

Helseeffekter i lakseceller eksponert for fiskebeinhydrolysater fra torsk, sild og kolmule

Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter, Inger Øien Kristiansen, og Sissel Albrektsen





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 94 33 14
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

		ISBN 978-82-8296-167-7 trykt ISBN 978-82-8296-168-4 pdf ISSN 1890-579X
Tittel: Helseeffekter i lakseceller eksponert for fiskebeinhydrolysater fra torsk, sild og kolmule		Rapportnr.: 10/2014
		Tilgjengelighet: Åpen
Forfatter(e)/Prosjektleder: Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter, Inger Øien Kristiansen og Sissel Albrektsen		Dato: 06 februar 2014
Avdeling: Ernæring og førteteknologi		Ant. sider og vedlegg: 21
Oppdragsgiver: Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfond (FHF)		Oppdragsgivers ref.: FHF # 900558
Stikkord: Fiskebein, fosfor, biprodukter, antioksidant forsvar, stress respons, cellekultur, laks		Prosjektnr.: 21109
Sammendrag/anbefalinger: <p>Vi har induisert intracellulært stress i lakseceller <i>in vitro</i> ved tilsetning av buthionine sulfoximine eller harsk fiskeolje. Hensikten med forsøket var å studere hvorvidt eksponering av cellene med fiskebeinhydrolysater (FBH) fra torsk, kolmule og sild påvirker evnen til å håndtere påført stress og om ulike FBH med ulik prosessering ville gi ulik respons. Alle FBH så ut til å ha en positiv effekt på levercellene ved å nedregulere gener involvert i inflammasjon og stress. I tillegg gav FBH fra kolmule oppregulering av gener involvert i energiomsetningen. Tilsetning av FBH fra kolmule og sild til leverceller fra laks førte til redusert aktivitet av intracellulære antioksidant enzymer SOD, GPX og katalase, mens FBH fra torsk, gav en oppregulering av disse forsvarsmekanismene. Både type nøytraliseringsmiddel, NH₃ versus KOH, og sulfat mengde tilført fra svovelsyre (H₂SO₄) under prosessering av de ulike FBH kan være av betydning for responser hos celler eksponert for de ulike FBH. Våre forsøk viste at sulfat alene fører til hemming av antioksidantene SOD, GPX og katalase. Type nøytraliseringsmiddel og sulfat mengde tilført fra svovelsyre kan dermed være faktorer av betydning for produksjonsresultat i laks. Forsøkene viste at de fleste positive effektene av FBH var av samme karakter som effekter forårsaket av fosfor alene.</p>		
English summary/recommendation: <p>The objective of the experiment was to study if fish bone hydrolysates of cod, blue whiting and herring, affect the cells ability to handle stress, and if different processing of FBH resulted in different responses. All FBH seemed to have a positive effect on cells by down-regulating genes involved in inflammation and stress. In addition, FBH from blue whiting up-regulated genes involved in energy metabolism. FBH from blue whiting and herring reduced activity of intracellular antioxidant enzymes SOD, GPX and catalase, while FBH cod, showed an up-regulation. Differences in neutralizing agent and sulphate content may explain variation in cellular responses to the different FBH.</p>		

Innhold

1	Bakgrunn	1
2	Materiale og metoder	3
2.1	Fiskebeinhydrolysat (FBH)	3
2.2	Isolering av leverceller.....	3
2.3	Forsøksdesign	3
2.3.1	<i>In vitro</i> forsøk med FBH fra sild og kolmule, sulfat og sulfitt	3
2.3.2	<i>In vitro</i> forsøk med FBH fra torsk	4
2.4	Kvantitativ PCR	4
2.5	Enzymanalyser.....	4
2.5.1	Superoksid dismutase (SOD)	4
2.5.2	Katalase	5
2.5.3	Glutathione peroksidase (GPX)	5
2.6	Statistikk	5
3	Resultater	6
3.1	Effekt av FBH fra kolmule og sild på cellens oksidative stressrespons og energiomsetning .	6
3.1.1	Enzymaktivitet av superoksid dismutase (SOD)	6
3.1.2	Enzymaktivitet av glutathione peroksidase (GPX).....	7
3.1.3	Enzymaktivitet av katalase	8
3.1.4	Genuttrykk.....	9
3.2	Effekt av to ulike FBH fra torsk og fosfor på cellens stressrespons.....	11
3.2.1	Cellemorfologi	11
3.2.2	Enzymaktivitet av superoksid dismutase (SOD)	12
3.2.3	Enzymaktivitet av glutathione peroksidase (GPX).....	13
3.2.4	Enzymaktivitet av katalase	14
3.2.5	Genuttrykk.....	15
4	Diskusjon	18
4.1	<i>In vitro</i> forsøk med FBH fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt	18
4.2	<i>In vitro</i> forsøk med FBH torsk og fosfor	18
5	Konklusjon	20
6	Referanser	21

1 Bakgrunn

Forsøk med laks har vist at fosfor (P) hydrolysert fra fiskebein (FBH) kan fungere som en fullgod P kilde og gi høy tilvekst, mineralisering og normal skjelettutvikling i laks (Albrektsen et al., 2010, 2013, 2014a, b). Det er også funnet tilleggseffekter i form av økt fordøyelighet av næringsstoffer og indikasjon på litt bedre vekst og litt mindre variasjon i fiskematerialet basert på FBH kolmule (Albrektsen et al., 2010, 2013). Det har vært av interesse å prøve å kartlegge mulige årsaker til dette, ved å studere om FBH kan ha bioaktivitet utover å fungere som en P kilde. I dette prosjektet har vi valgt å bruke leverceller fra laks som modellsystem for å undersøke bioaktive funksjoner av FBH produsert fra sild, kolmule og torsk. Forsøk med laks har gitt litt ulike resultat i ulike forsøk, og det har vært usikkert om dette skyldes råstoff forskjeller (sild og kolmule) eller litt ulike produksjonsbetingelser, i.e. ulike syremengder og ulike nøytraliseringsmidler. Det første *in vitro* forsøket ble gjennomført som et innledende screeningstudie basert på FBH sild og FBH kolmule. Det siste forsøket FBH torsk ble gjennomført for å studere effekt av to ulike nøytraliseringsmidler (KOH og ammoniakk løsning) basert på et litt sterkere forsøksdesign med flere parallelle prøver og en kjemisk induser av stress.

Innledende forsøk, hvor leverceller ble inkubert med P fra FBH, tydet på at FBH kunne påvirke flere biologiske prosesser i fisken. FBH er en relativt kompleks matriks bestående av mange ulike makro- og mikromineraler, foruten kollagener fra fiskebein og andre vannløselige forbindelser av kjent og ukjent opphav. *In vitro* cellemodeller er et egnet verktøy for å studere eventuelle tilleggseffekter av FBH i tillegg til P effekter, eksempelvis sulfater som tilføres i relativt store mengder fra svovelsyre. Kollagenprotein i fiskebein er vist å ha antioksidant effekt, og aminosyre profilen i FBH tyder på at det er en del kollagenprotein tilstede. Ulike protein hydrolysater er tidligere vist å ha flere interessante egenskaper (Chalamaiah 2012; Suarez-Jimenez 2012). FBH fra ulike fiskearter kan fungere som en effektiv alternativ P kilde til laks (Albrektsen et al., 2010, 2013, 2014a, b). Andre protein hydrolysater er i pattedyrstudier vist å være blodtrykkssenkende, antitrombotiske, og immunmodulerende. I tillegg har protein hydrolysater vist å kunne redusere oksidativt stress, fremme vekst og redusere celledeling (Fitzgerald et al., 2005).

I dette prosjektet ønsket vi å studere hvorvidt FBH påvirket cellens eget forsvarssystem mot oksidativt stress, både i normale kontrollceller og i celler induert for oksidativt stress ved hjelp av harske fiskeoljer eller en kjemisk induser som buthionine sulfoximine (BSO). Vi ønsket videre å studere hvorvidt FBH ville påvirke faktorer som regulerer energiomsetningen i fisken, siden denne prosessen er nært knyttet opp til fri radikal-reaksjoner med dannelse av oksygenradikaler. Disse prosessene er også nært knyttet opp til inflammatoriske stress responser, og er grunnen til at det også ble inkludert markører for dette.

Kroppens forbrenning av mat for å skaffe energi er basert på fri-radikal reaksjoner. Reaktive oksygenforbindelser (ROS) kan ha både positive og negative helseeffekter (Valko et al., 2006). Gunstige helseeffekter av ROS skjer ved lave konsentrasjoner. Negative effekter av fri radikaldannelse skjer i biologiske systemer når det er en overproduksjon av ROS og mangel på enzymatiske eller ikke enzymatiske antioksidanter, og ved inntak av oksiderte forbindelser, som f.eks harsk fiskeolje. Det er tidligere vist at oksidativt stress i fisk kan føre til hemming av mitokondriell β -oksidasjon og dermed redusert fettforbrenning (Kjær et al., 2008; Todorovic et al., 2009).

