

Rapport nr. 207

Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av proteinhydrolysat av laks

Effekt av FPH på blodsukkernivå i rotter

RAPPORTTITTEL

**Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av
proteinhydrolysat av laks.
Effekt av FPH på blodsukkernivå i rotter (Docmar peptid IV)**

RAPPORTNUMMER	207	PROSJEKTNUMMER	4638
UTGIVER	RUBIN	DATO	Juli 2011

UTFØRENDE INSTITUSJONER

NIFES

P.b. 2029 Nordnes
5817 Bergen

Kontaktperson: Bjørn Liaset (bjorn.liaset@nifes.no)

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

I Docmar-prosjektet, 2002-2006, (kfr. RUBIN-prosjekt 4608) er det vist at hydrolysert lakseprotein (FPH) øker energiomsetningen i rotter sammenlignet med kasein og at FPH kan motvirke utvikling av fedme i gnagere sammenlignet med kasein og soyaprotein. Data fra disse studiene tyder på at noe av denne effekten skyldtes at rotter som hadde fått FPH hadde høyere nivå av gallesyrer i lever og blod sammenlignet med rotter som fikk soya- eller melkeprotein. Det er også vist at ved å erstatte 50% av intakt kasein med FPH eller med hydrolysert kasein, så fikk man redusert mengde fettvev. I et oppfølgingsprosjekt i 2007 har en undersøkt effekten av å erstatte 50% av intakt kasein med FPH og hydrolysert kasein (HK) mht. konsentrasjoner av blodlipid og sammensetning av lagringsenergi (TAG (triacylglycerol) og glycogen) i lever i muskel. TAG-innhold i lever og skjelettmuskel var lavere i begge gruppene som fikk hydrolysert protein sammenlignet med intakt kasein. Glykogen var spesifikt økt i lever og muskel i FPH-rotter. FPH ser ikke ut til å gi økt stress hos rottene målt som adrenalin i urin. (RUBIN-rapport 155)

I perioden 2008-2009 (RUBIN-rapport 193) undersøkte Nifes om lakse FPH øker glutatinnivå i rotter, noe som kan redusere oksidativt stress (oksidativt stress kan medvirke til fedme). Resultatene viser at ved 100% utskifting av kasein med lakse FPH øker glutatinnivå i lever hos rotter, mens det var ingen økning når en byttet ut halvparten av kaseinet med FPH. Effekten er altså konsentrasjonsavhengig. Samme rapport viser at noen komponenter som FPH er rik på, nemlig taurin, glysin og pantotensyre, ser ut til å være viktige for å redusere utvikling av fedme hos mus.

I 2010-2011 er det gjennomført forsøk for å undersøke om delvis utbytting (50%) av kasein med hhv. FPH og hydrolysert kasein kunne bedre blodsukker omsetning i rotter. I dette arbeidet er rottene føret med høy-fett dietter i 6 uker der kontroll dietten var kun kasein som proteinkilde. I de to eksperimentelle diettene var halvparten av proteinet erstattet av enten hydrolysert kasein eller FPH. Konsentrasjonen av blodsukker i rotter ble imidlertid ikke påvirket, enten de ble føret med kun intakt kasein, eller med halvparten i form av hydrolysert kasein eller lakse-FPH. Resultatene fra forsøket var ikke i samsvar med tidligere funn, som har vist at konsentrasjon av blodsukker blir redusert når alt kasein blir byttet ut med lakse FPH i høy-fett dietter til rotter. Dette kan tyde på at den blodsukker-senkende effekten av lakse-FPH er avhengig av mengde lakse FPH i dietten.



Sluttrapport Docmar peptid IV (2010-2011)

Dokumentasjon av helsegevinst ved bruk av proteinhydrolysat av laks. Effekt av FPH på blodsukkernivå i rotter.

