

Lagringsstabilitet av et utvalg marine oljer

Effekt av oljekvalitet på cellulære responser – Fase 2

Stine Grimmer, Gjermund Vogt, Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter og John-Erik Haugen





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
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
NO-5141 Fyllingsdalen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

Faks: 64 97 03 33

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Lagringsstabilitet av et utvalg marine oljer Effekt av oljekvalitet på cellulære responser – Fase 2</p>	ISBN: 978-82-8296-108-0 (trykt) ISBN: 978-82-8296-109-7 (pdf) ISSN 1890-579X
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Stine Grimmer, Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter, Gjermund Vogt og John-Erik Haugen</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 33/2013</p>
<p><i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi; Mat og helse</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond – FHF</p>	<p><i>Dato:</i> 25. juni 2013</p>
<p><i>Stikkord:</i></p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 36</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Se neste side</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900552</p> <p><i>Prosjektnr.:</i> 20858</p>

Sammendrag

Kartlegging av oksidasjonsforløp i et utvalg oljer ved bruk av flere ulike analysemetoder

I løpet av høsten 2011 ble det samlet inn en rekke ulike marine råoljer og raffinerte oljer fra forskjellige leverandører. Forsøket har hatt som mål å studere betydningen av oksidasjonsgrad ved startpunktet ("fersk olje") og videre utvikling av oksidasjonsforløpet gjennom 9 mnd i både raffinerte oljer og råoljer. Det har vært gjennomført et lagringsforsøk med oljene ved henholdsvis 4°C og 20°C i 9 måneder. Det ble tatt prøver av oljene ved start, 4 mnd, 7 mnd og 9 mnd. Oksidasjonsgrad av oljene ble bestemt ved bruk av flere forskjellige analysemetoder. Utførte analyser er peroksidtall og anisidintall i henhold til AOCS offisielle metoder Cd 8-53 og Cd 18-90, TBARS, flyktige oksidasjonsprodukter vha dynamisk Headspace GCMS, samt ny kromatografiske metoder for bestemmelse av sekundære oksidasjonsprodukter som kortkjedede aldehyder og hydroksyalkener.

Lagring av oljer ved 4°C førte ikke til endringer i oksidasjonsstatus av oljer i løpet av 9 mnd lagringsstudium.

Det ble funnet forskjeller mellom oljene med hensyn til oksidasjon under lagring ved 20°C. Resultatene gjenspeiler ulik oksidasjonskemi og forløp i de ulike typer olje pga ulik fettsyre- og kjemisk sammensetning, som igjen antagelig bidrar til ulik avspaltning og dannelsen av flyktige sekundære oksidasjonskomponenter (aldehyder). Det er hovedsakelig innholdet av 1-Penten-3-ol som samsvarer med PV og AV verdiene mens innholdet av flyktige aldehyder i stor grad ikke samsvarer. Det er de flyktige aldehydene som gir opphav til den harske smaken i oljene ved oksidering, og ved økt oksidering får man dannet økt mengde flyktige diumettede aldehyder. Spesielt peker konsentrat #2 med lavt innhold av antioksidant seg ut, sammen med rå torskelever olje. 1-penten-3-ol og 2,4 heptadienal gir en god forklaring på oksidasjonsforløpet på oljene. Nyutviklet Dråpemetode for analyse av flyktige aldehyder viser god korrelasjon med konvensjonell HS-GC-MS analyse. Metode for måling av hydroksy-alkener er for tiden under validering.

Effekt av oljekvalitet på cellemodeller

Sammendrag av resultater fra studier med primærceller fra laks

Det er gjennomført et studium med primære leverceller fra laks inkubert med en lakseolje lagret ved 20°C fra henholdsvis startpunkt ("fersk olje"), 4, 7 og 9 mnd. Nivået av primære og sekundære oksidasjonsprodukter ble bestemt i oljen ved de ulike lagringstidspunkt før inkubasjonene med celler. Fersk olje ved start hadde meget lave nivå av oksidasjonskomponenter. Det var en jevn stigning i primære og sekundære oksidasjonskomponenter over tid gjennom 9 mnd lagring. Ved 9 mnd var fortsatt TOTOX verdien under 20 og dermed godkjent for humant konsum i henhold til Europeisk farmakopø. Under lagring av oljen, var den mest markante endringen økt nivå av den sekundære oksidasjonskomponenten 1-penten-3-ol. Vi har ikke klart å finne dokumentert kunnskap om hvorvidt dette molekylet kan ha potensielle helseeffekter i dyr og menneske da toksisiteten i for molekylet ikke er spesielt nevnt i litteraturen. Vi har for øvrig, i dette prosjektet, gjennomført en studie hvor multivariatanalyse viste en signifikant sammenheng mellom flyktige oksidasjonsprodukter og respons på utvalgte helsemarkører i celler ($r > 0.9$). 1-penten-3-ol var et av de sekundære oksidasjonsproduktene som sterkest korrelerte med helsemarkørene.

I dette oppfølgingsprosjektet ønsket vi derfor å sammenligne responsen i celler, etter behandling med oljer av ulik oksidasjonsgrad, med responsen i celler tilsatt rent produkt av 1-penten-3-ol. Det

rene produktet ble tilsatt i samme konsentrasjonsspenn som nivået av 1-penten-3-ol i forsøksoljen. Våre resultater tyder på at både olje med økende oksidasjonsgrad og 1-penten-3-ol alene i økende konsentrasjon gir noen av de samme responsene i leverceller fra laks. Økende nivå av begge behandlinger ser ut til å gi en moderat økning av lipidperoksidering i cellemembraner, økt aktivitet av de intracellulære beskyttelses enzymer, antioksidantene superoksid dismutase (SOD), glutation peroksidase () og Katalase. Ved oksidativt stress vil transkripsjonsfaktoren nrf2 initiere transkripsjon av gener som koder for intracellulære antioksidanter. Både økende oksidasjonsgrad av olje og økende nivå av 1-penten-3-ol gav signifikant høyere genuttrykk av nrf2 og gpx3. Nrf2-er også viktig når det gjelder å beskytte mitokondriene mot oksidativt stress (Zhang et al., 2013). Fersk olje så ut til å gi lavere stressrespons i celler enn kontroll som ikke var tilsatt olje, noe som kan tyde på en positiv effekt av tilsetning av en omega-3 rik olje. Mitokondriemembranen er spesielt følsom for eventuelle oksidasjonsskader, men de ulike behandlingene forårsaket ingen signifikante endringer i mitokondrieintegritet. Celler tilsatt oljen med lavest oksidasjonsgrad (fersk olje), gav det laveste genuttrykk av mitokondrielt fission protein (fis 1), noe som kan skyldes at en god fiskeolje rik på omega-3, beskytter mitokondriene mot skade. Dette er i overensstemmelse med et tidligere funn hvor omega-3 fettsyrer beskyttet mitokondriene mot LPS induisert skade (Jørgensen et al., 2012).

Resultatene viste ingen signifikante effekter på genuttrykk av faktorer involvert i apoptose (celledød, aif) og betennelse (nfkB), noe som kan tyde på at nivåene av oksidasjonsprodukter i de ulike gruppene er såpass moderate at cellenes eget beskyttelses system med aktivering av intracellulære antioksidanter beskytter cellene mot alvorlige negative effekter av oksidasjonsproduktene.

Sammendrag av resultater fra studier med humane THP-1 makrofager

De marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA har vist å ha en hemmende effekt på inflammasjonsresponsen (Calder, 2010), men lite er kjent om en økt oksidasjonsgrad kan påvirke denne effekten. Vi testet derfor responsen av et utvalg av oljene (råolje fra laks, raffinert olje fra laks og 18/12 olje) med økende grad av oksidering på sekresjonen av de pro-inflammatoriske cytokinene IL-6 og IL-8 fra humane THP-1 makrofager med og uten LPS stimulering. Tilsetning av LPS gir en simulering av økt inflammasjonsrespons, med en resulterende økt sekresjon av IL-6 og IL-8 fra makrofagene. Cytokinene IL-6 og IL-8 er signalmolekyler som spiller viktige roller i inflammasjonsprosessen, og endringer i nivået av disse kan dermed fungere som et mål på grad av inflammasjon. Økt oksidasjonsgrad i raffinert olje fra laks ga en signifikant nedgang i basalsekresjonen av IL-8 fra makrofagene. Tilsvarende tendens på IL-8 sekresjonen ble også sett med økende oksidasjonsgrad i de andre oljene. Alle oljene testet viste også en tendens til at økende oksidasjonsgrad gir først en økt basalsekresjon av IL-6 etterfulgt av en nedgang. De tre oljene som ble testet på THP-1 makrofagene skiller seg fra hverandre med ulik PV/AV profil, ulik innhold av sekundære oksidasjonsprodukter og ulik fettsyresammensetning. Årsaken til at de ulike oljene gir samme tendensen i cytokinrespons som følge av økende oksidasjonsgrad er derfor ikke opplagt.

Innhold

1	Generell bakgrunn	1
1.1	Oksidativ stabilitet av marine oljer ved lagring	1
1.1.1	Valg av analysemetoder	2
1.2	Testing av utvalgte oljer på etablerte biomarkører og celledsystemer	2
2	Metoder	6
2.1	Metoder for holdbarhetsutvikling	6
2.1.1	Innsamling av oljer og holdbarhetsutvikling	6
2.1.2	Peroksidverdi	6
2.1.3	Anisidinverdi	7
2.1.4	TOTOX-verdi	7
2.1.5	Analyse av flyktige oksidasjonsprodukter	7
2.1.6	Selektiv analyse av flyktige aldehyder "Dråpemetoden"	8
2.1.7	Analyse av hydroksey-alkenaler	8
2.2	Analyse av miljøgifter	8
2.3	Metoder for cellemodellsystemer	8
2.3.1	Isolasjon og dyrkning av hepatocytter	8
2.3.2	Tillaging av oljesubstrater	9
2.3.3	Fettsyresammensetning	9
2.3.4	Superoxide dismutase	9
2.3.5	Glutathione peroksidase	9
2.3.6	Cytochrome C oxidase	10
2.3.7	Katalase	10
2.3.8	Bestemmelse av thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	10
2.3.9	Lipidperoksidering (DPPP)	10
2.3.10	Kvantitativ real-time PCR	10
2.3.11	Dyrking og differensiering av human monocyttcellelinje (THP-1)	10
2.3.12	Sekresjon av IL-6 og IL-8 fra THP-1 makrofager (humane immunceller)	11
3	Resultat og diskusjon	12
3.1	Holdbarhetsutvikling	12
3.1.1	PV, AV og TOTOX	12
3.1.2	Innhold av flyktige sekundære oksidasjonsprodukter	14
3.1.3	Dråpemetoden	18
3.1.4	Hydroksey-alkenaler	20
3.2	Innhold av miljøgifter (analysert av NIFES)	21
3.3	Effekt av oksidasjonsgrad i olje og 1-penten-3-ol på helsemarkører i primærceller fra lakselever (hepatocytter)	23
3.3.1	Peroksidering av membranlipider	23
3.3.2	Genuttrykksanalyse	24
3.3.3	Cytochrome c oxidase	25
3.3.4	Katalase	26
3.3.5	SOD	27
3.3.6	GPX	28
3.3.7	TBARS	29

3.4	Effekt av oksidasjonsgrad i et utvalg oljer på inflammasjonsresponsen til THP-1 makrofager	31
4	Avsluttende kommentarer og fremtidige perspektiver	34
5	Referanser	35

1 Generell bakgrunn

Omega-3-markedet har opplevd en sterk vekst de siste årene. Norske leverandører er blant verdens ledende leverandører av fiskeoljer til markedet for kosttilskudd og funksjonell mat (functional food) internasjonalt. Pronova Biopharma har i tillegg hatt en fantastisk utvikling for sitt høykonsentrerte omega-3 legemiddel.