Kroppen har et eget forsvarssystem for å ta seg av frie radikaler (ROS) på avveie. Dette kan den gjøre både enzymatisk og ved hjelp av egne antioksidanter. De tre viktigste intracellulære antioksydantene er superoxide dismutase (SOD) som katalyserer omdanningen av superoksid til hydrogenperoksid og katalase og glutathione peroksidase (GPX) som fjerner hydrogenperoksid.

Vi har tidligere vist at økt oksidativt stress i laks kan gi induisert apoptose, redusert β -oksidasjon, skade på mitokondriemembran og endringer i muskelstruktur (Kjær et al., 2008; Todorčević et al., 2009 Østbye et al., 2011). Apoptose er programmert celledød og indueres ved bestemte situasjoner (Kannan 2000). Stress, varme, stråling, næringsmangel, virusinfeksjon og hypoksia er eksempler på prosesser som kan igangsette apoptose. Flere ulike faktorer er involvert i apoptose-prosessen. Apoptose induerende faktor (aif) og smac/diablo er involvert i initiering av caspase-avhengig apoptose. Nfkb er en transkripsjonsfaktor er involvert i mange biologiske prosesser som stress, betennelse, immunitet, differensiering, cellevekst, kreftutvikling og apoptose.

2 Materiale og metoder

2.1 Fiskebeinhydrolysat (FBH)

Ulike FBH ble testet ut i to *in vitro* celleforsøk. FBH ble produsert fra ulike fiskearter og ved hjelp av ulike nøytraliseringsmidler (Tabell 1). Prosess betingelser for syrehydrolyse er presentert for FBH sild og FBH kolmule i Albrektsen et al. (2014a). Prosessbetingelser for FBH torsk er ikke rapportert, men prosessen er prinsipielt den samme, men tilpasset til et lavere innhold av aske i bein, dvs det er brukt lavere syremengde ved hydrolyse av torskebein. FBH torsk er nøytralisert med henholdsvis KOH eller ammoniakk løsning (25 %), og dette er det eneste som skiller de to variantene av FBH torsk.

Tabell 1 Kjemisk sammensetning og nøytraliseringsmiddel benyttet til produksjon av de ulike FBH

Benevnelse	FBH sild	FBH kolmule	FBH torsk-KOH	FBH torsk - NH4
Produksjonsår	jan.11	jan.11	jul.13	jul.13
Råstoff	Sild	Kolmule	Torsk	Torsk
Protein	37	8.9	4.6	-
Fett	1.6	1.6	0.7	0.6
Ts	97.8	96.2	96.5	96.9
Aske	32.2	67.7	76	50.4
Total P	10.4	10.35	18.53	17.73
Løselig P	9.1	9.15	15.68	15.21
Ca	1.75	1.3		
Nøytralisering	NH3, 25 %	KOH	KOH	NH3, 25%

2.2 Isolering av leverceller

Leverceller ble isolert fra Atlantisk laks i henhold til metode beskrevet av Dannevig og Berg (1985). Etter isolering ble cellene filtrert gjennom et 100 µm nylon filter. Cellene ble vasket tre ganger i L-15 medium og sentrifugert i 2 minutter ved 50 xg mellom hver vask. Etter siste vask ble cellene reløst i Glutamax dyrkningsmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 1 % bikarbonat, 5mM Hepes og 1 % PenStrep. Omtrent 1 x 10⁷ celler ble deretter sådd ut i 9.6 cm² cellebrønner belagt med laminin. Cellene festet seg til bunnen av celleflasken over natt ved 13°C. Neste dag ble cellene tilsatt inkubasjonsmedium med 2 % føtalt kalveserum og FBH, sulfat, sulfitt eller fosfor.

2.3 Forsøksdesign

2.3.1 *In vitro* forsøk med FBH fra sild og kolmule, sulfat og sulfitt

Leverceller ble tilsatt fire ulike konsentrasjoner med hhv. FBH fra sild- og kolmule, sulfat (ammoniumsulfat) og sulfitt (kaliumsulfitt). De benyttede konsentrasjonene av FBH fra sild og

kolmule ble beregnet ut i fra nivå av løselig fosfor i FBH. Det tilsatte nivå av løselig fosfor var rundt fysiologisk nivå av fosfor i plasma. Fosforinnholdet i de fire ulike nivåene av FBH var 300, 400, 500 og 600 ug/mL, mens sulfat og sufitt ble tilsatt i konsentrasjonene 400, 550, 700 og 850 ug/mL. Sulfat og sulfitt ble tilsatt i hht. nivå av disse i FBH.

Stress ble indusert i halvparten av cellene ved tilsetning en oksidert fiskeolje (0.5 mg/mL; PV: 46, AV 26). Cellene ble dyrket i 48 timer ved 13°C og deretter høstet til de ulike analysene. Pga. omfanget av forsøket og fordi det ble ansett som et screening forsøk ble ikke brukt replikate prøver. Prøvene ble analysert for uttrykk av tre stress/inflammasjon relaterte gener og to β -oksidasjonsrelaterte gener, i tillegg til enzymaktivitet av SOD, GPX og katalase.

2.3.2 *In vitro* forsøk med FBH fra torsk

Levercellene ble dyrket i 48 timer med fire ulike konsentrasjoner av FBH fra torsk og fosfor (β -glycerofosfat) tilsatt i cellemediet. Mengden FBH tilsatt ble beregnet ut i fra innholdet av løselig fosfor, som var rundt fysiologisk nivå av fosfor i plasma. De fire konsentrasjonene av FBH inneholdt hhv. 50, 150, 450 og 600 ug/mL fosfor. Cellene som ble dyrket i medie med ekstra fosfor ble tilsatt fosfor i form av β -glycerofosfat, og konsentrasjonen av fosfor var i hht. nivå av fosfor i FBHene. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt 2 mM buthionine sulfoximine (BSO) for å indusere en stressreaksjon. Cellene ble så høstet til de ulike analysene. Det ble benyttet triplikate prøver. Prøvene ble analysert for uttrykk av gener involvert i stress, inflammasjon og apoptose og for enzymaktivitet av SOD, GPX og katalase.

2.4 Kvantitativ PCR

Total RNA ble ekstrahert ved bruk av RNeasy® Mini Kit (Qiagen) i henhold til produsentens protokoll. RNA ble behandlet med RNase-free DNase I for å fjerne kontaminerende DNA. cDNA syntese ble laget fra ca 500 ng total RNA i et volum på 20 uL med AffinityScript cDNA synthesis kit (Agilent Technologies). Reaksjonen ble kjørt 25 minutter ved 25 °C, 42 °C i 40 minutter, og 95 °C i 5 minutter. PCR reaksjonen ble kjørt med 4 uL cDNA (1:10 fortynnet), 1 uL primer miks og 5 uL SYBR green master miks under følgende forhold: 95 °C i 5 sekunder, 45 sykluser med 95 °C i 15 sekunder/60 °C i 15 sekunder/ 72 °C i 15 sekunder. Smeltepunktsanalyse ble kjørt for å bekrefte amplifisering av kun et fragment. Relativt genuttrykk ble beregnet ved $\Delta\Delta C_t$ metoden.

2.5 Enzymanalyser

2.5.1 Superoksid dismutase (SOD)

SOD katalyserer reduksjon av superokside til oksygen og hydrogenperoksid. Et kommersielt tilgjengelig kit ble benyttet til analysen av denne enzymaktiviteten (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Analysen ble avlest ved 450 nm i en Spectrostar Nano mikroplateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg).

2.5.2 Katalase

Katalase ble målt i henhold til en metode beskrevet i Baudhuin et al. (1964). Substratet hydrogenperoksid, produsert i peroxisomes, brytes ned av katalase til oksygen og vann. Denne reaksjonen stanses ved tilsetning av en mettet løsning (0.45 %) av titan oxysulphate i 2 M svovelsyre. Titanium oxysulphate reagerer med hydrogenperoksyd og gir en gul løsning av peroxytitansulfat. Dette ble målt spektrofotometrisk ved 405 nm i en Spectrostar Nano mikroplateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg).

2.5.3 Glutathione peroksidase (GPX)

GPX katalyserer reduksjonen av hydroperoksider, inkludert hydrogenperoksid. Et kommersielt tilgjengelig kit ble benyttet til analysen av denne enzymaktiviteten (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Analysen ble avlest ved 340 nm i en Spectrostar Nano mikroplateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg).

2.6 Statistikk

Signifikante forskjeller ble testet ved en-veis anova på all data fra *in vitro* forsøk med FBH fra torsk.