Samandrag: Vi har dokumentert om hydrolyserte proteinkjelder påverkar konsentrasjon av blodsukker i rotter. Rotter blei fôra høg-feitt diettar i 6 veker. Kontrolldietten inneheldt alt proteinet i form av kasein (ikkje hydrolysert). I to eksperimentelle diettar var halvparten av kaseinet bytt ut med enten hydrolysert kasein eller hydrolysert lakse FPH. Etter fôring på diettar i 6 veker, blei alle rottene (90, 30/ gruppe) fasta i 24 timar. Plasma frå 30 rotter (10/ grp) blei isolert frå fastande rotter. Resten av rottene spiste 5 g fôr, og 30 og 60 minutt etter testmåltidet blei plasma frå 10 rotter/grp isolert. Konsentrasjonen av blodsukker blir ikkje påverka i rotter fôra høg-feitt diettar med intakt kasein, eller halvparten av det intakte kaseinet erstatta med lakse-FPH eller hydrolysert kasein. Resultata frå dette forsøket er ikkje i samsvar med tidlegare funn, som viser at konsentrasjon av blodsukker blir redusert når alt kasein blir byta mot lakse FPH i høg-feitt diettar gjeve til rotter. Dette kan tyde på at den blodsukker-senkande effekten av lakse-FPH er avhengig av mengde lakse FPH i dietten.

Bakgrunn

I Docmar peptid prosjektet (2002-2006, Rubin rapport # 4608) har vi tidlegare vist at rotter som fekk alt diettprotein som FPH utvikla mindre fedme enn rotter som fekk kasein eller soyaprotein. Data frå desse studia tyder på at noko av denne effekten skuldast at rottene som fekk FPH hadde høgare nivå av gallesyrer i lever og blod, samanlikna med rotter som fekk soyaprotein og kasein. Desse data blei publiserte i ein vitenskapeleg artikkel i 2009 (Liaset et al 2009). Men auken i gallsyrer i lever og blod kunne ikkje forklare heile reduksjonen i fedmeutvikling (Liaset et al, 2011). Vi testa derfor om det var ein spesifikk effekt av å spise hydrolyserte protein med omsyn til redusert fedmeutvikling. Det viste seg at ved å erstatte 50% av intakt kasein med lakse FPH, eller med hydrolysert kasein fekk vi redusert mengde feittvev (Liaset et al, upubliserte data). I rotter gjev det derfor ein slankende effekt å erstatte intakt kasein med enten hydrolyserte kasein eller lakse FPH.

I eit oppfølgingsprosjekt i 2007 (Docmar peptid II, Rubin sluttrapport # 155) undersøkte vi effekten av å erstatte 50% av intakt kasein med hydrolysert protein (lakse FPH og hydrolysert kasein) med omsyn konsentrasjonar av blodlipid og samansetnad av lagringsenergi (triacylglycerol og glycogen) i lever og skjelettmuskel. I tillegg ville vi måle nivå av stresshormon i urin, sidan FPH generelt er lavt på aminosyra tryptofan, og dette teoretisk kunne auke stressnivå i dyra. Det var ingen auke i urinutskilling av stresshormon i rottene som fekk 50% av proteinet som lakse FPH, noko som indikerer at det litt lavare tryptofan-nivået ikkje stressa rottene. Rottene som fekk 50% av diettprotein som lakse FPH hadde tendens til lavare blodkolesterol, medan rottene som fekk halvparten av protein i form av hydrolysert kasein hadde spesifikt lavare TAG i blodet. TAG innhald i lever og skjelettmuskel var lavare i begge gruppene som fekk hydrolysert protein, effekten var kraftigast med hydrolysert kasein. Glykogen var spesifikt auka i lever og muskel i rottene som fekk 50% lakse FPH, medan rottene som fekk hydrolysert kasein hadde lavare glykogenmengd både i lever og i muskel, samanlikna med rottene som fekk intakt kasein.