Oljer utvunnet fra ferskt råstoff regnes for å være mer stabile mot oksidasjon enn oljer utvunnet fra råstoff som krever lengre tid fra fangst og til oljeproduksjon. Dagens standard analysemetoder som peroksidtall og anisidintall er muligens ikke gode nok til å beskrive oljekvaliteten. Dersom det er mulig å utvikle nye analyseparametere, standarder og dokumentasjon på realistisk oksidasjonsgrad og effekt på cellystemer, vil det åpne opp nye kvalitetsnormer for bestemmelse av oljekvalitet med hensyn på humankvalitet. For å kunne verifisere hvorvidt mindre oksiderte oljer har helsefortrinn fremfor andre oljer på markedet er det helt nødvendig å gjennomføre komparative studier med ulike oljetyper/kvaliteter for å kartlegge eventuelle positive og negative helseeffekter.

1.1 Oksidativ stabilitet av marine oljer ved lagring

Screeningstudiet (Ruyter et al., 2010) avdekket hvilke utfordringer verdikjeden for Omega-3 ingredienser har med hensyn til å bremse oksidasjonsutviklingen frem til forbruker. Basert på oksidasjonsgraden på de 56 produktene i studien som lot seg analysere, var det bare 4 produkter som tilfredstilte GOED sin egen monografi. Det behøver nødvendigvis ikke være noen direkte sammenheng mellom oksidasjonsgraden observert/analysert og kvaliteten på oljen ut fra produsent. Dessuten ble det kun testet en variant av hver type som var kjøpt over disk og er således ikke direkte representativ for produktet. Dersom produktene ikke har hatt en optimal logistikk med hensyn på videre prosessering (inkl. antioksidantregime), emballasje/lagring og temperaturforløp, kan selv det beste utgangspunkt raskt bli ødelagt.

Ved oksidasjon av flerumettede fettsyrer dannes et stort antall hydroperoksider som lett dekomponeres og derfor er vanskelige å analysere kvantitativt. Spesielt gjelder dette oljer som er en del av en mer kompleks matris. NMR-studier av oksidasjon av blant annet EPA og DHA (i termisk behandlet laks) viser større tendenser til oksidasjon av de ytterste dobbeltbindingene, og liten skade på de i midten av kjeden. Lipidhydroperoksider er stabile ved gunstige betingelser som lav temperatur og ingen katalysatorer til stede. I realiteten er imidlertid forholdene vanligvis ikke så gunstige. Dermed vil hydroperoksidene dekomponere via kompliserte reaksjonsveier til en kompleks blanding av blant annet monomere, dimere, polymere samt lavmolekylære og flyktige oksidasjonsprodukter. Det er de flyktige oksidasjonsproduktene som er årsak til uønsket smak og lukt i fiskeoljer. En fiskeolje av høy kvalitet smaker egentlig ingen ting eller svært lite og en kan vanskelig skjelve smaken fra en vanlig matolje. Imidlertid vil oljen før eller siden utvikle en uønsket smak på grunn av oksidasjon, dersom den ikke er behandlet og stabilisert riktig. Utviklingene av oksidasjon i oljene vil komme uansett ved vanlig lagring (kjøl, kapsulert, på flaske etc). Dette er smaken vi oppfatter som harsk, eller "fiskeoljesmak". Jo mer oksidert oljen er, dess mer fremtredende blir smaken. Det finnes ingen klar definisjon av hva som er en "harsk" fiskeolje utover peroksidtall og anisidintall slik det er nevnt i monografier. Imidlertid sier en generelt for næringsmidler at når et produkt har fått en ubehagelig smak og lukt på grunn av oksidasjon regnes den for harsk og konsumenten har blitt mer fokusert på kvalitetsoljer uavhengig av Omega-3 innhold.

Et av hovedmålene i dette prosjektet har vært å undersøke om det er forskjeller knyttet til oksidasjonsutvikling mellom oljer basert på ferskt råstoff og oljer med lang logistikk (tilgang på luft, lys og temperatur over tid), og hvor de initielle oksidasjonsprosesser har kommet lengre.

1.1.1 Valg av analysemetoder

Det er en mengde ulike metoder tilgjengelig for måling av lipidoksidasjon, både offisielle og uoffisielle. Tilgjengelige metoder for måling av oksidasjon deles som oftest i to hovedgrupper, avhengig av om det er primære eller sekundære oksidasjonsprodukter som skal måles. Primære oksidasjonsprodukter som vi måler med PV er uten farge, smak og lukt, mens enkelte sekundære oksidasjonsprodukter, spesielt flyktige aldehyder som vi måler ved blant annet AV, er luktintense (Olsen et al., 2005) og bidrar til begrepet harsk smak. For sekundære oksidasjonsprodukter skilles det noen ganger mellom flyktige og ikke-flyktige oksidasjonsprodukter. Mens flyktige sekundære oksidasjonsprodukter stort sett er lavmolekylære aldehyder, er ikke-flyktige oksidasjonsprodukter en mer sammensatt gruppe molekyler inbefattet oligomere, trimere etc. I handel av omega-3-oljer sertifiseres oljene med peroksidtall og anisidintall, (EuPharm, 2008; RUBIN, 2009). The American Oil Chemists' Society (AOCS) har angitt måling av PV og AV som offisielle målemetoder i kommersielt fett og oljer (AOCS, 1990a; AOCS, 1990b). Det finnes imidlertid en rekke andre metoder som kan gi et meget godt bilde av oksidasjonsstatusen til fiskeoljer. Slike metoder er nevnt i tidligere rapporter fra Rubin. Imidlertid antas det at den beste metoden for måling av oksidasjon er et godt fungerende sensorisk panel med trenede dommere.

I screeningstudiet (Ruyter et al., 2010) ble det lagt vekt på å benytte standard metoder som brukes for å teste oljer i henhold til farmakopøer og monografer. Mer kvantitativ bestemmelse av peroksider og sekundære/tertiære oksidasjonsprodukter må til, som for eksempel kromatografi knyttet til massespektrometriske detektorer (Headspace GCMS og LCMS). I tillegg må det utarbeides hurtige metoder som er robuste og kan fungere på en bred variasjon av produkter.

I dette prosjektet er det et mål å benytte en kombinasjon av klassiske metoder (PV, AV) i tillegg til aktuelle nye metoder som er under utvikling i Nofima eller som er utviklet av andre FoU-miljø. Nofima har et internt prosjekt, nettopp knyttet opp mot problemstillingen og det vil være store synergieffekter mot dette prosjektet. Videre vil en måle kvantitativt på nedbrytningsprodukter fra fettsyrer i cellevegg ved måling av hydroksyalkanaler.

1.2 Testing av utvalgte oljer på etablerte biomarkører og celledsystemer

Fiskeoljer er spesielt rike på de lange n-3 fettsyrene, noe som gjør de spesielt utsatt for oksidasjon. Siden det de siste årene vært knyttet stor interesse rundt bruk av fiskeoljer for å motvirke en rekke sykdommer, er det imidlertid viktig å være klar over at inntak av relativt høye doser omega-3 fiskeoljer av ulik kvalitet /harskningsgrad over lengre tid kan føre til at man overser potensielt negative effekter. I en oversiktsartikkel av Turner et al., 2006, diskuteres det hvorvidt positive helseeffekter av fiskeoljer begrenses av oksidasjonsprodukter.

Det har også rettet et stort fokus på eventuell sammenheng mellom oksidativt stress og utvikling av sykdom, men de fleste studier hittil har fokusert på oksidasjonsprodukter som dannes i kroppen (Blomhoff, 2004). Få studier har studert effekten ved inntak av oksiderte oljer gjennom kostholdet (Ottestad et al., 2012). Esterbauer (Esterbauer et al., 1992) konkluderte med at tungt oksiderte oljer,

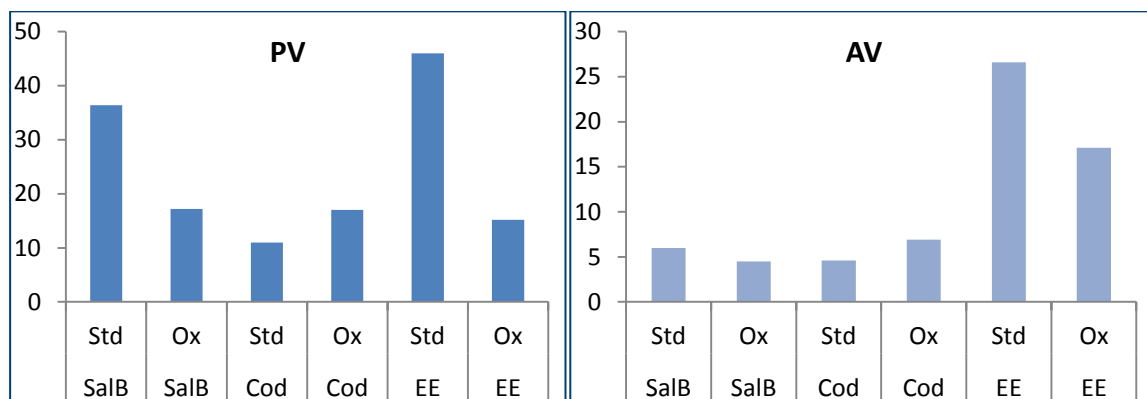
gitt oralt, ikke er akutt giftig for mennesker. Studien konkluderte videre med at di-og polymere-oksidasjonsprodukter i liten grad absorberes i tarmkanalen. De blir også i stor grad avgiftet til mindre toksiske alkoholer vha glutathion avhengige enzymer (Márquez-Ruiz et al., 2008). Det er for øvrig vist at lav-molekylære aldehyder kan absorberes i tarmen, noe som potensielt kan forårsake helseskader i menneske (EFSA, 2010; Esterbauer et al., 1992).

I VKM rapport 2012 og EFSA rapport 2010 (EFSA, 2010; VKM, 2011), konkluderes det med at det er behov for mer kunnskap om de helsemessige effektene av oksidasjonsprodukter som stammer fra marine oljer.

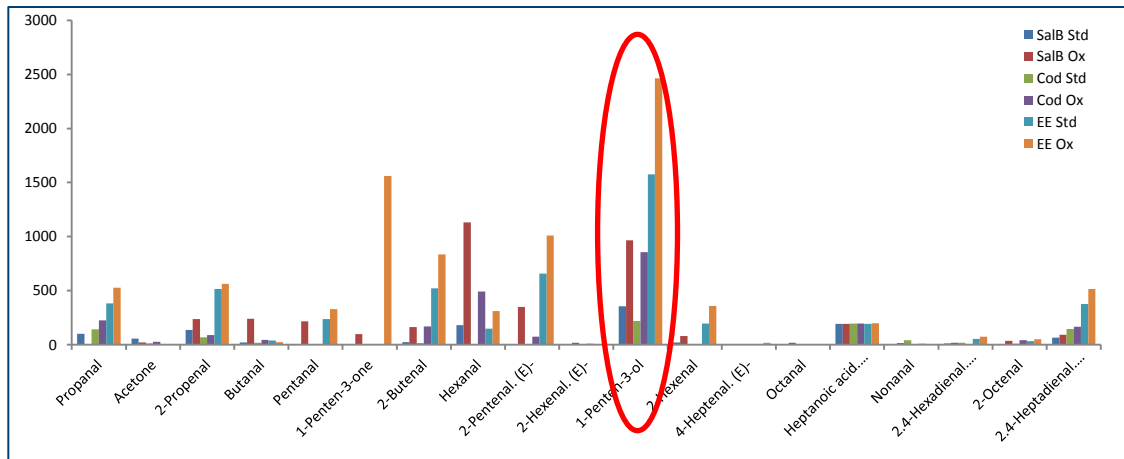
Et av målene i dette prosjektet har vært å undersøke om oljer med ulik oksidasjonsgrad og det sekundære oksidasjonsproduktet 1-penten-3-ol påvirker oksidativ stress respons og inflammasjonsrespons i cellemodeller.