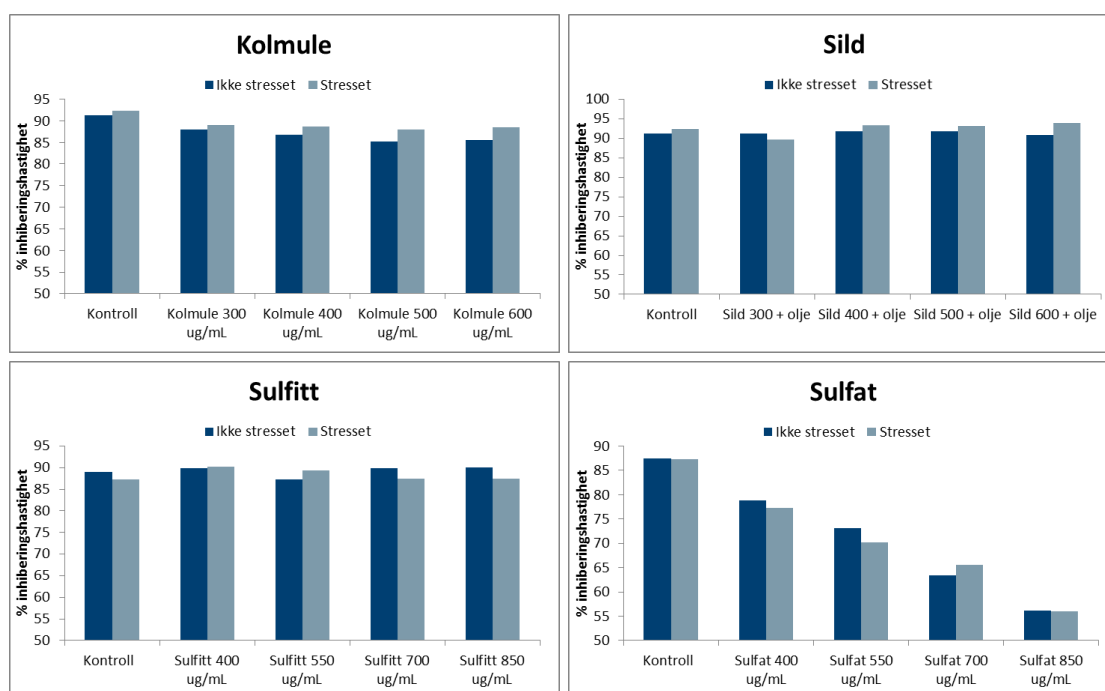
3 Resultater

3.1 Effekt av FBH fra kolmule og sild på cellens oksidative stressrespons og energiomsetning

Intracellulært stress kan induseres i celler på flere ulike måter, og i dette forsøket tilfører vi cellene en oksidert fiskeolje med PV verdi på 26 og AV verdi på 46. Harske fiskeoljer inneholder ulike oksidasjonsprodukter som induserer cellenes antioksidantforsvar (Grimmer et al., 2013). FBH tilsettes celler som enten er stresset med oksidert fiskeolje eller ustresset uten fiskeoljetilsetning.

3.1.1 Enzymaktivitet av superoksid dismutase (SOD)

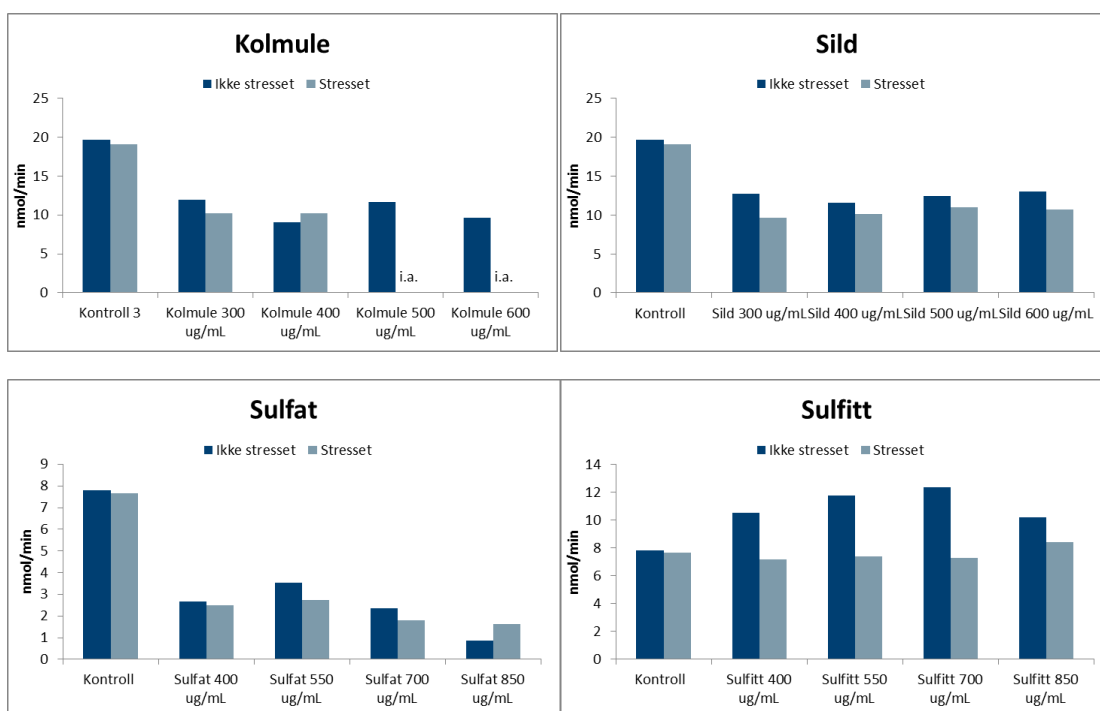
Det var stort sett høyere SOD aktivitet i cellene som ble utsatt for oksidert oljestress sammenliknet med ikke-stressede celler (figur 1). Celler tilsatt økende nivå av FBH fra kolmule viste svak tendens til reduksjon i aktiviteten av SOD, mens celler tilsatt FBH fra sild og sulfitt viste liten påvirkning på SOD aktiviteten. Tilsetning av sulfat til levercellene viste en dose-respons reduksjon i SOD aktivitet.



Figur 1 SOD inhiberingsaktivitet (%) i leverceller fra laks dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner FBH fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt. Halvparten av cellene ble tilsatt en harsk fiskeolje for å indusere stress.

3.1.2 Enzymaktivitet av glutathione peroksidase (GPX)

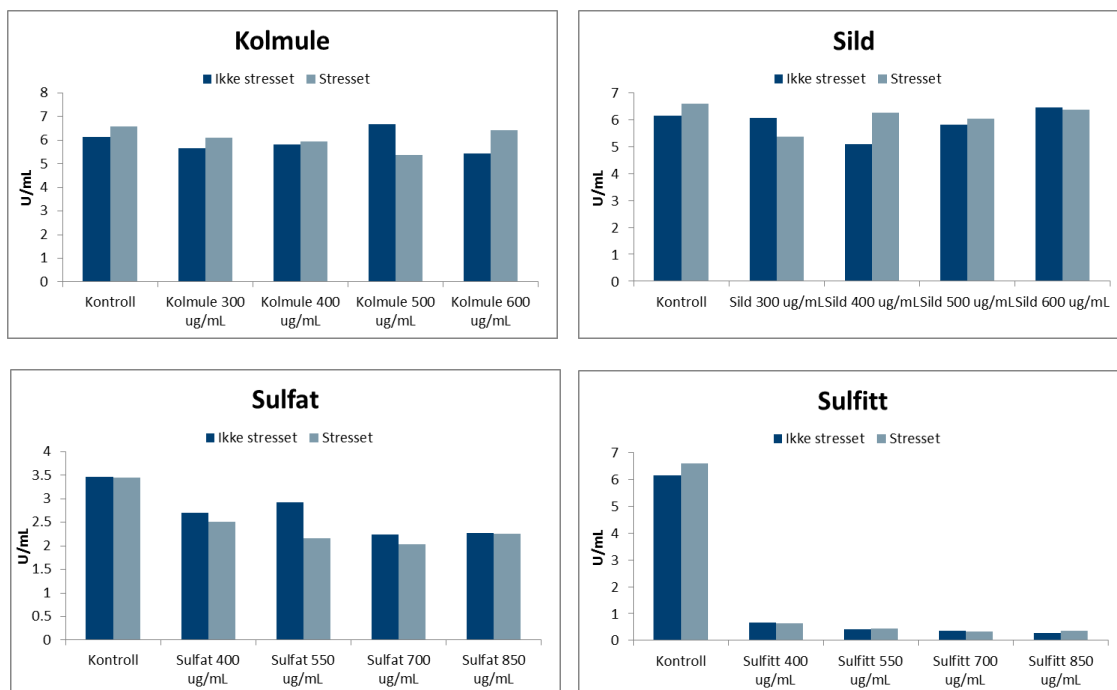
Eksposering av leverceller for oksidert fiskeolje så ut til å medføre redusert aktivitet av GPX, både i celler tilsatt beinhydrolysat fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt (figur 2). I forhold til kontrollcellene reduserte FBH og sulfat aktiviteten av GPX både i stressede og ikke-stressede celler. Sulfitt ga økt enzymaktivitet i cellene som ikke ble stresset, mens de stressede cellene viste ingen endring i aktivitet.