I neste oppfølgingsprosjekt i perioda 2008-2009 (Docmar peptid III, Rubin sluttrapport # 193) undersøkte vi om lakse FPH kunne auke nivået av glutatation (GSH) i rotter. Full utbyting av kasein med lakse FPH, aukar genuttrykk av glutatation syntase og konsentrasjon av GSH i lever. Dette kan vere med å beskytte mot oksidativt stress. Det var ingen auke i lever GSH konsentrasjon ved utbyting av halvparten av kaseinet med lakse FPH, noko som kan tyde på ein konsentrasjonseffekt av komponentar som fins i lakse FPH. I dette prosjektet blei også effekter av aminosyrene taurin og glysin, samt b-vitaminet pantotensyre, tilsett til kasein-baserte diettar enkeltvis og i kombinasjonar. Kasein er lav på pantotensyre og glysin, og inneheld ikkje taurin. Diettane blei gjeve til mus, og ein viste at når både taurin, glysin og pantotensyre blei tilsett same diett, omdanna musene mindre av spist energi til fettvev.

I 2010-2011 har vi gjennomført prosjektet Docmar peptid IV. Hovudmålet med Docmar peptid IV var å undersøkje om delvis utbyting av kasein med hydrolysert lakseprotein, kunne betre blodsukker-omsetnad i rotter, samanlikna med 50% utbyting av kasein med hydrolysert kasein.

Kan lakse-FPH i dietten redusere blodsukker-nivå i rotter (både samanlikna med kasein og hydrolysert kasein)?

I friske individ vil ein auke i blodsukker, typisk etter eit måltid, føre til auka utskilling av insulin til blod. Insulinet stimulerer til opptak av blodsukker frå blod til muskel og fettvev. I tillegg slår insulin av kroppen sin eigen blodsukkerproduksjon i lever. Effekten av insulin fører til at blodsukkeret ikkje aukar ukontrollert, men blir halde innanfor eit konsentrasjonsintervall. Utvikling av fedme fører ofte til redusert evne til å kontrollere blodsukkeret, noko som kan resultere i permanent auka blodsukker og over tid til utvikling av diabetes type 2 (livsstilsdiabetes). Auken i blodsukker er ein konsekvens av at insulin virkar dårlegare enn normalt, både på muskel, i fettvev og i lever.