Bakgrunn for studier med leverceller fra laks:

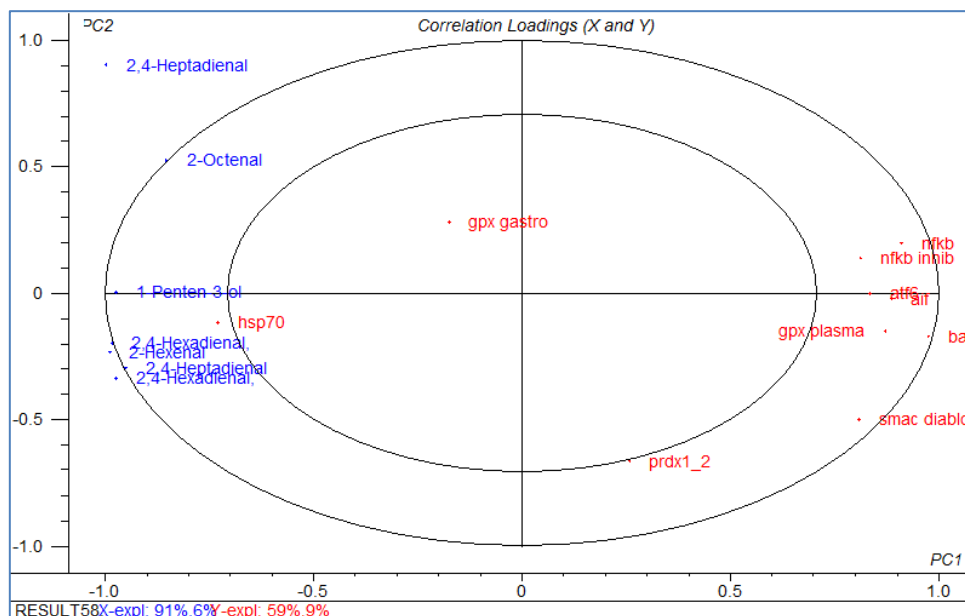
Tidligere i dette prosjektet har vi studert hvordan oljer med ulik oksidasjonsgrad påvirker utvalgte cellulære stress responser. Figur 1 viser AV og PV i forsøks oljene. Figur 2 viser nivå av flyktige harskningskomponenter (sekundære oksidasjonsprodukter) i oljene benyttet i celleforsøk. Lakseleverceller dyrket i medium tilsatt oljer med ulik oksidasjonsstatus, ble analysert for effekter på en rekke helsemarkører, inkludert intracellulære antioksidanter, og markører for stress, inflammasjon og celledød. Multivariatanalyse av resultatene viste en signifikant sammenheng mellom flyktige oksidasjonsprodukter og respons på utvalgte helsemarkører i cellene ($r > 0.9$). 1-penten-3-ol var et av de sekundære oksidasjonsproduktene som sterkest korrelerte med helsemarkørene. Det var ingen sammenheng mellom AV og PV og biologisk respons oksidasjonsgrad av oljer.



Figur 1 AV og PV verdier i et utvalg oljer benyttet i celleforsøk



Figur 2 Nivå av flyktige sekundære oksidasjonsprodukter i ulike forsøksoljer



Figur 3 Hepatocytter ble inkubert med fiskeolje (miceller) med ulik harskningsgrad i 48 timer. Multivariat analysen i figuren indikerer en sannsynlig sammenheng mellom nivået av de sekundære oksidasjonsproduktene 1-Penten-3-ol, 2,4 hexadienal, 2 heksanal og uttrykk av flere av stress respons. Disse foreløpige funnene må bekreftes med videre studier

I dette oppfølgingsprosjektet er et av hovedmålene å sammenligne responsen i celler etter behandling med oljer av ulik oksidasjonsgrad med responsen i celler tilsatt rent produkt av 1-penten-3-ol. Det rene produktet vil bli tilsatt i samme konsentrasjonsspenn som nivået av 1-penten-3-ol i lakseoljen

Bakgrunn for studien med humane celler

Humane cellelinjer som benyttes til forskning har stort sett blitt isolert fra ulike typer kreftsvulster. De kjennetegnes dermed ved at de kan dyrkes over en lengre tidsperiode i motsetning til primærceller isolert fra levende vev som kun kan holdes i live en kort stund etter at de er isolert ut.

Humane cellelinjer er derfor et enkelt modellsystem å holde gående, men ulempen er at de cellulære systemene kan på visse områder være forskjellige fra normale celler. I en tidligere studie har vi studert effekten av oljer med økende oksidasjonsgrad på biomarkører for oksidasjon i en human kreftcellelinje fra lever (HepG2). Resultatene antydte at de cellulære oksidasjonsprosessene i HepG2 var oppjustert som følge av kreftfenotypen, og dermed ga et upresist bilde av effekter av oksiderte oljer på biomarkørene for oksidasjon. Vi valgte derfor i dette prosjektet å ikke sammenligne resultatene fra primære leverceller fra laks med den humane kreftlevercellelinjen HepG2. I stedet for valgte vi å studere effekten av et utvalg av oljene fra holdbarhetsstudien på inflammasjonsrespons. De marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA har vist å ha en hemmende effekt på inflammasjonsresponsen (Calder, 2010), men lite er kjent om en økt oksidasjonsgrad kan påvirke denne effekten. Vi testet derfor responsen av et utvalg av oljene med økende grad av oksidering på sekresjonen av de pro-inflammatoriske cytokinene IL-6 og IL-8 fra humane THP-1 makrofager med og uten LPS stimulering. Tilsetning av LPS gir en simulering av økt inflammasjonsrespons, med en resulterende økt sekresjon av IL-6 og IL-8 fra makrofagene. Cytokinene IL-6 og IL-8 er signalmolekyler som spiller viktige roller i inflammasjonsprosessen, og endringer i nivået av disse kan dermed fungere som et mål på grad av inflammasjon.

2 Metoder

2.1 Metoder for holdbarhetsutvikling

2.1.1 Innsamling av oljer og holdbarhetsutvikling

Gjennom høsten 2011 ble det samlet inn en rekke ulike typer raffinerte oljer og råoljer (Tabell 1).

Tabell 1 Oversikt over de ulike oljene samlet inn til holdbarhetsstudiet og gitt benevning

Benevning	Type olje
Raffinert torsk vill	Raffinert olje fra villtorsklever
Raffinert torsk oppdrett	Raffinert olje fra oppdrettstorsklever
Rå laks # 1	Råolje fra laks fra produsent 1
Rå laks # 2	Råolje fra laks fra produsent 2
Rå torsk etter bleking	Råolje fra torsklever etter bleking
Rå torsk før bleking	Råolje fra torsklever før bleking
Raffinert laks	Raffinert olje fra laks fra samme produsent som Rå laks #1
Konsentrat #1	Omega-3 konsentrat fra produsent 1
Konsentrat #2	Omega-3 konsentrat fra produsent 2
Konsentrat #3	Omega-3 konsentrat fra produsent 3

Oljene ble lagret mørkt ved henholdsvis 4 og 20 grader med jevn tilgang til oksygen (løse korker). Det ble tatt ut prøver ved oppstart av holdbarhetsstudiet (november 2011) og ca hver tredje måned fram til avslutning i august 2012. Disse prøvene ble oppbevart fryst ved minus 80 grader under nitrogenatmosfære fram til analyse.

2.1.2 Peroksidverdi

Nivået av hydroperoksider kan fastslås ved å måle PV, som er en av de eldste og mest benyttede metodene for vurdering av oksidativ status i oljer (EuPharm, 2008; Frankel, 2005; GOED, 2006). For fett og oljer fastsettes oftest PV ved bruk av en jodometrisk metode. Metoden baseres på at hydroperoksidgrupper reduseres av jodioner (I^-). Mengden jod (I_2) som frigjøres er proporsjonal med konsentrasjonen av peroksider til stede i oljen. Frigjort I_2 måles ved titrering mot en standardløsning av natriumthiosulfat ved bruk av en stivelsesløsning som indikator. PV uttrykkes som milliekvivalenter jod per kg av lipider¹ (Frankel, 2005; Shahidi and Wanasundara, 1998). Metoden har normalt en sensitivitet på 0,5 meq/kg (Frankel, 2005). Målemetoden blir utført i henhold til *AOCS Official Method Cd 8-53* på 24 omega-3-produkter. For omega-3-produkter som har lavt peroksidtall blir 0,01 N natriumthiosulfat benyttet i stedet for 0,1N og kun 2,5 gram olje innveies i stedet for 5,0 gram.

¹ PV kan også uttrykkes som millimol hydroperoksider per kg lipider. Dette gjøres ved å multiplisere PV uttrykt som meq jod/kg med 2 (Frankel, 2005)

2.1.3 Anisidinverdi

Måling av AV gir et uspesifikt estimat av innhold av sekundære oksidasjonsprodukter, hovedsakelig i form av aldehyder som følge av nedbrytning av hydroperoksider. Måling av AV ved spektrofotometri er en vanlig metode for å anslå nivå av sekundære oksidasjonsprodukter i marint, animalsk og vegetabilsk fett og oljer. Aldehyder i oljen reagerer med para-anisidin i en eddiksyre/isooktanløsning. Nivået av reaksjonsprodukter fastslås deretter spektrofotometrisk ved 350 nanometers (nm) bølgelengde (Allen and Hamilton, 1994; Shahidi and Wanasundara, 1998). AV er definert som 100 ganger absorbanse i en løsning hvor ett gram fett eller olje er løst i 100 ml blanding av løsemiddel og para-anisidin, avlest ved 350 nm bølgelengde i en 1 cm celle (Allen and Hamilton, 1994; AOCS, 1990a). Det er aldehydene 2-alkenaler og 2,4-dienaler som primært har blitt antatt å utgjøre de største utslagene på AV (AOCS, 1990a). Senere studier har likevel vist at det kan være at metoden ikke er så spesifikk i hvilke sekundære oksidasjonsprodukter den måler (Frankel, 2005; Olsen et al., 2005). Anisidintall har ingen benevnning.

Fargeintensiteten på reaksjonsproduktet som dannes avhenger ikke kun av mengde aldehydkomponenter, men også av deres struktur. Para-anisidin måler både mettede og umettede aldehyder (Allen and Hamilton, 1994) men siden den reagerer på karbonylgrupper vil den også reagerer mer eller mindre spesifikt på andre karbonyler som for eksempel esterbindinger (Vogt, pers meddelse) Terpener som en finner i for eksempel sitronsmak ser også ut til å ha samme effekt. Dette gjør at i enkelte prøver kan anisidintall overestimeres. I andre typer oljer på markedet kan man for eksempel få en underestimering. Eksempel på det er krillolje. Para-anisidin ble renset i henhold til AOCS Official Method Cd 18-90 (AOCS, 1990a). Metoden er gjennomført i henhold til AOCS Official Method Cd 18-90. Samtlige produkter er analysert ved bruk av metoden. Anisidintall er en velkjent metode hos alle fiskeoljeprodusenter og inngår som en av analysemetodene i monografiene.