Figur 2 GPX aktivitet i leverceller fra laks dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner FBH fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt. Halvparten av cellene ble tilsatt en harsk fiskeolje for å indusere stress. i.a.: ikke analysert.

3.1.3 Enzymaktivitet av katalase

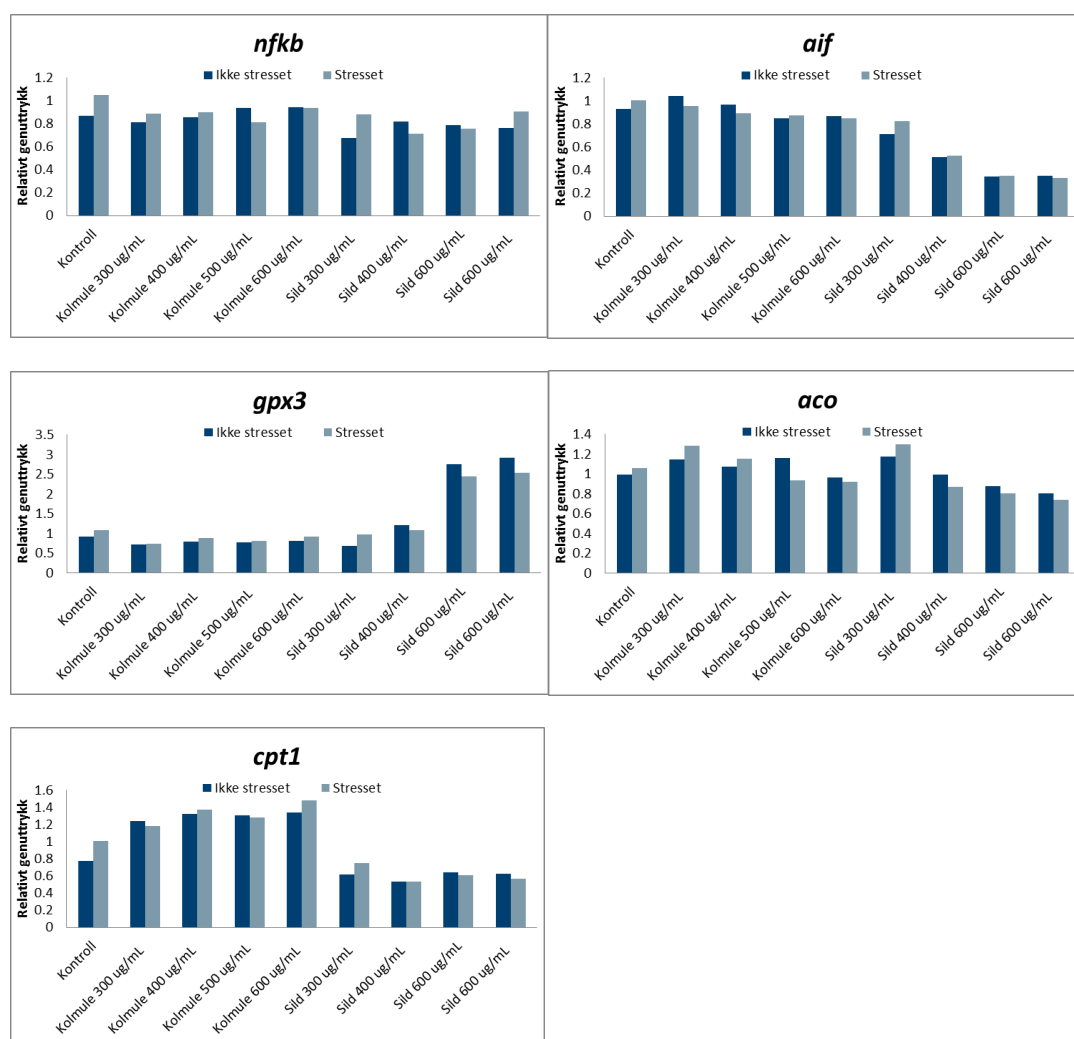
Eksposering av leverceller med oksidert fiskeolje så ut til å øke aktiviteten av katalase i kontrollceller både med FBH fra sild og kolmule (figur 3). Det var en svak tendens til redusert aktivitet i stressede celler i forhold til kontroll ved dyrking med FBH fra kolmule, med unntak av den høyeste dosen. FBH fra sild ga ikke noe tydelig mønster i katalaseaktivitet i ved økende nivå FBH i dyrkingsmediet. Både sulfat og sulfitt reduserte katalaseaktiviteten i cellene. Sulfitt så nærmest ut til å slå ut enzymaktiviteten.



Figur 3 Katalaseaktivitet i leverceller fra laks dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner FBH fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt. Halvparten av cellene ble tilsatt en harsk fiskeolje for å indusere stress.

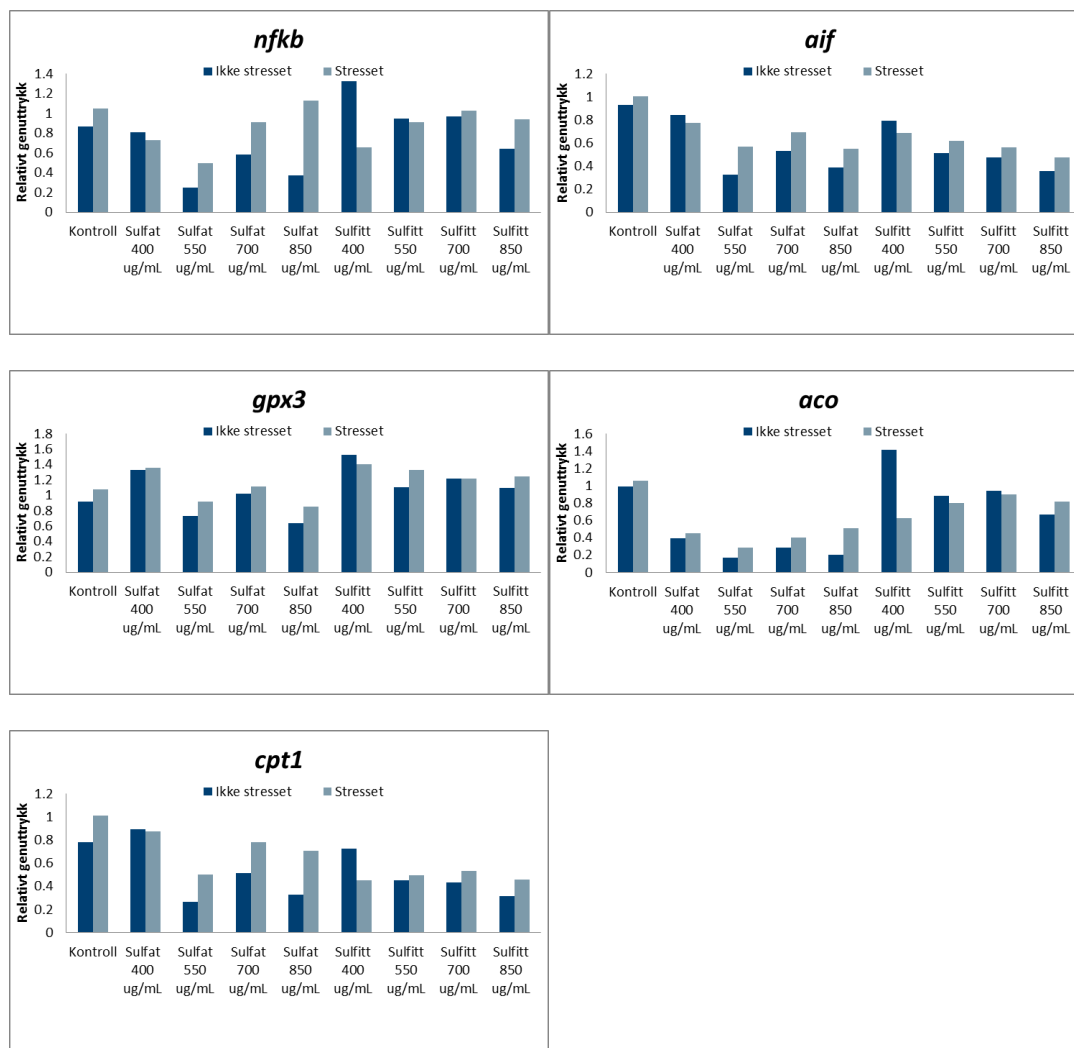
3.1.4 Genuttrykk

Stressinduksjon ved tilsetning av en harske olje til kontroll cellene så ut til å oppregulere gener involvert i inflammasjon (*nfkB*), antioksidantforsvar (*gpx*), apoptose (*aif*) og β -oksidasjon (*aco* og *cpt1*), sammenliknet med ikke-stressede kontroll celler (figur 4). I kombinasjon med stress så FBH kolmule ut til å nedregulere gener involvert i stress og inflammasjon (*nfkB*, *aif*), mens *cpt1* ble oppregulert. Videre ga lave doser av FBH kolmule oppregulering av *aco* sammenliknet med kontroll. I ikke-stressede celler ga FBH kolmule generelt redusert genuttrykk av *gpx3* og økt genuttrykk av *cpt1* og *aco*. FBH sild i kombinasjon med stress så ut til å redusere genuttrykk av *nfkB* og *aif*, mens høye doser oppregulerte *gpx3*. Gener involvert β -oksidasjon (*aco* og *cpt1*) ble nedregulert av FBH sild både i stressede og ustressede celler, med unntak av den laveste dosen som viste oppregulering av *aco*.