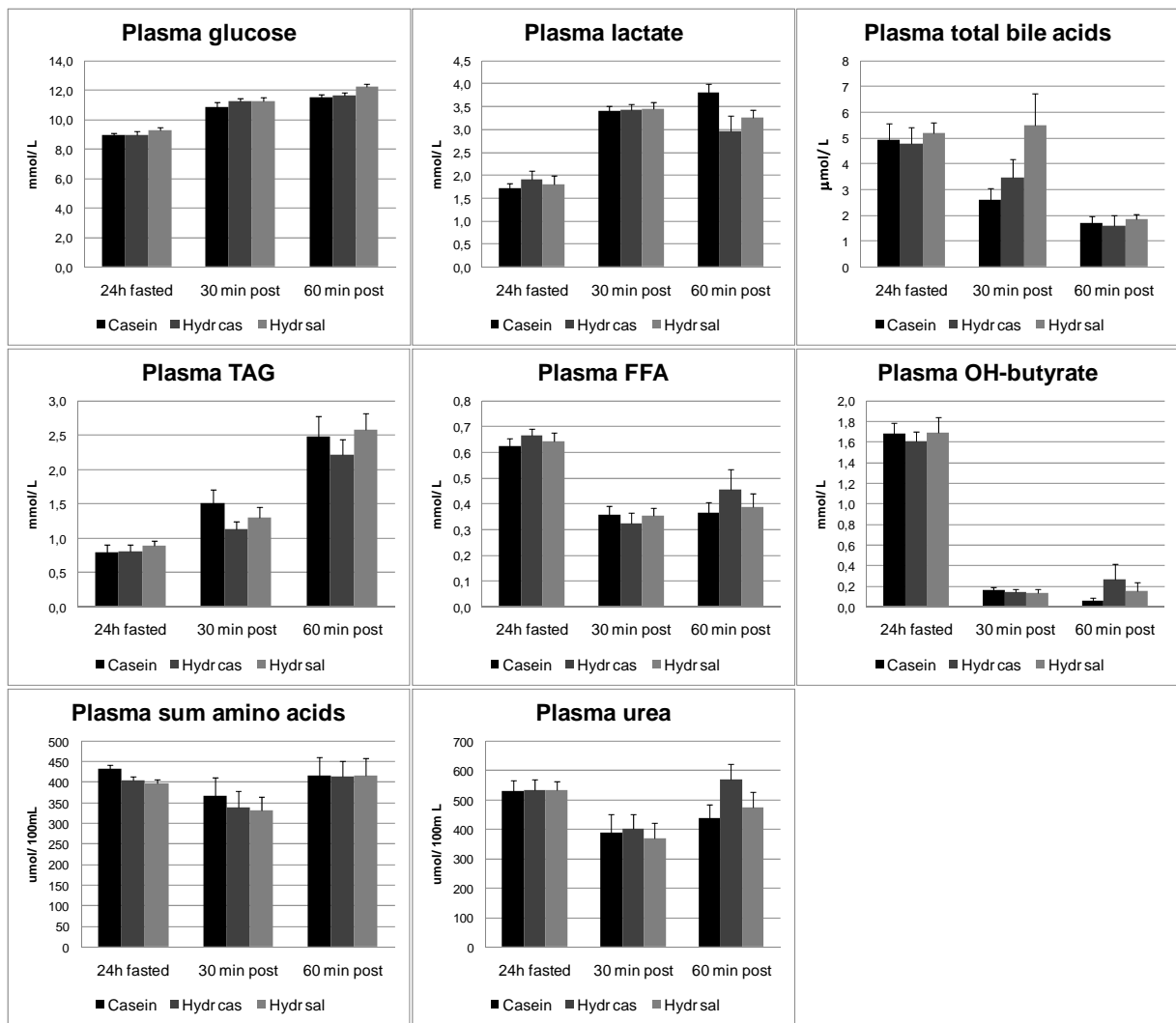
Rotter som blei fôra høg-energi diettar med lakse FPH som einaste proteinkjelde, hadde lavare nivå av både insulin og sukker i blod, samt lavare uttrykk av eit gen som styrer nydanninga av blodsukker i lever (kalla *Pck1*), samanlikna med rottene som blei fôra kasein (Docmar peptid I 2002-2006, Liaset et al, 2011). Dette indikerer at rottene som fekk lakse FPH i dietten hadde betre evne til å regulere blodsukker enn dei som fekk kasein i dietten.

Ein vanleg måte å teste korleis menneskjer og dyr kan regulere blodsukker, er å gjennomføre ein sukker-belastnings test. Det vil seie at fasta individ enten drikk (menneskjer) eller blir sondefôra til mage (dyr) med ei viss mengde sukkerløysing. Dette blir kalla 'oral glukose toleranse test'. Blodsukker blir målt før (fastande), og 15, 30, 60 og 120 minutt etter inntaket av sukker. Individ med normal insulinfunksjon vil etter 120 minutt ha returnert blodsukker ned mot fastande verdi. Individ med nedsett insulinfunksjon vil derimot ha ei redusert evne til å returnere blodsukkeret tilbake til fastande nivå.