2.1.4 TOTOX-verdi

Fordi PV i en olje endres over tid, og fordi AV øker som følge av at hydroperoksider brytes ned, vil oksidasjonskvaliteten på en olje best beskrives ved å se disse to verdiene i sammenheng med hverandre. I industrien gjøres dette ofte ved å beregne den totale oksidasjonsverdien, TOTOX-verdien. TOTOX-verdien kombinerer dermed historien til en olje (gjenspeilet i AV) med dens nåværende tilstand (ved PV). Derfor har beregning av TOTOX-verdien blitt utført i utstrakt grad for å estimere den oksidative forringelsen i en olje (Allen and Hamilton, 1994). Til tross for dens praktiske fordel har ikke TOTOX-verdi noen solid vitenskapelig basis fordi den kombinerer variabler med ulik benevnning (Shahidi and Wanasundara, 1998). PV multipliseres fordi en PV-ekvivalent antas å gi opphav til to AV-ekvivalenter (Allen and Hamilton, 1994). TOTOX-verdi kan beregnes ved formelen:

$$\text{TOTOX} = 2\text{PV} + \text{AV}$$

2.1.5 Analyse av flyktige oksidasjonsprodukter

Under oksidasjon av flerumettede fettsyrer dannes det en rekke ulike oksidasjonsprodukter. Disse fører til uønsket smak og lukt på produktet. Lukt og smak er de mest innlysende målene på fiskeoljekvalitet. Sensorisk analyse kan i mange tilfeller være langt mer følsom enn instrumentelle analyser. Imidlertid er det svært ressurskrevende å drive et sensoriskpanel. Dynamisk Headspace Gasskromatografi massespektrometri (HS-GCMS) har vist seg å være en metode som har høy

korrelasjon mot sensorisk analyse på en rekke ulike næringsmidler. HS-GCMS utføres ved at flyktige oksidasjonsprodukter i prøven drives ut av en inert gass og deretter samles opp på en fast adsorbent. Etterpå desorberes oksidasjonsproduktene fra adsorbenten og overføres til en gasskromatograf. Prøvens beskaffenhet, temperatur, oppsamlingstid etc har stor innvirkning på resultatene.

2.1.6 Selektiv analyse av flyktige aldehyder "Dråpemetoden"

Dette er en metode basert på direkte selektiv derivatisering i gassfase (Headspace) av flyktige aldehyder etterfulgt av gasskromatografisk separasjon og deteksjon med massespektrometri (GCMS). I motsetning til metoden for flyktige forbindelser (HS-GCMS) tidligere beskrevet som måler alle flyktige komponenter måler denne metoden kun de flyktige aldehydene. Metoden er en modifisert utgave av en tidligere publisert metode (Fiamegos and Stalikas, 2008). Den er enkel å gjennomføre og er i tillegg automatisert på GCMS ved at derivatisering av aldehydene finner sted direkte i spissen av nålen på GC injektorsprøyten i headspace mens nålen står i GC prøveglasset, såkalt single drop micro extraction (SDME): 2 ml olje inkuberes ved 40 C i 25 min i inertatmosfære, etterfulgt av selektiv derivatisering av de flyktige aldehydene. Kvantfisering er basert på tilsatt kjent mengde intern standard til derivatiseringsreagens. Dette er en mye enklere metode å utføre enn den tradisjonelle HS-GCMS metodikken, både med hensyn til prøvetaking, gjennomføring av analysen som er automatisert og resultatbehandling. Resultatene fra denne metoden er gjengitt som sum aldehyder i denne rapport.

2.1.7 Analyse av hydrokso-alkanaler

Ved direkte peroksidering av n-3 og n-6 umettede fettsyrer på påfølgende peroksiddekomponering dannes blant annet henholdsvis 4-hydrokso-heksenal og 4-hydrokso-nonenal. For eksempel er trans-4-hydrokso-2-heksenal en av de dominerende sekundære oksidasjonsprodukter fra DHA, og derved en spesifikk oksidasjonsmarkør for n-3 flerumettede fettsyrer. Siden denne forbindelsen ikke er flyktig, kreves et en to-trinns derivatisering for å få den analysert med GCMS: Etter en væskeekstraksjon av oljen, foretas en oximering av aldehydgruppen ved bruk av PFBHA og deretter en silylering av hydrokso-gruppen ved bruk av BSTFA (LaFond et al., 2011). Vi har modifisert den publiserte metoden tilpasset fiskeolje.

2.2 Analyse av miljøgifter

Analyse av miljøgifter ble utført av NIFES. Alle 10 oljer ble analysert for innhold av polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), dioxin, dioxinlignende PCB, PCB, perfluorooctane sulfonate (PFOS), pesticider, PBDE, HBCD og TBBPA.

2.3 Metoder for cellemodellsystemer

2.3.1 Isolasjon og dyrkning av hepatocytter

Hepatocytter ble isolert fra Atlantisk laks i henhold til metode beskrevet av (Dannevig and Berg, 1985). Etter isolering ble cellene filtrert gjennom et 100 µM nylon filter. Hepatocytterne ble vasket

tre ganger i L-15 medium og sentrifugert i 2 min på 50 xg mellom hver vask. Etter siste vask ble cellene reløst i L-15 dyrkningsmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 1 % bikarbonat, 1 % L-glutamin, 5mM Hepes og 1 % PenStrep. Omtrent 2×10^6 hepatocytter/mL ble deretter sådd ut på 9.6 cm² celledyrkningsbrønnerdyrkibrønner belagt med laminin. Cellene festet seg til overflaten over natten ved 13°C. Neste dag ble cellene behandlet med de forskjellige oljene og 1-penten-3-ol i ulike konsentrasjoner.

2.3.2 Tillaging av oljesubstrater

En meget finfordelt olje/protein emulsjon ble laget ved å benytte en kombinasjon av kun olje, dimethyl sulfoxide (DMSO), protein og dyrkningsmedium. Denne metoden er meget skånsom for oljene, og det innføres ingen endringer i lipidsammensetningen eller i oksidasjonsstatusen til opprinnelsesoljen. 5 mg olje tilsettes 10 µl DMSO og blir blandet godt ved bruk av vortex. Løsningen blir så sonikert i 10 sek ved 40V på is. Deretter blir 1 ml fetalt kalveserum blandet inn i løsningen ved bruk av vortex, og den resulterende løsningen blir sonikert i 10 sek ved 40V på is. Det er sonikeringen som gir dannelsen av emulsjoner.

2.3.3 Fettsyresammensetning

Total lipid ble ekstrahert ved hjelp av en metode beskrevet av Folch et al. (Folch et al., 1957). Kloroformfasen dampes inn til tørrhet under nitrogengass og lipidet reløses i kloroform. Methyl estere av fettsyrene dannes etter en metode beskrevet av Mason og Waller (Mason and Waller, 1964) og av Hoshi et al. (Hoshi et al., 1973). De ulike fettsyrene separeres i en GC (Hewlett Packard 6890) med en splitt injektor, SGE BPX70 kapillær kolonne (lengde 60 m, indre diameter 0,25 mm og en filmtykkelse på 0.25 µm), flammeionisasjonsdetektor og HP ChemStation programvare. Helium ble brukt som bæregass, og injektor- og detektortemperatur var begge 280°C. Temperaturen ble hevet fra 50 til 180°C med en hastighet på 10°C min⁻¹, og deretter hevet til 240°C med en hastighet på 0,7°C min⁻¹. Den prosentvise mengden av hver fettsyre ble bestemt ut i fra arealet under toppen.

2.3.4 Superoxide dismutase

Superoxide Dismutase (SOD) katalyserer reduksjon av superoxide til oksygen og hydrogen peroxide. 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, Germany).

2.3.5 Glutathione peroksidase

Glutathione peroxidase (Gpx) katalyserer reduksjonen av hydroperoksider, inkludert hydrogen peroksid. 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, Germany).

2.3.6 Cytochrome C oxidase

Integritet av ytre mitokondriemembran kan bestemmes ved å måle cytochrome C oksidase aktivitet i mitokondriemembran med og uten tilsetning av detergenten n-dodecyl b-D-maltoside. Cytochrome C oksidase ble målt ved hjelp av Cytochrome c Oxidase Assay Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) i henhold til produsentens protokoll.

2.3.7 Katalase

Katalaseaktivitet måles kolorimetrisk ved bestemmelse av H₂O₂ forbruk i en prøve. Prøven tilsettes en inkubasjonsmiks med 0.02 M Imidazole buffer (pH 7.2), 0.002% Triton X-100, og 0.006 % H₂O₂. Etter inkubering i 5 minutter stoppes reaksjonen ved tilsetning av 0.45% TiOSO₄ i 2M H₂SO₄. Reaksjonen leses av ved 405 nm. Enzymaktiviteten beregnes ut i fra mengden enzym (Unit) som gir 90% reduksjon av substratet i løpet av 1 min og i et volum på 50 mL.

2.3.8 Bestemmelse av thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) bestemmes ved å benytte et kommersielt colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Absorbansen måles ved 532 nm i en Spectrostar Nano mikroplateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Germany).

2.3.9 Lipidperoksidering (DPPP)

Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) inkorporeres raskt i cellemembraner, og brukes som en følsom fluoriserende sensor for lipidperoksidering i membranene. Fluorescensen måles ved ex340 nm og em380nm i en Fluostar Optima plateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Germany).

2.3.10 Kvantitativ real-time PCR

Total RNA ekstraheres ved å benytte RNeasy® Mini Kit i henhold til produsentens protokoll. RNA behandles med RNase-free DNase I for å fjerne kontaminerende DNA. Alle RNA prøver benyttet i våre forsøk hadde A260/280 ratioer mellom 1.80 og 2.30. Total RNA konsentrasjon ble bestemt ved 260 nm ved å benytte spektrofotometer. Ca 200 ng av total RNA ble revers-transkribert til cDNA ved å benytte et TaqMan® Gold RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i et reaksjonssystem med volum 50 µl. Alle prosedyrer ble utført i henhold til protokoll beskrevet i Todorcevic et al. (Todorcevic et al., 2010).

2.3.11 Dyrking og differensiering av human monocytcellerlinje (THP-1)

THP-1 cellelinjen er en immuncellelinje som har sin opprinnelse fra blodet til et menneske, og ble kjøpt fra American Type Tissue Collection (Rochville, MD, USA). Cellelinjen ble dyrket i RPMI dyrkningsmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 0,05 mM 2-mercaptoetanol, 2 mmol/l L-Glutamine, 100 U/mL penicillin og 100 µg/mL streptomycin, og oppbevart i inkubatorskap ved 37 grader i

nærvær av 5 % CO₂ og høy luftfuktighet. Cellene ble differensiert til makrofager i forkant av celleforsøkene ved å inkubere cellene med 100 ng/ml PMA i 2 dager etterfulgt av 5 dagers hvile.

2.3.12 Sekresjon av IL-6 og IL-8 fra THP-1 makrofager (humane immunceller)

THP-1 makrofager ble inkubert med 0,5 mg/ml indikert oljesubstrat i 24 timer. Deretter ble 0,5 ng/ml LPS tilsatt til halvparten av cellene og cellene inkubert videre i 6 timer før forsøket ble avsluttet. Supernatanten fra celleforsøket ble analysert for innhold av IL-6 og IL-8 ved bruk av ELISA i henhold til protokoll beskrevet i (Rieder et al., 2011).

3 Resultat og diskusjon

3.1 Holdbarhetsutvikling

Innledende analyser av oljene lagret ved henholdsvis 4 og 20 grader viste at det bare hadde skjedd en oksidasjonsutvikling i oljene lagret ved 20 grader. Alle resultater presentert i denne rapporten er derfor kun fra oljer lagret ved 20 grader.

Tabell 1a og 1b viser fettsyresammensetningen i de ulike oljene. Som forventet var det stor variasjon i fettsyresammensetningen mellom de ulike oljene. Imidlertid var det liten individuell forskjell i fettsyresammensetningen gjennom lagringsforsøket for de enkelte oljer.