Figur 4 Genuttrykk i lakseleverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner kolmule- og sildehydrolysat. Halvparten av cellene ble tilsatt en harsk fiskeolje for å indusere stress. All genuttrykksdata er beregnet i forhold til kontroll ikke tilsatt stressor.

Økt stress i cellene dyrket med sulfat og sulfitt ga stort sett oppregulering av de analyserte genene sammenliknet med ikke-stressede celler (figur 5). De fleste dosene av sulfat både i stressede og ikke-stressede celler viste redusert genuttrykk i forhold til kontrollcellene. Sulfitt ga redusert genuttrykk av *aif*, *aco* og *cpt1* i stressede celler, og oppregulert uttrykk av *gpx3*.



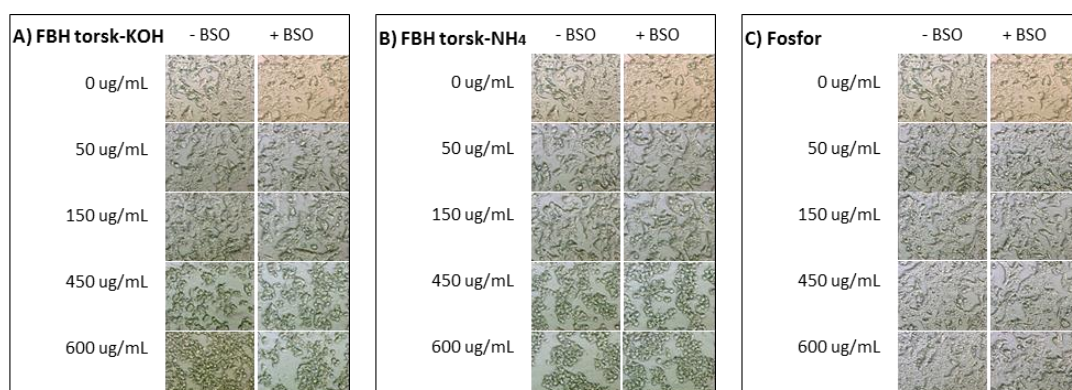
Figur 5 Genuttrykk i lakseleverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner sulfat og sulfitt. Halvparten av cellene ble tilsatt en harsk fiskeolje for å indusere stress. All genuttrykksdata er beregnet i forhold til kontroll ikke tilsatt stressor.

3.2 Effekt av to ulike FBH fra torsk og fosfor på cellens stressrespons

I dette forsøket har vi induisert intracellulært stress ved tilsetning av kjemikaliyet buthionine sulfoximine (BSO). BSO reduserer det cellulære nivået av glutathione ved å hemme glutamylcysteine synthetase, det første enzymet i syntesen av glutathione (Griffith 1982). På denne måten hemmer man delvis cellens eget antioksidantforsvar. Dette er en kraftigere stressinduser enn oksidert olje, som ble benyttet i studien over. Hensikten med dette forsøket var å studere hvorvidt to ulike FBH fra torsk ville bedre cellens evne til å håndtere det påførte stresset og om det var forskjell mellom de ulike FBH.

3.2.1 Cellemorfologi

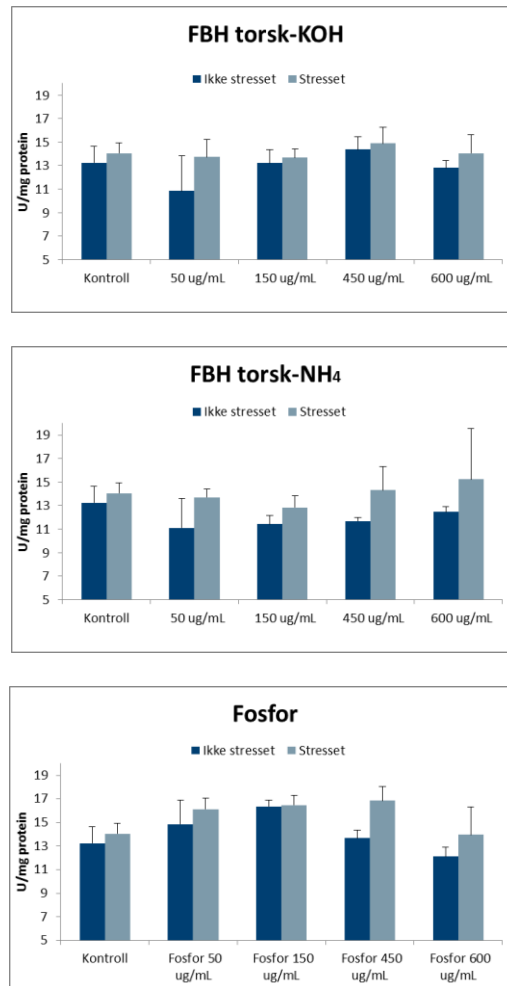
Undersøkelse av levercellene i mikroskop viste liten morfologisk forskjell mellom stressede og ustressede celler (figur 6). Det var heller ingen tydelig forskjell mellom de ulike behandlingene (FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor). De høyeste dosene av FBH så imidlertid ut til å føre til at økt antall celler løsnet fra underlaget de vokste på. Cellene som var festet til underlaget så derimot ikke ut til å være døde eller ha endret morfologi, og ble derfor inkludert i de ulike analysene. Men det kan være at de to høyeste dosene med FBH har forårsaket en stressrespons i seg selv og at man i tolkningen av data bør ha størst fokus på effekter av de moderate nivåene av FBH.



Figur 6 Leverceller fra laks dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner torskehydrolysat (FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄) og fosfor (β -glycerofosfat). Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å inducere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i de ulike behandlingene er vist.

3.2.2 Enzymaktivitet av superoksid dismutase (SOD)

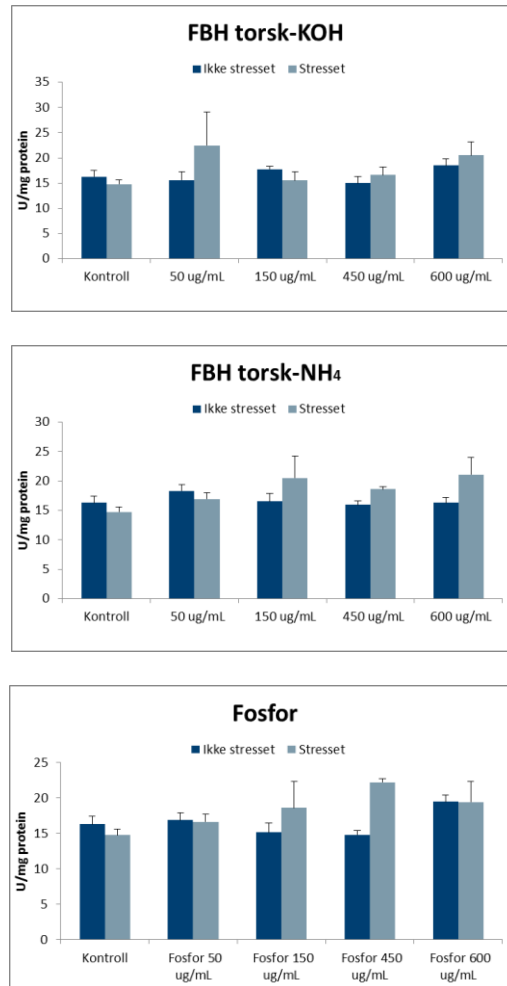
Det var ingen signifikante forskjeller i SOD aktivitet i cellene dyrket med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor (figur 7). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom stressede og ikke-stressede celler, men de stressede cellene hadde numerisk høyere enzymaktivitet. Det er imidlertid en tendens til lavere SOD aktivitet i cellene dyrket i de laveste dosene FBH torsk-NH₄ og høyere nivå i cellene dyrket med de tre laveste dosene fosfor.



Figur 7 SOD aktivitet i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å inducere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄ er indikert.

