pasienter med IBD. Men resultatene fra forsøkene som er gjort i dette delprosjektet viser at marine PL har en betennelsesdempende effekt via et dempet NK $\kappa$ B uttrykk. Siste del av prosjektet vil forhåpentligvis si enda mer om helse-effektene av et inntak av marine PL når de endelige resultatene foreligger.

Marine PL ser ut til å ha høyere biotilgjengelighet i hjernen, da det ved lavere konsentrasjon i kosten resulterer i samme mengde DHA inkorporert i hjernen som dietter med høyere DHA konsentrasjon i form av TAG. OMEGA-3 i form av ulike strukturelle former (TAG, MPL, EE) ser ut til å påvirke ulike organ ulikt.

## PUBLISERING

### 1) DSS-indusert kolitt i unge mus:

Det foreligger et manus som ikke er blitt publisert, da manuset ble refusert. Tittel er *"Dietary pre-treatment with phospholipids and nucleotides of marine origin does not influence DSS-induced colitis in young mice"*.

### 2) DSS-indusert kolitt i rotte:

- a. Det arbeides med et manus fra forsøket som skal publiseres i et internasjonalt tidsskrift, med tentativ tittel *"Dietary impact of marine phospholipids in DSS-induced colitis in rats"*.
- b. Vev fra forsøket ble brukt i en mastergrad som ble levert ved Universitetet i Bergen i samarbeid med NIFES i juni 2007. Tittel på oppgaven er *"Nutritional impact of whale meat and marine phospholipids on the fatty acid profile in brain macrostructures and red blood cells"*.

### 3) Strukturell påvirkning av marine omega-3:

- a. Resultatene fra dette forsøket er publisert i en mastergradsoppgave som ble levert ved Universitetet i Bergen i samarbeid med NIFES i juni 2005, med tittel *"The impact of different dietary sources of marine polyunsaturated fatty acids on the fatty acid composition of rat brain, liver and red blood cells"*.
- b. De samme resultatene brukes i en artikkel som snart er klar for publisering i et internasjonalt tidsskrift. Den tentative tittelen er *"Differential incorporation of EPA and DHA in rat brain, liver and erythrocytes after feeding with structurally different marine sources of n-3 polyunsaturated fatty acids"*
- c. Faktaark fra NIFES; Marine fosfolipider – bra for hjernen?

## Referanser

- Aid, S., S. Vancassel, et al. (2005). "Dietary docosahexaenoic acid [22: 6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus." J Nutr 135(5): 1008-13.
- Alsted, A. L. and C. E. Hoy (1992). "Fatty acid profiles of brain phospholipid subclasses of rats fed n - 3 polyunsaturated fatty acids of marine or vegetable origin. A two generation study." Biochim Biophys Acta 1125(3): 237-44.
- Arslan, G., L. A. Brunborg, et al. (2002). "Effects of duodenal seal oil administration in patients with inflammatory bowel disease." Lipids 37(10): 935-40.
- Belluzzi, A. (2002). "N-3 fatty acids for the treatment of inflammatory bowel diseases." Proc Nutr Soc 61(3): 391-5.
- Belluzzi, A. (2004). "Polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment." Eur Rev Med Pharmacol Sci 8(5): 225-9.
- Belluzzi, A., S. Boschi, et al. (2000). "Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease." Am J Clin Nutr 71(1 Suppl): 339S-42S.
- Bjorkkjaer, T., L. A. Brunborg, et al. (2004). "Reduced joint pain after short-term duodenal administration of seal oil in patients with inflammatory bowel disease: comparison with soy oil." Scand J Gastroenterol 39(11): 1088-94.
- Bourre, J. M., M. Bonneil, et al. (1990). "Effect of increasing amounts of dietary fish oil on brain and liver fatty composition." Biochim Biophys Acta 1043(2): 149-52.
- Bourre, J. M., M. Bonneil, et al. (1988). "High dietary fish oil alters the brain polyunsaturated fatty acid composition." Biochim Biophys Acta 960(3): 458-61.
- Calder, P. C. (2003). "N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic." Lipids 38(4): 343-52.
- Carrie, I., P. Guesnet, et al. (2000). "Diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice." Br J Nutr 83(4): 439-47.
- Connor, W. E., M. Neuringer, et al. (1990). "Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys." J Lipid Res 31(2): 237-47.
- Cooper, H. S., S. N. Murthy, et al. (1993). "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis." Lab Invest 69(2): 238-49.
- Dubuquoy, L., E. A. Jansson, et al. (2003). "Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis." Gastroenterology 124(5): 1265-76.
- Fiocchi, C. (1998). "Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis." Gastroenterology 115(1): 182-205.
- Gil, A. (2002). "Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases." Biomed Pharmacother 56(8): 388-96.
- Goldman, D. W., W. C. Pickett, et al. (1983). "Human neutrophil chemotactic and degranulating activities of leukotriene B5 (LTB5) derived from eicosapentaenoic acid." Biochem Biophys Res Commun 117(1): 282-8.
- Jensen, M. M., T. Skarsfeldt, et al. (1996). "Correlation between level of (n-3) polyunsaturated fatty acids in brain phospholipids and learning ability in rats. A multiple generation study." Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism 1300(3): 203-209.

- Lees, M., J. Folch, et al. (1959). "A simple procedure for the preparation of brain sulphatides." J Neurochem 4(1): 9-18.
- Lemaitre-Delaunay, D., C. Pachiardi, et al. (1999). "Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine." J Lipid Res 40(10): 1867-74.
- Lie, O. and G. Lambertsen (1991). "Fatty acid composition of glycerophospholipids in seven tissues of cod (*Gadus morhua*), determined by combined high-performance liquid chromatography and gas chromatography." J Chromatogr 565(1-2): 119-29.
- Moriguchi, T., R. S. Greiner, et al. (2000). "Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration." J Neurochem 75(6): 2563-73.
- Murthy, S. N., H. S. Cooper, et al. (1993). "Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin." Dig Dis Sci 38(9): 1722-34.
- Onderdonk, A. B. and J. G. Bartlett (1979). "Bacteriological studies of experimental ulcerative colitis." Am J Clin Nutr 32(1): 258-65.
- Sala-Vila, A., A. I. Castellote, et al. (2004). "The source of long-chain PUFA in formula supplements does not affect the fatty acid composition of plasma lipids in full-term infants." J Nutr 134(4): 868-73.
- Stein, R. B. and S. B. Hanauer (2000). "Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease." Drug Saf 23(5): 429-48.
- Wijendran, V., M. C. Huang, et al. (2002). "Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates." Pediatr Res 51(3): 265-72.
- Windmeuller, H. (1965). "Hepatic nucleotide levels and nad-synthesis as influenced by dietary orotic acid and adenine." Journal of Nutrition 85(3): 221-229.

## Vedlegg 1