Tabell 2a og 2b Fettsyresammensetningen i de ulike oljene, målt henholdsvis i prøver fra oppstart og avslutning av holdbarhetsstudiet

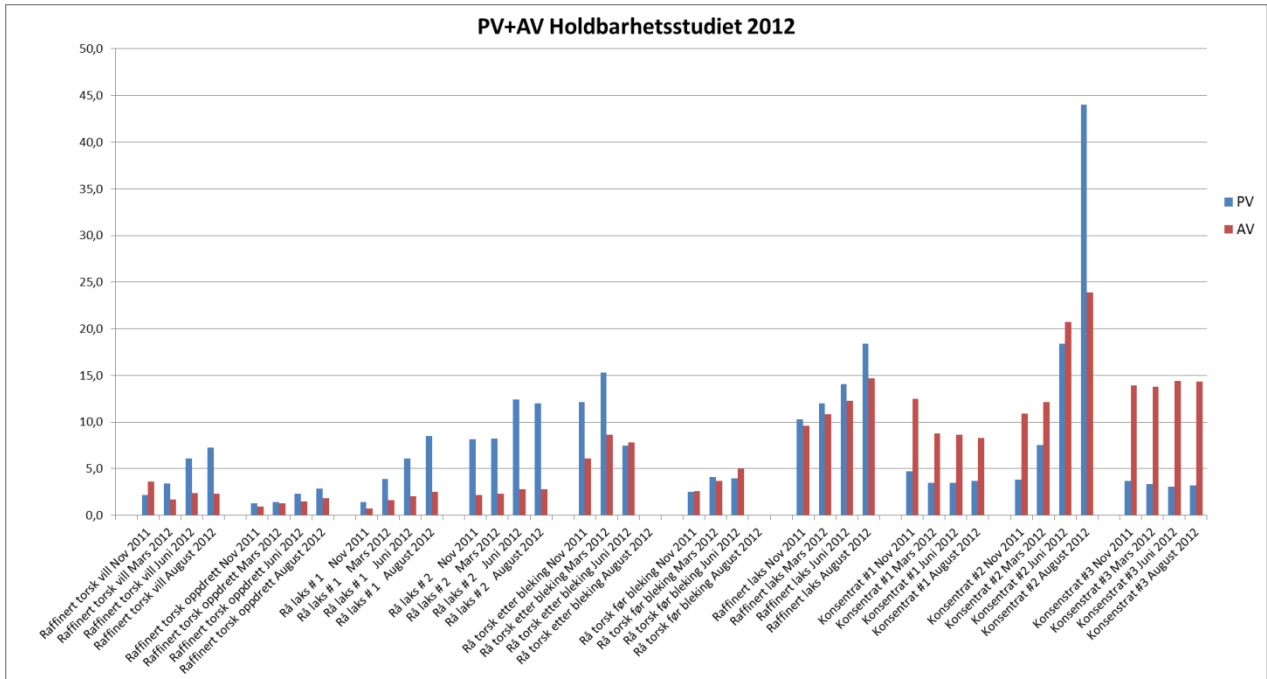
Type olje	12:0	14:0	14:1	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1 n-11	18:1 isomer	18:1 n-9	18:1 n-7	18:2 n-6	18:3 n-6
Raffinert torsk vill Nov 2011	0,0	3,9	0,1	0,3	11,0	8,9	0,2	2,4	0,1	1,9	22,3	5,5	4,1	0,1
Raffinert torsk vill August 2012	0,0	4,2	0,1	0,4	11,4	9,2	0,2	2,4	0,1	2,1	21,3	5,7	3,8	0,2
Raffinert torsk oppdrett Nov 2011	0,1	4,5	0,0	0,3	12,5	4,8	0,4	3,0	0,0	0,6	25,9	4,5	6,7	0,1
Raffinert torsk oppdrett August 2012	0,0	4,4	0,1	0,3	12,6	6,2	0,4	2,8	0,1	1,0	25,2	4,2	6,7	0,1
Rå laks # 1 Nov 2011	0,1	3,8	0,0	0,2	10,5	4,1	0,2	2,7	0,0	0,0	36,9	3,5	12,1	0,1
Rå laks # 1 August 2012	0,0	3,6	0,0	0,2	10,0	4,4	0,2	2,5	0,0	0,0	36,7	3,4	12,7	0,1
Rå laks # 2 Nov 2011	0,0	3,6	0,0	0,2	10,1	4,4	0,2	2,6	0,0	0,0	36,3	3,4	12,5	0,1
Rå laks # 2 August 2012	0,0	3,5	0,0	0,2	10,1	4,3	0,2	2,6	0,0	0,0	36,4	3,4	12,6	0,1
Rå torsk etter bleking Nov 2011	0,0	4,0	0,1	0,3	13,9	6,2	0,3	4,2	0,1	2,0	22,0	4,9	6,5	0,1
Rå torsk etter bleking August 2012	0,0	4,2	0,1	0,3	14,6	6,1	0,3	4,5	0,1	2,0	21,8	4,8	6,4	0,1
Rå torsk før bleking Nov 2011	0,0	4,6	0,1	0,4	11,9	10,0	0,2	2,4	0,1	2,3	16,9	5,6	2,0	0,1
Rå torsk før bleking August 2012	0,0	4,6	0,1	0,4	11,8	10,0	0,2	2,4	0,1	2,2	17,0	5,6	2,0	0,2
Raffinert laks Nov 2011	0,1	6,2	0,0	0,4	15,4	7,7	0,5	3,5	0,1	0,4	21,2	3,7	5,9	0,1
Raffinert laks August 2012	0,1	6,3	0,1	0,4	15,5	7,9	0,5	3,5	0,1	0,4	21,2	3,7	5,9	0,1
Konsentrat #1 Nov 2011	0,0	0,5	0,0	0,0	1,4	0,7	0,1	3,2	0,0	0,0	6,6	2,2	0,9	0,1
Konsentrat #1 August 2012	0,0	0,5	0,0	0,0	1,5	0,7	0,1	3,2	0,0	0,0	6,8	2,2	1,0	0,1
Konsentrat #2 Nov 2011	0,0	0,6	0,0	0,0	1,6	0,9	0,1	3,2	0,1	0,1	6,4	2,3	0,7	0,1
Konsentrat #2 August 2012	0,0	0,5	0,0	0,0	1,4	0,8	0,1	3,2	0,1	0,1	6,3	2,3	0,7	0,1
Konsentrat #3 Nov 2011	0,0	0,8	0,0	0,1	1,7	1,2	0,1	1,5	0,0	0,0	3,3	1,0	0,7	0,0
Konsentrat #3 August 2012	0,0	0,8	0,0	0,1	1,7	1,2	0,1	1,5	0,0	0,0	3,3	1,0	0,6	0,0

Type olje	18:3 n-3	20:0	20:1 isomer	20:1 n-9	20:2 n-6	20:4 n-6	20:3 n-3	22:0	22:1	20:5 n-3	24:0	24:1	22:5 n-3	22:6 n-3
Raffinert torsk vill Nov 2011	1,9	0,1	1,2	11,7	0,3	0,4	0,1	0,0	0,8	9,1	0,0	0,4	1,2	12,0
Raffinert torsk vill August 2012	1,0	0,0	1,3	12,0	0,4	0,4	0,1	0,0	0,9	9,0	0,0	0,4	1,3	12,2
Raffinert torsk oppdrett Nov 2011	2,7	0,2	0,6	8,4	0,7	0,5	0,4	0,1	0,8	7,7	0,0	0,6	2,9	10,9
Raffinert torsk oppdrett August 2012	2,8	0,2	0,8	8,1	0,6	0,4	0,3	0,0	0,8	7,8	0,0	0,6	2,4	11,1
Rå laks # 1 Nov 2011	4,3	0,3	0,5	5,0	1,0	0,2	0,5	0,2	0,7	4,4	0,0	0,5	2,0	6,0
Rå laks # 1 August 2012	4,6	0,2	0,4	4,8	1,1	0,3	0,5	0,1	0,6	4,5	0,0	0,5	2,3	6,2
Rå laks # 2 Nov 2011	4,6	0,3	0,4	4,8	1,0	0,3	0,5	0,1	0,6	4,6	0,0	0,5	2,3	6,6
Rå laks # 2 August 2012	4,6	0,2	0,4	4,8	1,1	0,3	0,5	0,1	0,6	4,6	0,0	0,5	2,3	6,5
Rå torsk etter bleking Nov 2011	1,4	0,0	1,9	7,2	0,3	0,5	0,1	0,0	0,5	9,8	0,0	0,3	1,7	11,7
Rå torsk etter bleking August 2012	1,4	0,0	1,8	7,2	0,3	0,5	0,1	0,0	0,5	9,5	0,0	0,3	1,6	11,4
Rå torsk før bleking Nov 2011	0,9	0,0	1,3	12,1	0,3	0,4	0,1	0,0	0,8	11,1	0,0	0,4	1,4	14,5
Rå torsk før bleking August 2012	1,0	0,0	1,2	12,2	0,3	0,4	0,1	0,0	0,8	11,0	0,0	0,4	1,4	14,4
Raffinert laks Nov 2011	2,1	0,2	0,0	3,9	0,4	0,7	0,2	0,0	0,5	11,1	0,0	0,5	4,6	10,7
Raffinert laks August 2012	2,1	0,2	0,0	3,9	0,4	0,7	0,2	0,0	0,5	11,0	0,0	0,5	4,5	10,5
Konsentrat #1 Nov 2011	0,5	0,5	0,0	2,2	0,3	2,0	0,2	0,3	0,5	42,0	0,0	1,0	6,6	28,0
Konsentrat #1 August 2012	0,6	0,5	0,0	2,2	0,3	2,0	0,2	0,3	0,5	41,7	0,1	1,0	6,6	27,9
Konsentrat #2 Nov 2011	0,5	0,5	0,0	2,6	0,4	2,0	0,2	0,3	0,5	41,6	0,1	1,0	6,5	27,8
Konsentrat #2 August 2012	0,5	0,5	0,0	2,4	0,3	2,1	0,2	0,3	0,5	42,2	0,1	0,9	6,6	27,9
Konsentrat #3 Nov 2011	0,3	0,5	0,4	2,1	0,5	1,5	0,2	0,5	1,0	18,5	0,2	2,1	8,3	53,5
Konsentrat #3 August 2012	0,3	0,6	0,4	2,1	0,5	1,5	0,2	0,5	1,0	18,2	0,2	2,1	8,3	53,8