3.2.3 Enzymaktivitet av glutathione peroksidase (GPX)

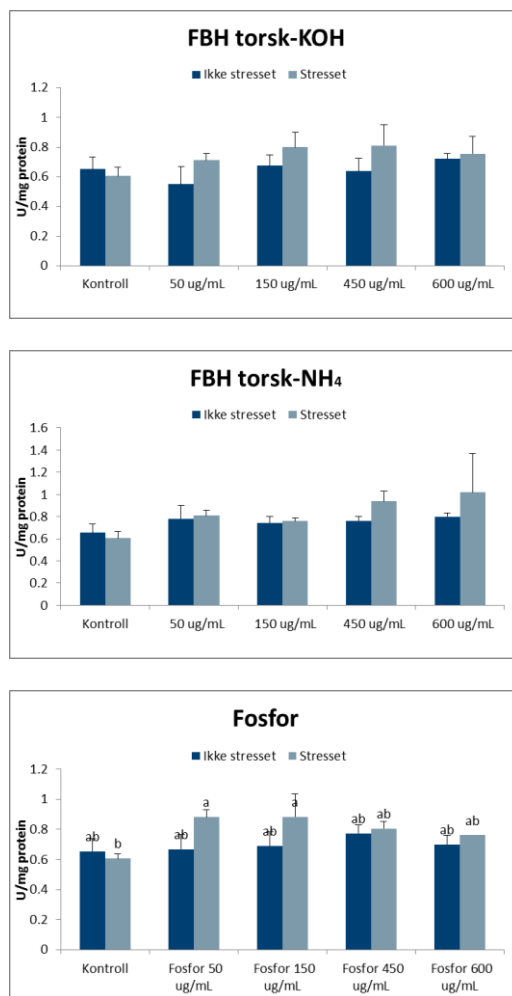
Det var ingen signifikante forskjeller i GPX aktivitet i cellene dyrket med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor (figur 8). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom stressede og ikke-stressede celler. Flere av FBH og fosfor behandlingene viste numerisk høyere aktivitet i stressede celler sammenliknet med ikke-stressede celler. Det var tendens til høyere GPX aktivitet i de stressede cellene dyrket med de høyeste dosene FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor sammenlignet med kontrollceller.



Figur 8 GPX aktivitet i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å indusere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄ er indikert.

3.2.4 Enzymaktivitet av katalase

Det var ingen signifikante forskjeller i katalase aktivitet i cellene dyrket med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄ (figur 9). Det var heller ingen signifikante forskjeller mellom stressede og ikke-stressede celler. Det var numerisk stort sett høyere aktivitet i stressede celler sammenliknet med ikke-stressede celler. Det var tendens til økt katalase aktivitet i cellene dyrket med FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor, spesielt i de stressede cellene. De to laveste nivåene av fosfor ga signifikant høyere katalase aktivitet i de stressede cellene sammenliknet med kontroll.

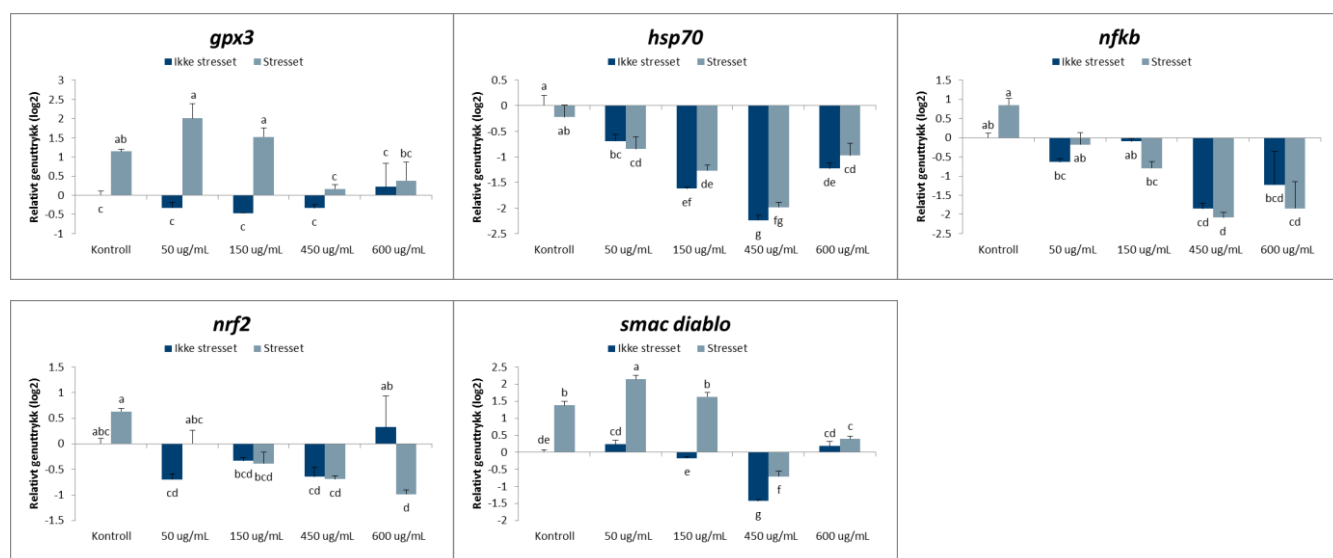


Figur 9 Katalaseaktivitet i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner av FBH torsk-KOH, FBH torsk-NH₄ og fosfor. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å indusere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄ er indikert.

3.2.5 Genuttrykk

FBH torsk-KOH

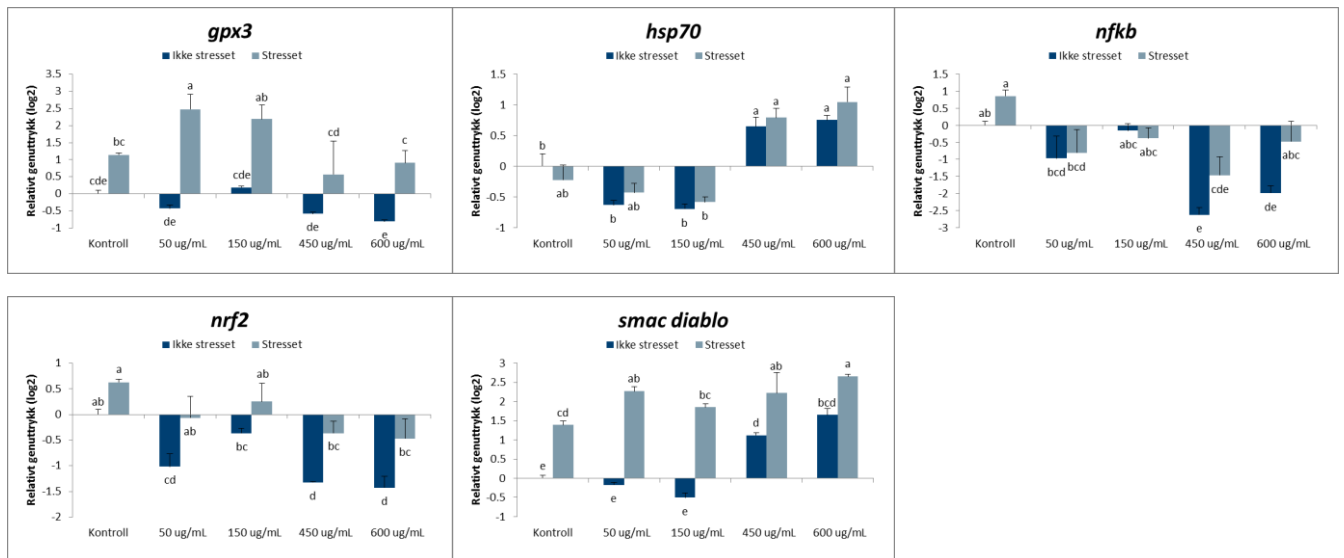
BSO induisert stress i kontrollceller ikke tilsatt FBH førte til økt uttrykk av gener involvert i apoptose (*smac/diablo*) og antioksidantforsvar (*gpx*) (figur 10). Celler tilsatt FBH gav en positiv effekt med nedregulering av uttrykk av stress genene (*hsp70*, *nfkB* og *nrf2*), og oppregulering av forsvarsgenet *gpx* (i stressede celler). De høyeste dosene av FBH torsk-KOH ga også en reduksjon i uttrykk av et apoptose relatert gen (*smac/diablo*). Sammenlignet med stressede celler viste ikke-stressede celler få signifikante forskjeller i uttrykk av gener i stressrespons, inflammasjon og apoptose (*gpx3*, *nfkB*, *nrf2* og *smac/diablo*).



Figur 10 Genuttrykk i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner FBH torsk-KOH. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å indusere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i FBH torsk-KOH er indikert. All genuttrykksdata er beregnet i forhold til kontroll ikke tilsatt stressor.