I dette delprosjektet har vi undersøkt om delvis (50%) utbyting av kasein med lakse FPH eller hydrolysert kasein påverka blodglukose hos rotter. I utgangspunktet hadde vi tenkt å utføre ein oral glukose toleranse test på rottene. Men det blei nyleg publisert at lakse FPH gitt i høg-fett diettar ikkje påverkar blodsukkernivå i rotter målt ved hjelp av oral glukose toleranse test. Derimot blei det i same publikasjon vist at rottene som fekk lakse FPH, samanlikna med rotter som fekk kasein, hadde betre insulin-sensitivitet, målt med 'euglykemisk-hyperinsulinemisk clamp metode' (Pilon, G. et al, 2011). Med denne metoda kan skilnader oppdagast før ein ser utslag med oral glukosetoleranse test. Vi endra derfor oppsett, og gjennomførte eit 'etter-måltidsstudie'. Rotter blei fôra høg-fett diettar med proteinkjelde i form av kasein, kasein + hydrolysert kasein (1:1) eller kasein + lakse FPH (1:1). Nitti rotter blei fordelt på 3 grupper, 30 rotter i kvar. Rottene blei fôra ein av diettane i 6

veker. Deretter blei rottene fasta i 24 timar. Ti rotter frå kvar diettgruppe blei avliva i fasta tilstand og plasma blei separert frå blod for analyse. Dei resterande 60 rottene blei gjeve 5g av sine respektive diettar, og som dei spiste opp i løpet av 30 minutt. Nye 30 minutt etter avslutta test-måltid, blei 30 rotter (10/gruppe) avliva og plasma blei separert frå blod for analyse. Seksti minutt etter avslutta testmåltid blei dei siste 30 rottene (10/gruppe) avliva, plasma blei separert frå blod for analyse. Dette ga oss mogleik til å studere korleis dei ulike proteinkjeldene påverka samansetnad i blod av aminosyrer, glukose, fett og andre metabolittar før og etter test-måltidet. Resultat er viste i Figur 1.

Det var ingen effekt av type protein på fastande plasmakonsentrasjonar av blodsukker, laktat (markør for glukose nedbryting), totale gallesyrer, triacylglycerol (TAG), frie feittsyrer (FFA), β -hydroxybutarate (OH-butyrat), eller urea (markør for aminosyre-nedbryting). Sum av frie aminosyrer i fastande plasma var signifikant høgare i rottene som hadde fått kun intakt kasein (Figur 1). Rottene hadde vore fasta i 24 timar og dette utamar sukkerlagra i kroppen, noko vi kan sjå på dei lave plasma blodsukker- og laktat konsentrasjonane. Laktat er ein indikator på kor mykje blodsukker som blir brukt som energi-kjelde i kroppen. Ved lav tilgang på energi-kjelder frå dietten (sukker og fett), hentar rottene energi frå feittvev (viktig energilager). Dette ser vi på dei høge verdiane av frie feittsyrer i plasma. Noko av dei frie fettsyrene blir tekne opp i muskelvev, og blir brukt til å lage energi der. Ein del av dei frie fettsyrene blir tekne opp i lever og omdanna til ketonlegemer (OH-butyrat), som er ei viktig energi-kjelde for hjertet. Etter test-måltidet, når rottene fekk energi tilført i form av sukker og TAG frå dietten, auka nivå av plasma blodsukker og markøren for blodsukker omsetnad i kroppen, laktat, samt plasma konsentrasjonen av TAG. Fordi energi blir tilført frå dietten, treng ikkje rottene bruke meir av energilagra sine (feittvev), og derfor går nivå av frie feittsyrer ned, og det same gjer plasma nivået av ketonlegemet OH-butyrat. Seksti minutt etter test-måltidet, hadde rottene som fekk hydrolysert kasein signifikant lavare plasma laktat verdiar, enn rottene som fekk kasein. Samstundes tenderte rottene fôra hydrolysert kasein til å ha høgare plasma urea nivå, noko som tyder på at meir av aminosyrene i dietten blei brotne ned i lever. Våre resultat viser at hydrolysert kasein, i større grad enn lakse-FPH, påverkar omsetnaden av næringstoff i rotter ulikt frå intakt kasein, men at nivå av blodsukker ikkje blir påverka av hydrolysert kasein eller lakse-FPH i rotter under desse forsøksstillingane.