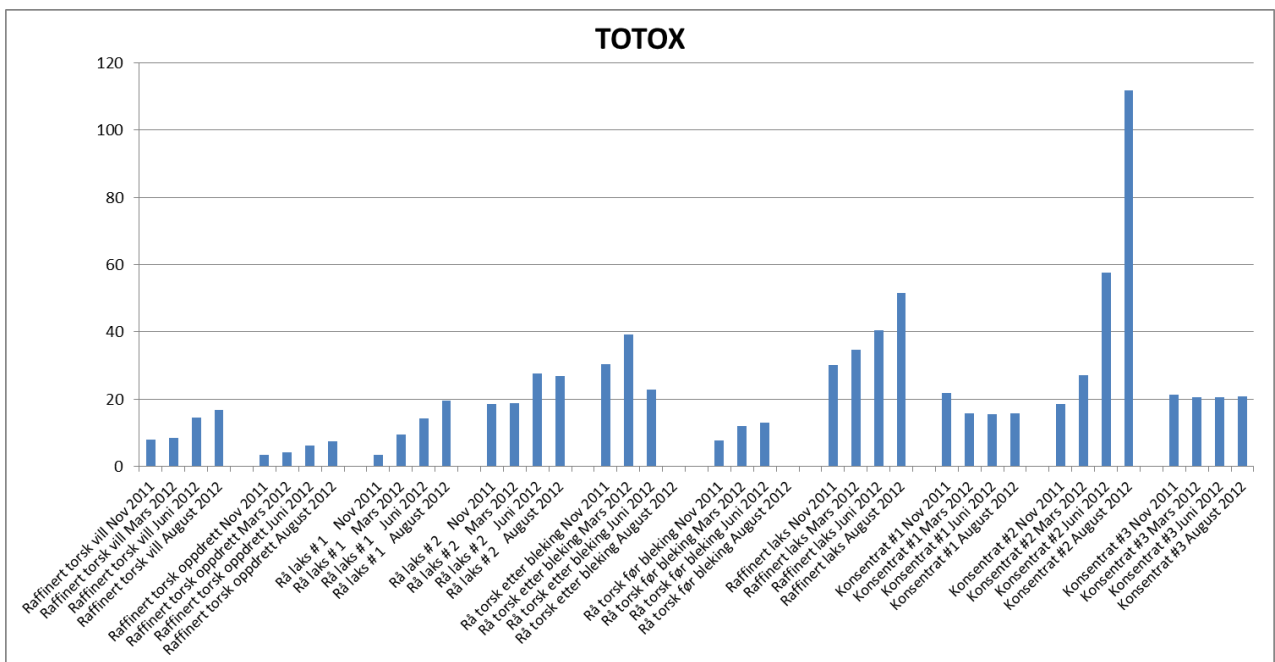
3.1.1 PV, AV og TOTOX

Figur 4 og 5 viser henholdsvis PV - AV og TOTOX verdiene til de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet. Det var en stor variasjon i oksidasjonsgrad så vel som i oksidasjonsutvikling. Overraskende nok var det ingen oksidasjonsutvikling i konsentrat #1 og #2 til tross for et høyt innhold av EPA og DHA. Konsentrat #3 derimot hadde en kraftig oksidasjonsutvikling gjennom

holdbarhetsstudien. Oljen fra raffinert laks viste også en høy grad av oksidasjon og oksidasjonsutvikling. Dette kan forklares ved at konsentrat #1 og #2 var stabilisert med antioksidanter mens det tredje konsentratet ikke var tilsatt antioksidanter (i hovedsak tocoferolisomere). På grunn av ulik mengde tilsatt antioksidant til de forskjellige oljene ser man ingen relasjon mellom grad av umetthet og grad av oksidasjon i oljene som er brukt i studien.



Figur 4 PV og AV til de ulike oljeprøvene gjennom holdbarhetsstudiet



Figur 5 TOTOX verdien til de ulike oljeprøvene gjennom holdbarhetsstudiet

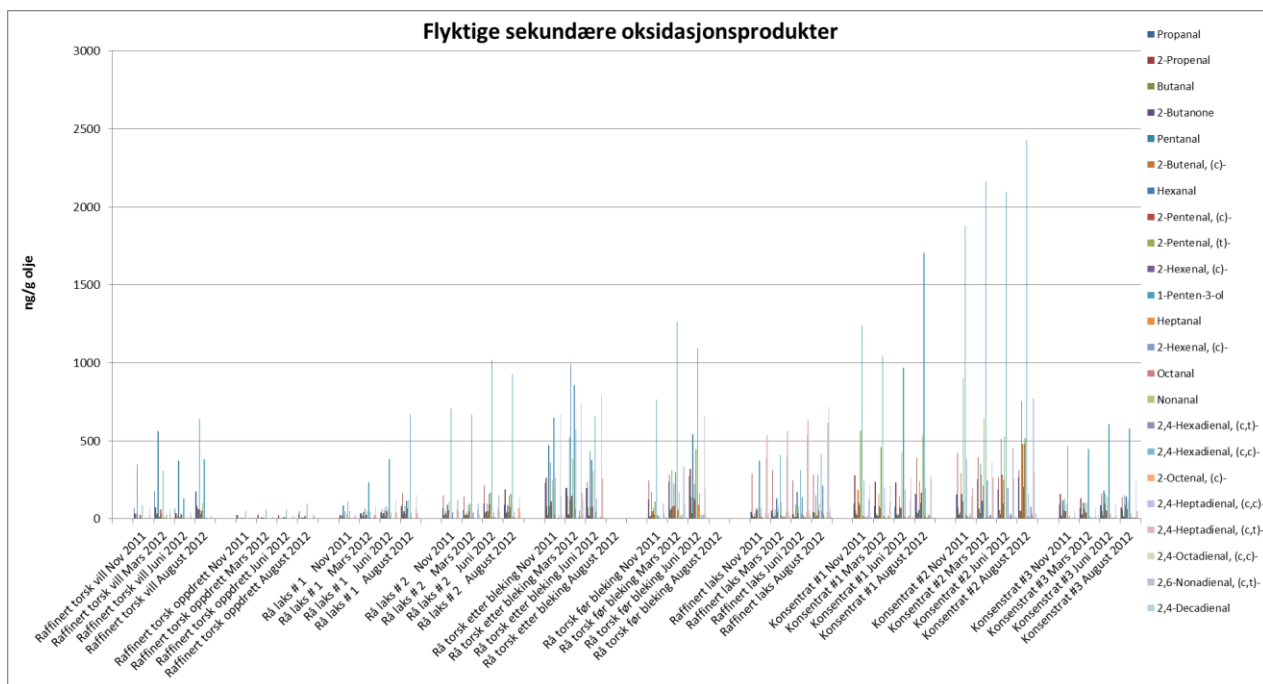
3.1.2 Innhold av flyktige sekundære oksidasjonsprodukter

Analyse av flyktige oksidasjonsprodukter gir et bredt bilde av statusen til oljene. Vi finner slike oksidasjonsprodukter i samtlige oljer i mer eller mindre grad. Noen oljer har lavt innhold av oksidasjonsprodukter slik som for raffinert olje fra oppdrettstorsk, mens andre har høyt innhold av oksidasjonsprodukter slik som i bleket torskoleverolje og konsentrat #2 (Figur 6). Innholdet av flyktige sekundære oksidasjonskomponenter gjengitt i figur 6 ser ved første øyekast til å samsvare med PV og AV verdiene. Ved oppdeling av resultatene i figur 6 til egne grafer for mettede aldehyder (Figur 7), enumettede aldehyder (Figur 8), diumettede aldehyder (Figur 9) og 1-Penten-3-ol (Figur 10) ser vi at det er hovedsakelig innholdet av 1-Penten-3-ol som samsvarer med PV og AV verdiene mens innholdet av flyktige aldehyder i stor grad ikke samsvarer. Det er de flyktige aldehydene som gir opphav til den harske smaken i oljene ved oksidering, og ved økt oksidering får man dannet økt mengde flyktige diumettede aldehyder. Figur 9 viser at det under lagring har blitt dannet en økt mengde over tid av spesielt 2,4 Heptadienal i oljer hvor PV og AV verdiene er stabile over samme periode. Dette viser at PV og AV verdiene ikke er gode nok målemetoder for oksidasjon.

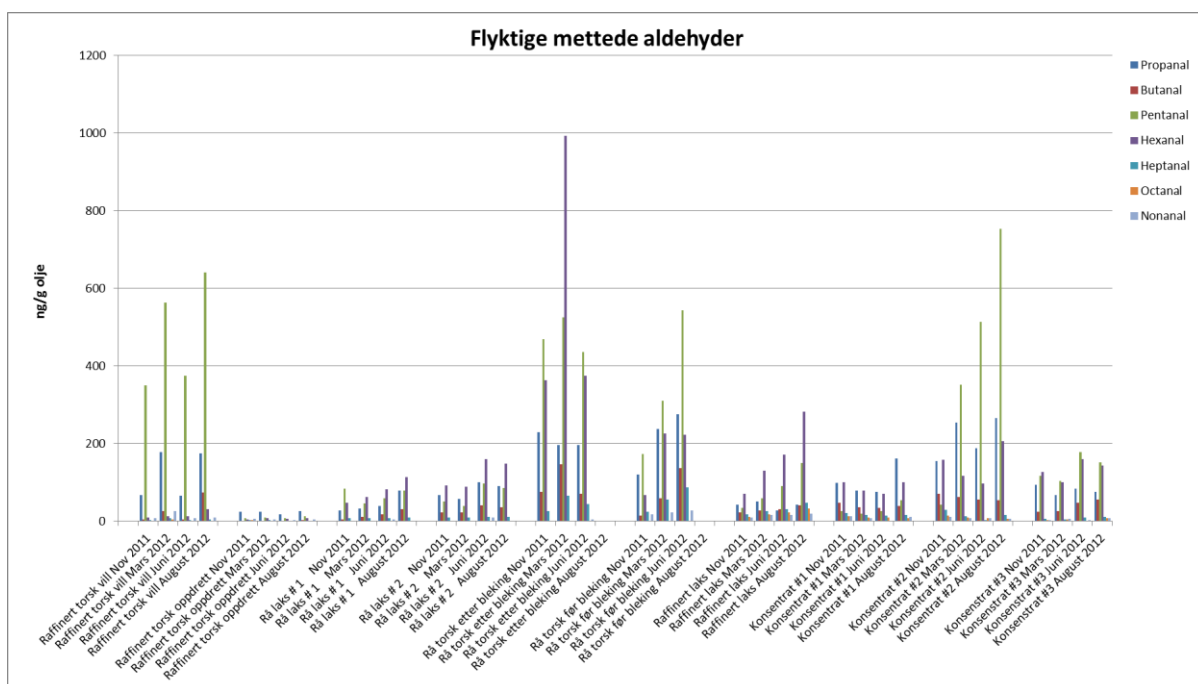
Mønsteret i flyktige oksidasjonsprodukter er noe forskjellig mellom oljene. Raffinert villfanget torsk er en tran av «god kvalitet». Raffinert olje fra oppdrettstorsk ser ut til å være den mest stabile. Når det gjelder rå torskoleverolje ser vi effekt av bleking. Det er først og fremst dannelse av en 2,4 heptadienalisomer,(c,c) (Figur 9), som det dannes mye av. Dette kan skyldes favorisering av en variant av peroksidspalting. Ser vi på Raffinert laks er det mer av en annen isomer av 2,4 heptadienal (c,t). Vi ser at konsentrat #1 og #2 har meget høyt innhold av 2-pentenal i forhold til nordatlantisk olje og kan skyldes en annen type peroksidnedbrytning (Figur 8).

Forskjell i oksidasjonsgrad mellom de tre konsentratene, #1, #2 og #3, skyldes først og fremst antioksidanttilsetningen. Konsentrat #1 og #2 er kun tilsatt minimale mengder antioksidant etter raffinering. Rå torskoleverolje er heller ikke tilsatt antioksidant. Det er mulig at en god antioksidanttilsetning overskygger råvarekvalitetens eventuelle negative egenskaper, da det er først og fremst etter raffinering, når oljen er strippet, at oljen er hyperfølsom for oksidasjon. En kan reise spørsmål om søramerikansk olje og konsentrater nødvendigvis trenger å være mer oksidert enn kortreiste olje når det gjelder «normale» oksidasjonsnivå. Det å kunne matche en raffinert oppdrettstorskeolje vil imidlertid være en utfordring. Oksidasjonsproduktet 1-penten-3-ol (Figur 10) regnes for å være en god markør for oksidasjon av omega-3 oljer. Hvis man kun fokuserer på de raffinerte oljene så er det relativt lite 1-penten-3-ol i nordatlantiske oljer og i konsentrat #3, mens konsentratet #1 og #2 har et høyere nivå.