FBH torsk-NH₄

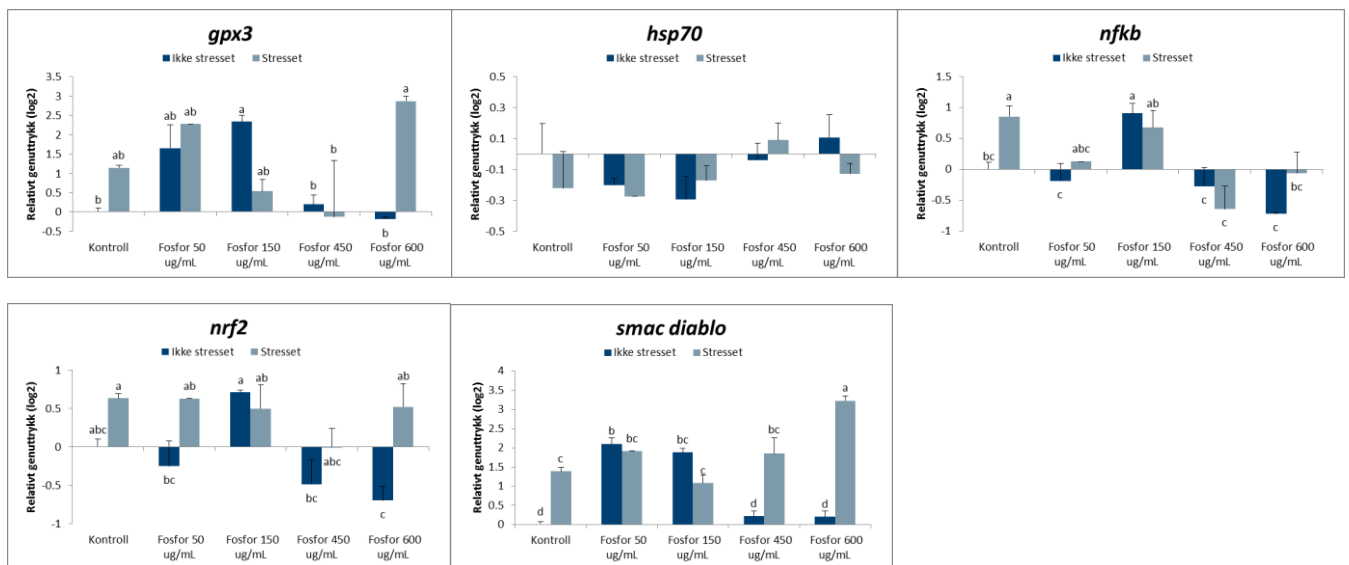
BSO induisert stress i kontrollceller ikke tilsatt FBH torsk-NH₄ førte til økt uttrykk et apoptose relatert gen (*smac/diablo*) (figur 11). Stressede celler tilsatt den laveste dosen FBH torsk-NH₄ viste økt nivå av gener involvert i apoptose og antioksidantforsvar (*gpx3* og *smac/diablo*) sammenliknet med kontrollcellene, mens inflammasjonsgenet *nfkB* ble nedregulert. De høyeste dosene av FBH torsk-NH₄ reduserte uttrykket av et stress gen (*nrf2*), mens uttrykket av apoptose gen *smac/diablo* økte i stressede celler, sammenliknet med kontrollceller. Ikke-stressede celler dyrket med FBH torsk-NH₄ viste ingen endring i uttrykket av antioksidant gen *gpx3*, mens de høyeste dosene FBH torsk-NH₄ ga økt uttrykk av stress og apoptose gener (*hsp70* og *smac/diablo*) og reduserte genuttrykk av inflammasjons og stress gener (*nfkB* og *nrf2*).



Figur 11 Genuttrykk i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner FBH torsk-NH₄. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å inducere en stressreaksjon. Dosen av fosfor i FBH torsk-NH₄ er indikert. All genuttrykksdata er beregnet i forhold til kontroll ikke tilsatt stressor.

Fosfor

BSO induisert stress i kontrollceller uten tilsatt fosfor førte til økt uttrykk apoptose og inflammasjons relaterte gener (*nfkb*, *smac/diablo*) (figur 12). Det er liten endring i genuttrykk av de målte genene i celler dyrket med økt nivå av fosfor sammenliknet med kontrollceller. Sammenliknet med kontrollceller viste stressede celler tilsatt høye doser fosfor økt uttrykk av et apoptose gen (*smac/diablo*; ved 600 ug/mL fosfor) og redusert uttrykk av et inflammasjonsgen (*nfkb* ved 450 ug/mL). Ikke-stressede celler tilsatt 150 ug/mL fosfor ga imidlertid økt uttrykk av gener for antioksidant forsvar, inflammasjon og apoptose (*gpx3*, *nfkb* og *smac/diablo*), sammenliknet med kontrollceller.



Figur 12 Genuttrykk i leverceller dyrket i 48 timer med ulike konsentrasjoner fosfor. Etter 24 timer ble halvparten av cellene tilsatt BSO for å inducere en stressreaksjon. All genuttrykksdata er beregnet i forhold til kontroll ikke tilsatt stressor.

4 Diskusjon

4.1 *In vitro* forsøk med FBH fra kolmule og sild, sulfat og sulfitt

FBH fra kolmule og sild så ut til å ha en positiv effekt på levercellene ved å nedregulere gener involvert i inflammasjon og apoptose (*nfkb*, *aif*), både i stressede og ikke-stressede celler. I tillegg ga alle doser av FBH kolmule oppregulering av *cpt1* og lave doser oppregulering av *aco*. *cpt1* og *aco* er sentrale gener i cellens energiomsetning da de inngår i hhv. mitokondriell og peroxisomal β -oksidasjon. FBH fra sild ga derimot ikke den forventede positive effekten på genene involvert i β -oksidasjon. Våre forsøk viste at de fleste dosene av både sulfat og sulfitt nedregulerte genuttrykk (blant annet β -oksidasjonsrelaterte genene) i stressede og ikke-stressede celler. Forskjellig effekt på β -oksidasjonsgenene mellom de ulike FBH fra sild og kolmule kan muligens skyldes at de inneholder ulikt nivå av sulfat og sulfitt. FBH fra kolmule så også ut til å gi lavere enzymaktivitet av de intracellulære antioksidantene GPX og SOD både i stressede og ikke-stressede celler, og av katalase i stressinduserte celler. FBH fra sild ga redusert GPX aktivitet, men viste liten effekt på SOD og katalase. Redusert aktivitet av de intracellulære antioksidant enzymene i stressede celler, når man normalt skulle forvente en oppregulering, kan muligens også her skyldes sulfatinnholdet i FBH og ikke fosforinnholdet. Våre forsøk viste at sulfat alene gir en tydelig hemming av SOD, GPX og katalase. SOD aktiviteten ble lite påvirket av sulfitt, mens GPX aktiviteten økte ved økende sulfitt konsentrasjon opp til et visst nivå. Størst effekt så sulfitt ut til å ha på katalase, hvor aktiviteten ble betydelig hemmet. Andre studier har også vist at sulfitt hemmer katalase i cellens antioksidant enzym forsvar (Chiarani et al., 2008). Inntak eller produksjon av sulfitt gjennom metabolisme av svovelholdig aminosyrer kan føre til celledød (cellulær toksisitet) (Oztürk et al., 2006). Ut i fra effekten på katalase aktivitet og GPX aktivitet ser ikke sulfitt ut til å være en aktiv komponent i FBH, men det tyder på at forskjeller i sulfatinnhold mellom FBH kan påvirke resultatene. Kolmulebein inneholder høyere konsentrasjon av aske enn sildebein og krever derfor mer H_2SO_4 for effektiv hydrolyse og frigjøring av P. Svovelsyren tilfører derfor mer sulfater til FBH kolmule enn til FBH sild, noe som kan forklare forskjell i effekt av de to ulike råstoffene.