Figur 1. Plasma verdier målte i rotter som hadde blitt føra høg-feitt diettar med proteinkjelde i form av kasein, kasein+hydrolysert kasein (1:1) eller kasein + lakse FPH (1:1). Forkortingar: TAG triacylglycerol, FFA frie fettsyrer, OH-butyrate β -hydroxybutarate (ketonlegeme). Data er viste som gjennomsnitt + SEM (n=10).

- Konklusjon:** Konsentrasjon av blodsukker blir redusert når alt kasein blir byta mot lakse FPH i høg-feitt diettar gjeve til rotter. Konsentrasjonen av blodsukker blir ikkje påverka i rotter føra høg-feitt diettar med intakt kasein, eller halvparten av det intakte kaseinet erstatta med lakse-FPH eller hydrolysert kasein. Dette kan tyde på at den blodsukker-senkande effekten av lakse-FPH er konsentrasjonsavhengig.

Ekstern litteraturreferanse

Pilon, G. et al. (2011) 'Differential effects of various fish proteins in altering body weight, adiposity, inflammatory status, and insulin sensitivity in high-fat-fed rats' *Metabolism Clinical and Experimental*, doi:10.1016/j.metabol.2010.12.005

STATUS MAI 2011

Vi har gjennom DOCMAR-prosjekta vist i gnagarar:

- at FPH aukar energi-omsetnaden i rotter, samanlikna med kasein (Rubin rapport #4608)
- at FPH kan motverke utvikling av fedme i gnagarar, samanlikna med kasein og soyaprotein (Rubin rapport #4608)
- at FPH kan senke blodlipid (triacylglycerol), samanlikna med kasein og soyaprotein (Liaset *et al.* 2009, Liaset *et al.* 2011)
- at FPH aukar konsentrasjonen av gallesyrer i blod i rotter, samanlikna med kasein og soyaprotein, og at denne auken er gunstig med omsyn til auka energi-omsetnad og reduksjon av fedme (Liaset *et al.* 2009, Liaset *et al.* 2011)
- at hydrolysert protein, både kasein og FPH reduserer mengde TAG i muskel og lever (Rubin rapport #155)
- at lakse FPH aukar konsentrasjon av glutation i lever, men at effekten er avhengig av mengde FPH i dietten (Rubin rapport # 193, Liaset *et al.* 2011)
- at nokre komponentar som FPH er rik på (taurin, glysin og pantotensyre) er viktige for å redusere utviklinga av fedme i mus (Rubin rapport # 193)
- at lakse FPH, ved full utbyting av kasein, kan redusere blodsukker og insulin i rotter gjeve høgfeitt diettar (Liaset *et al.* 2011)
- at lakse FPH, ved 50% utbyting av kasein, ikkje reduserer blodsukker i rottene samanlikna med dei som har spist kasein, eller kasein og hydrolysert kasein (50% av kvar) (Denne rapport)

Vitskapelege publikasjonar frå Docmar peptid prosjekta:

Liaset B and Espe M (2008) 'Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish raw-materials' *Process Biochemistry* 43: 42-48

Liaset B et al (2009) 'Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats' *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791: 254-262

Liaset B et al (2011) 'Nutritional Regulation of Bile Acid Metabolism is Associated with Improved Pathological Characteristics of the Metabolic Syndrome' *Journal of Biological Chemistry* <http://www.jbc.org/content/early/2011/06/16/jbc.M111.234732>

Det vil kome ein **fjerde publikasjon** frå Docmar peptid prosjekta som skal omhandle effekt av å erstatte 50% av intakt kasein med hydrolysert kasein eller lakse FPH, med fokus på energiomsetnad og utvikling av fedme i rotter fôra høgfeitt diettar. Manuskriptet er planlagt ferdigstilt til vitskapeleg publisering hausten 2011.