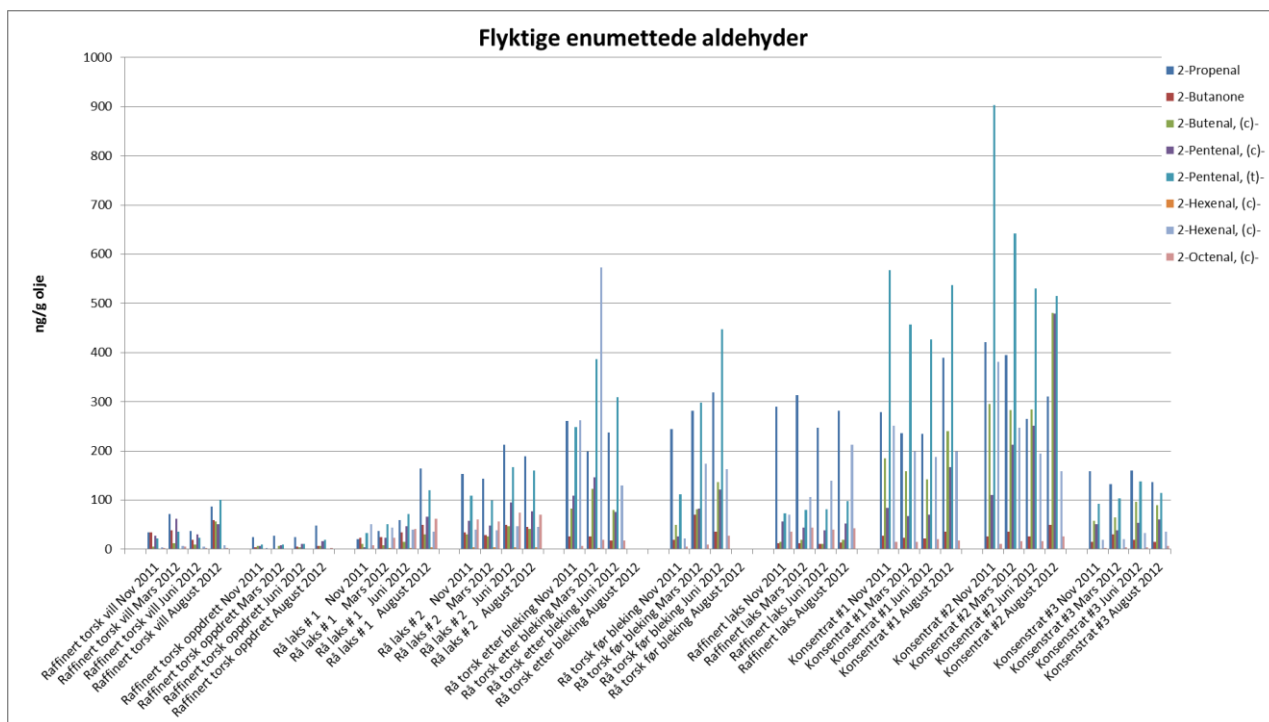
Raffinert olje fra villfanget torsk har et høyt innhold av pentanal (Figur 7) i forhold til de andre oljene. Hvorfor denne oljen skulle ha så spesielt høyt innhold av denne komponenten vites ikke.



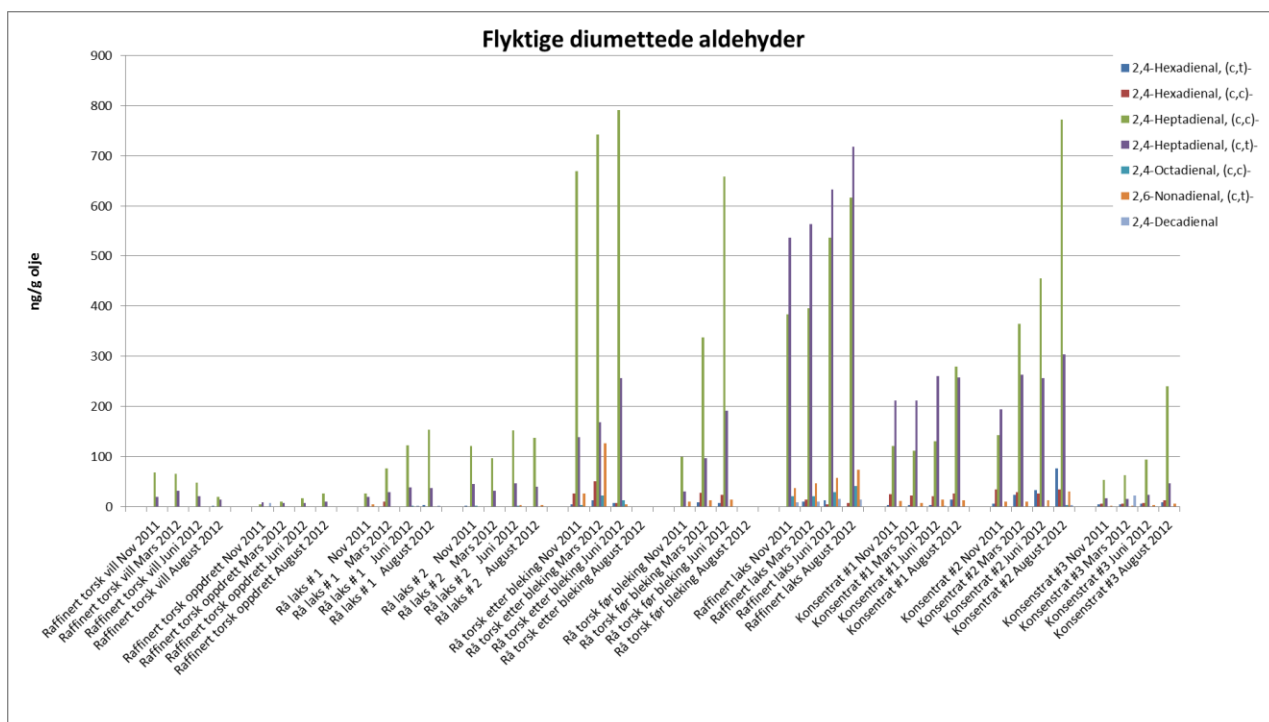
Figur 6 Innholdet av flyktige sekundære oksidasjonsprodukter i de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet. c står for cis og t står for trans



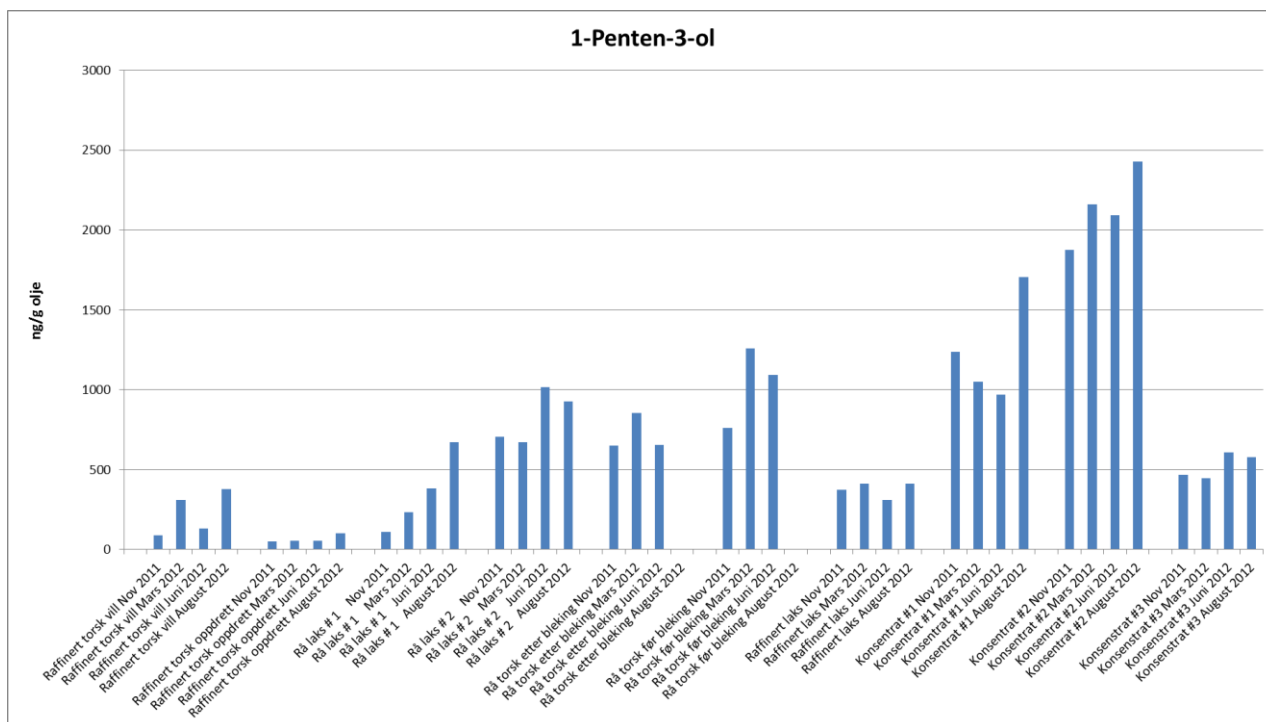
Figur 7 Innhold av flyktige mettede aldehyder i de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet



Figur 8 Innhold av flyktige enumettede aldehyder i de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet. c står for cis og t står for trans.

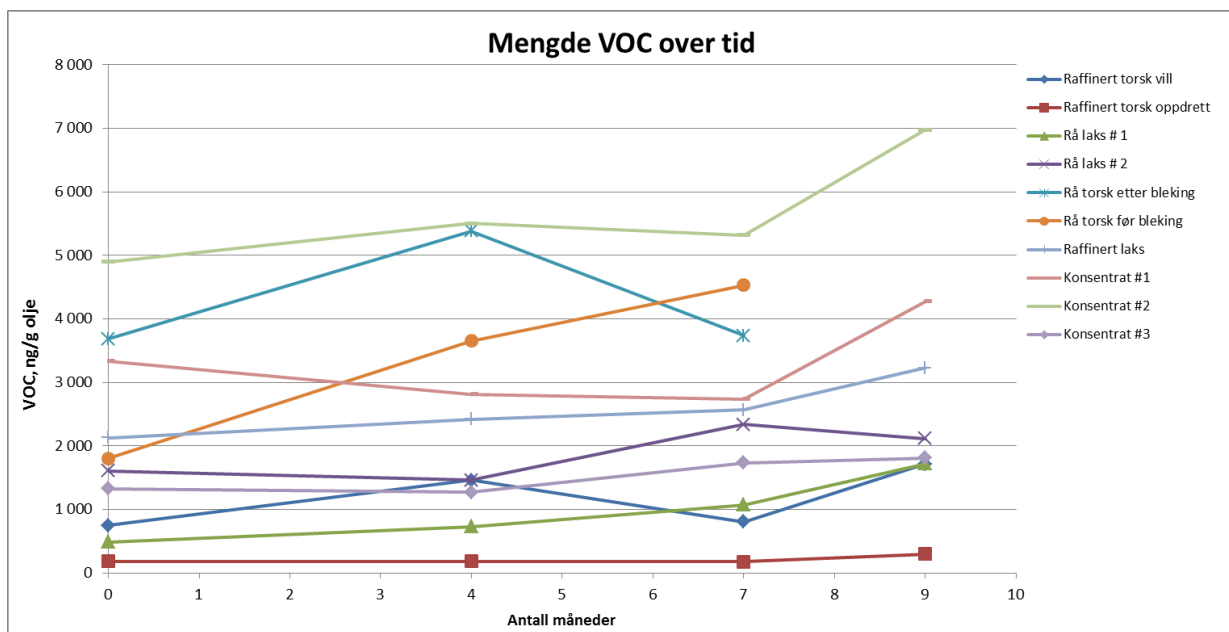


Figur 9 Innhold av flyktige diumettede aldehyder i de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet. E står for cis og Z står for trans