4.2 *In vitro* forsøk med FBH torsk og fosfor

Tilsetning av BSO til cellene induserer oksidativt stress. Det er tre viktige intracellulære antioksidant enzymsystemer som kan beskytte cellene mot negative effekter av oksidativt stress; katalase, GPX og SOD. Våre resultater viser at oksidativt stress, induert av BSO, fører til en tendens til økt aktivitet av alle de tre beskyttelsesenzymene GPX, SOD og katalase. I stressede celler ser man en tendens til at begge FBH torsk øker aktiviteten av beskyttelsesenzymene katalase og GPX. I celler stresset med BSO ser man også at fosfor alene fører til stimulering av både GPX og katalase, noe som kan indikere at den positive effekten skyldes P i FBH. Vi ser derimot ikke en stimulering av den viktige antioksidanten SOD i celler tilsatt FBH. Tvert imot ser det ut til at FBH, spesielt FBH torsk- NH_4 , fører til en svak hemming av SOD i ikke-stressede celler, men at SOD aktiviteten opprettholdes (tilsvarende aktiviteten i kontrollcellene) i celler stresset med BSO. I motsetning til dette ser vi at tilsetning av fosfor alene fører til økt SOD aktivitet i både stressede og ikke-stressede celler. Dette resultatet kan tyde på at hemmingen av SOD aktiviteten med FBH torsk ikke skyldes P innholdet, men andre faktorer. Vi viste i det første celleforsøket at sulfatinnholdet i FBH kan påvirke aktiviteten av alle de tre enzymene SOD, GPX og katalase, men at den hemmende effekten tilsynelatende var kraftigst på SOD. Det at fosfor og P fra FBH gir forskjellige effekter på SOD aktivitet kan dermed muligens være

forårsaket av forskjellig sulfatnivå i ulike FBH. Resultatene viser relativt lik effekt av FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄, med unntak av effekten på SOD og genuttrykk av stressmarkøren *hsp70*. FBH torsk-KOH viste ikke samme reduksjon i SOD aktivitet som FBH torsk-NH₄, og FBH torsk-KOH ga tydeligere reduksjon i genuttrykk av *hsp70*. Forskjellen mellom de ulike FBH fra torsk er nøytraliseringsmidlet brukt under produksjon. KOH ble brukt til FBH torsk-KOH, mens FBH torsk-NH₄ ble produsert med NH₃-løsning. Kalium i KOH kan tenkes å stresse cellene mindre enn ammoniakk-N, og derfor fungere som et bedre nøytraliseringsmiddel enn NH₃-løsning, i hvert fall mht effekt på oksidasjonsforsvar. Det er vist at FBH kolmule nøytralisert med KOH gir best vekst (Albrektsen et al., 2013, 2014a) og signifikant høyere fordøyelighet av næringsstoffer (Albrektsen et al., 2013) i forsøk med laksesmolt. In vitro forsøk med leverceller har vist at FBH kolmule gir nedregulert *hsp70* genuttrykk og lite hemmende effekt på SOD aktivitet, mens in vitro forsøk med beinceller har gitt indikasjoner på moderat forsinket beinutvikling (Albrektsen et al., 2014b). Dette kan muligens forklares ut fra høyere SO₄ innhold i FBH kolmule, fordi dette råstoffet krever mer syre for effektiv hydrolyse av P.

Effekt av FBH (både FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₃) på uttrykk av genet *gpx* er i overensstemmelse med resultatet for enzymaktivitet av GPX. FBH førte til ingen effekt eller svak hemming på genuttrykk av *gpx*, mens i celler tilsatt BSO for å indusere oksidativt stress ga FBH økt uttrykk av *gpx*. Dette kan tyde på en fosfor effekt, da fosfor stimulerer genuttrykk i både stressede og ustressede celler. *Hsp70* er en generell stressmarkør. Våre resultater viser at begge FBH torsk og fosfor alene fører til lavere uttrykk av denne stressmarkøren, men vi ser en tydeligere effekt av FBH torsk-KOH enn av FBH torsk-NH₄ og fosfor alene (bare ved moderate doser). Dette kan indikere at P i FBH og P alene delvis beskytter cellene mot BSO indusert stress. Dette er også i overensstemmelse med økt GPX og katalase aktivitet i disse gruppene. Både FBH torsk-KOH og FBH torsk-NH₄ hemmer genuttrykk av den pro-inflammatoriske markøren *nfkb*, noe som kan tyde på at disse FBH kan ha en antiinflammatorisk effekt. Det er en litt mer usikker effekt av fosfor alene, men også her en tendens til antiinflammatorisk effekt. Apoptose markøren *smac/diablo* induseres i cellene stresset med BSO, men det er ingen tydelig effekt av FBH på disse markørene.

5 Konklusjon

FBH fra kolmule, sild og torsk så ut til å ha en positiv effekt på levercellene ved å nedregulere gener involvert i inflammasjon og apoptose (*nfkb*, *aif*), både i stressede og ikke-stressede celler. I tillegg gav FBH kolmule oppregulering av gener involvert i energiomsetningen. Tilsetning av FBH fra kolmule og sild til leverceller fra laks førte til redusert aktivitet av antioksidant enzymer, selv i celler induisert med oksidativt stress, noe som indikerer at disse FBH delvis kan hemme cellens forsvarsmekanisme mot oksidativt stress. I forsøkene med FBH torsk, og hvor cellene var tilsatt en kraftige kjemisk induser for oksidativt stress, så man tvert imot en positiv effekt av FBH med en oppregulering av forsvarsmekanismene. Nøytraliseringsmidlet brukt under produksjon av FBH kan se ut til å påvirke de undersøkte cellulære responsene. FBH torsk-KOH viste en tendens til bedre effekt på SOD enn FBH torsk-NH₄, og en tydeligere reduksjon i genuttrykk av stressmarkøren *hsp70*. Basert på dette kan nøytraliseringsmidlet KOH fungere bedre som nøytraliseringsmiddel, så lenge det ikke blir for høyt sulfat innhold samtidig. Forskjellig effekt med ulike FBH kan skyldes ulikt sulfatinnhold, da våre forsøk viste at sulfat i seg selv gir en tydelig hemming av SOD, GPX og katalase. Dette kan tyde på at man kan få ut en økt positiv helsegevinst av FBH dersom man sikrer at sulfatinnholdet i FBH stabiliseres på et lavt nivå. Ut fra effekten på katalase aktivitet og GPX aktivitet, ser ikke sulfitt ut til å være en aktiv komponent i FBH.

Forsøkene våre viste at de fleste positive effektene av FBH var av samme karakter som P alene, men både type nøytraliseringsmiddel og sulfat mengde tilført fra svovelsyre kan være faktorer som kan ha betydning for produksjonsresultat i laks. Videre arbeid med optimalisering av P fra fiskebein bør ha fokus på valg av riktig nøytraliseringsmiddel til fisk på ulike utviklingstrinn og optimal syremengde for å oppnå best mulig biologisk resultat.

6 Referanser

- Albrektsen, S., Thorsen, K. og Nygaard, H. (2010). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. First Marine Ingredients Conference, Holmenkollen Park Hotel, Oslo, 20-21 September. Poster presentation.
- Albrektsen, Sissel; Thorsen, Kaspar Høye; Bæverfjord, Grete; Nygaard, Halvor (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB), 2013. Poster.
- Albrektsen et al., (2014a). Nye marine ingredienser fra sildeavskjær som P kilde i fôr til lakseyngel (*Salmo salar* L.). Nofima rapport xxx, 50 sider.
- Albrektsen et al., (2014b). Utnyttelse av P fra sildeavskjær som alternativ P kilde i fôr til laksesmolt (*Salmo salar* L.) . Nofima rapport xxx, 50 sider.
- Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. (2012) Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chem.* Dec 15;135(4):3020-38.
- Chiarani F, Bavaresco CS, Dutra-Filho CS, Netto CA, Wyse AT. (2008) Sulfite increases lipoperoxidation and decreases the activity of catalase in brain of rats. *Metab Brain Dis.* Mar;23(1):123-32.
- Fitzgerald AJ, Rai PS, Marchbank T, Taylor GW, Ghosh S, Ritz BW, Playford RJ. (2005) Reparative properties of a commercial fish protein hydrolysate preparation. *Gut.* 2005 Jun;54(6):775-81.
- Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J. Biol. Chem.*, 257, 13704–13712.
- Grimmer S, Vogt G, Østbye T-K, Ruyter B, Haugen J-E. (2013) Ferske oljer "Dokumentasjon av effekt av oljekvalitet/ferskhet på biologiske systemer". FHF rapport 33/2013.
- Kannan K, Jain SK. (2000) Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology.* Sep;7(3):153-163.
- Kjaer MA, Todorčević M, Torstensen BE, Vegusdal A, Ruyter B. Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon. *Lipids.* 2008 Sep;43(9):813-27. doi: 10.1007/s11745-008-3208-z. Epub 2008 Jul 10.
- Oztürk OH, Küçükataş V, Yönden Z, Ağar A, Bağcı H, Delibaş N. (2006). Expressions of N-methyl-D-aspartate receptors NR2A and NR2B subunit proteins in normal and sulfite-oxidase deficient rat's hippocampus: effect of exogenous sulfite ingestion. *Arch Toxicol.* Oct;80(10):671-9.
- Suarez-Jimenez GM, Burgos-Hernandez A, Ezquerro-Brauer JM. (2012) Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Mar Drugs.* 2012 May;10(5):963-86. doi: 10.3390/md10050963. Epub 2012 Apr 26. Review.
- Todorčević M, Kjaer MA, Djaković N, Vegusdal A, Torstensen BE, Ruyter B. N-3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2009 Feb;152(2):135-43. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.10.009. Epub 2008 Nov 5.
- Østbye T-K, Kjaer MA, Rørå AMB, Torstensen B, Ruyter B. (2011) High n-3 HUFA levels in the diet of Atlantic salmon affect muscle and mitochondrial membrane lipids and their susceptibility to oxidative stress. *Aquaculture Nutrition*, 17, 177-190



ISBN 978-82-8296-167-7 (printed)
ISBN 978-82-8296-168-4 (pdf)
ISSN 1890-579X