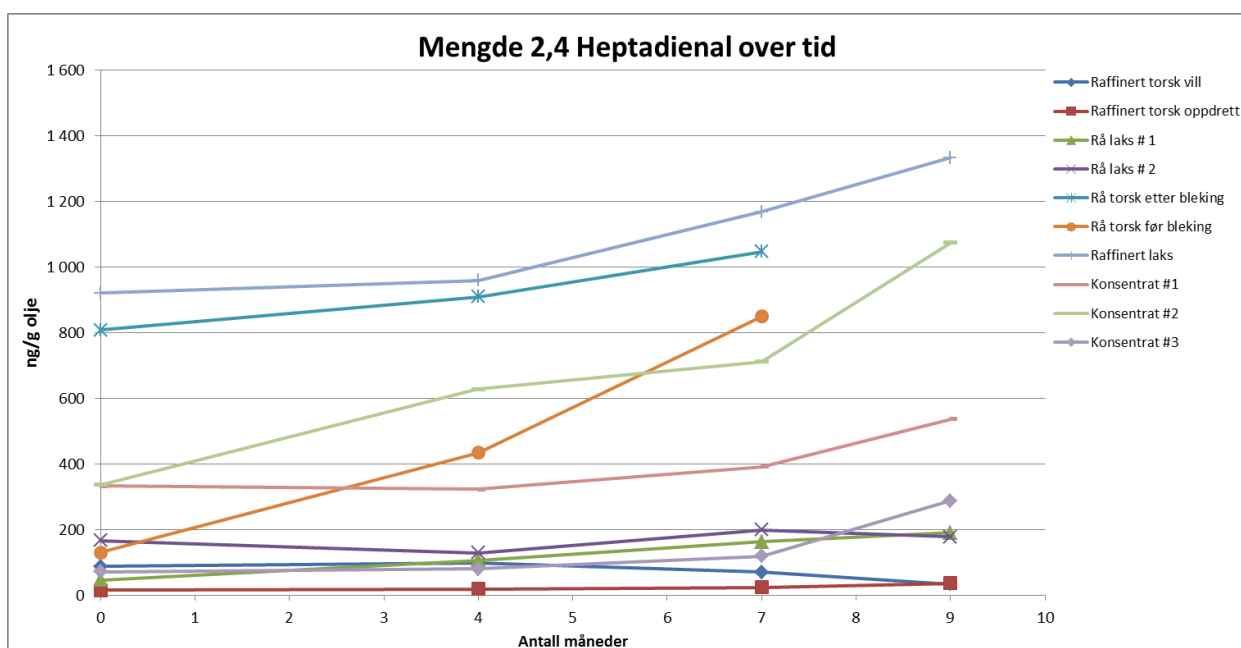


Figur 10 Innhold av den flyktige 1-penten-3-ol i de ulike oljene gjennom holdbarhetsstudiet

Ser vi på lagringsforløpet til oljene ser vi at oljene initielt hadde ulik oksidasjonsgrad. I et plot over lagringsforløpet (Figur 11a) ser vi imidlertid at de ulike oljene oppfører seg ulikt. Og det er kanskje spesielt etter ca 6 måneders lagring at en får store utslag. Vi ser at noen oljer faktisk gir en lavere målbar mengde flyktige oksidasjonsprodukter over tid. Dette kan skyldes at komponentene i oljen kan reagere videre til andre ikke flyktige komponenter. Hvis vi ser bort i fra uraffinerte oljer så kan det se ut som om de nordatlantiske oljene holder seg bedre med hensyn på oksidasjon, men samtidig inneholder jo også disse oljene mindre mengde Omega-3 fettsyrer. Figur 11b viser utviklingen av 2,4 heptadienal over tid. Det er her flere oljer som er i utvikling for oksidasjon. Vi ser at konsentrat 1, rå torsk før bleking, raffinert lakseolje og rå torsk etter bleking er under oksidasjon. Man ser også at konsentrat #3 har en svak stigning fra 7 til 9 mnd lagring. Øvrige oljer ser veldig stabile ut.



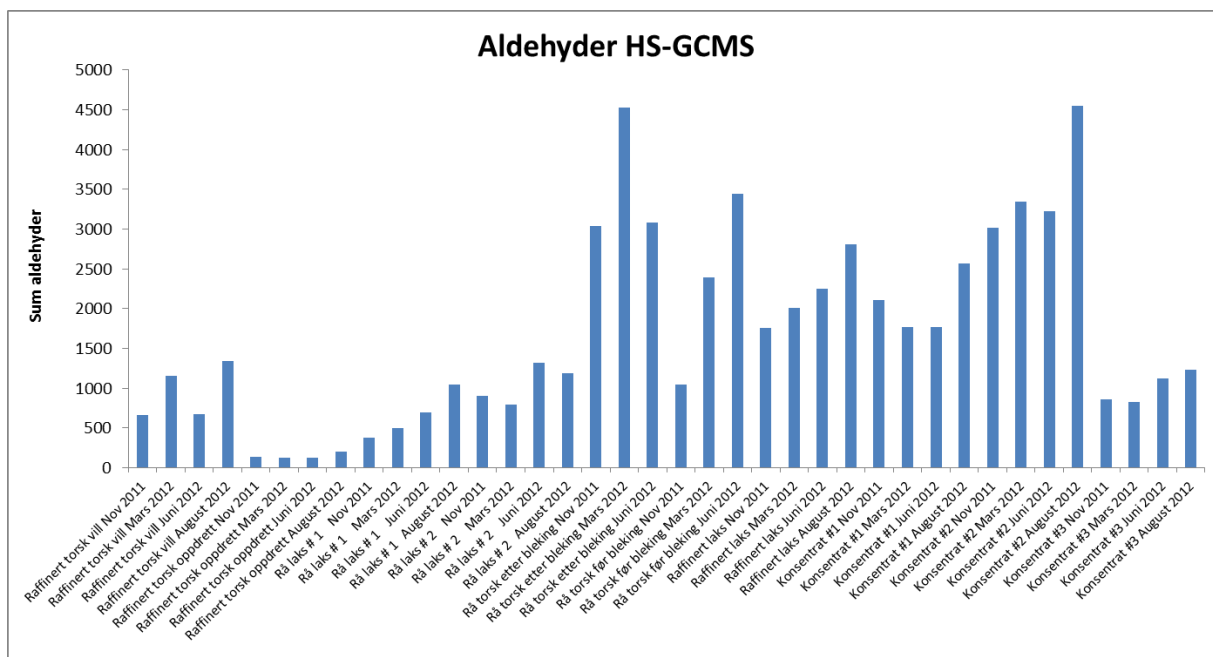
Figur 11a Lagringsforløp vs total mengde flyktige komponenter (VOC)



Figur 11b Lagringsforløp vs 2,4 Heptadienal

3.1.3 Dråpemetoden

Resultatene for summen aldehyder målt med dråpemetoden er gjengitt i Figur 12.



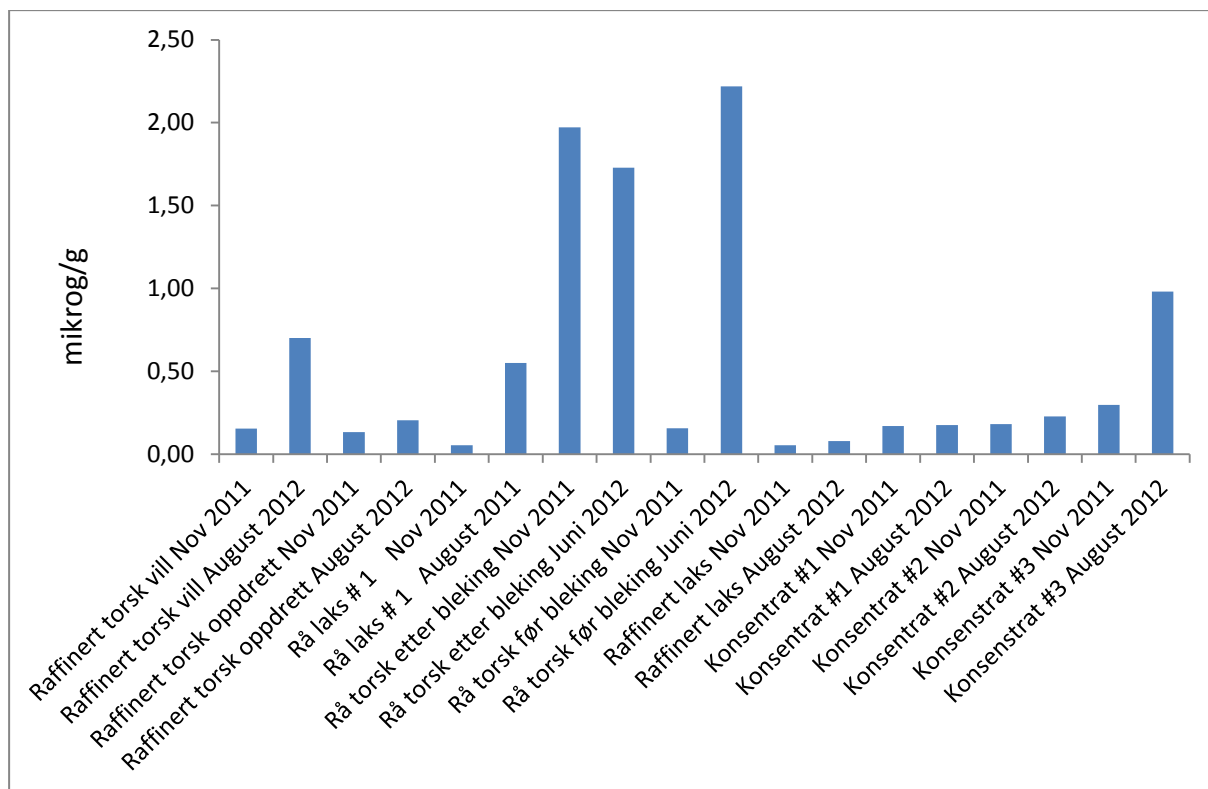
Figur 13 Sum aldehyder målt med HS-GCMS for de ulike oljene.

Resultatene gjenspeiler en ulik oksidasjonskjemi i de ulike typer oljer pga ulik fettsyre- og kjemisk sammensetning, som igjen vil bidra til ulik avspaltning og dannelse av flyktige sekundære oksidasjonsprodukter (aldehyder). Den høye negative korrelasjonen mellom dråpemetoden og flyktige aldehyder som ble funnet for lakseolje er foreløpig vanskelig å forklare, noe vi må se nærmere på.

Resultatene viser at dråpemetoden metoden kan ha et potensial som fremtidig «hurtigmetode» for måling av oksidasjonsgrad i fiskeoljer.

3.1.4 Hydroksoy-alkanaler

Figur 14 viser resultatene for tr-4-hydroksoy-2-heksenal. Oljer med høyere oksidasjonsgrad viste generelt høyere nivå av dette oksidasjonsproduktet. De målte konsentrasjoner av tr-4-hydroksoy-2-heksenal varierte fra 0,05-2,3 mikrogr/gram olje, der de laveste nivåene ble funnet i de lavoksiderte oljene og de høyeste nivåene i de mest oksiderte oljene. De høyeste nivåene ble funnet i bleket torskolje og ubleket torskolje etter 8 måneder lagring. Tilsvarende mengder 4-hydroksoy-nonenal (oksidasjonsprodukt fra n-6 fettsyrer) er tidligere også målt i vegetabiliske fritureoljer (LaFond et al., 2011).



Figur 14 Konsentrasjoner av 4-hydroxy-2-heksenal i oljene. Kun den ferske og den lengst lagrede prøven for hver av oljetyperne er gjengitt

3.2 Innhold av miljøgifter (analysert av NIFES)

Figur 10 viser innholdet av dioxin, dioxinlignende PCB og PCB i 10 ulike marine oljer. Flere av oljene hadde et innhold av dioxin og dioxinlignende PCB som var over grenseverdien for marine oljer til humant konsum (Tabell 3). Olje fra rå torsk før bleking hadde også et innhold av PCB over grenseverdien, mens olje fra raffinert laks hadde et PCB innhold som lå like under grenseverdien.

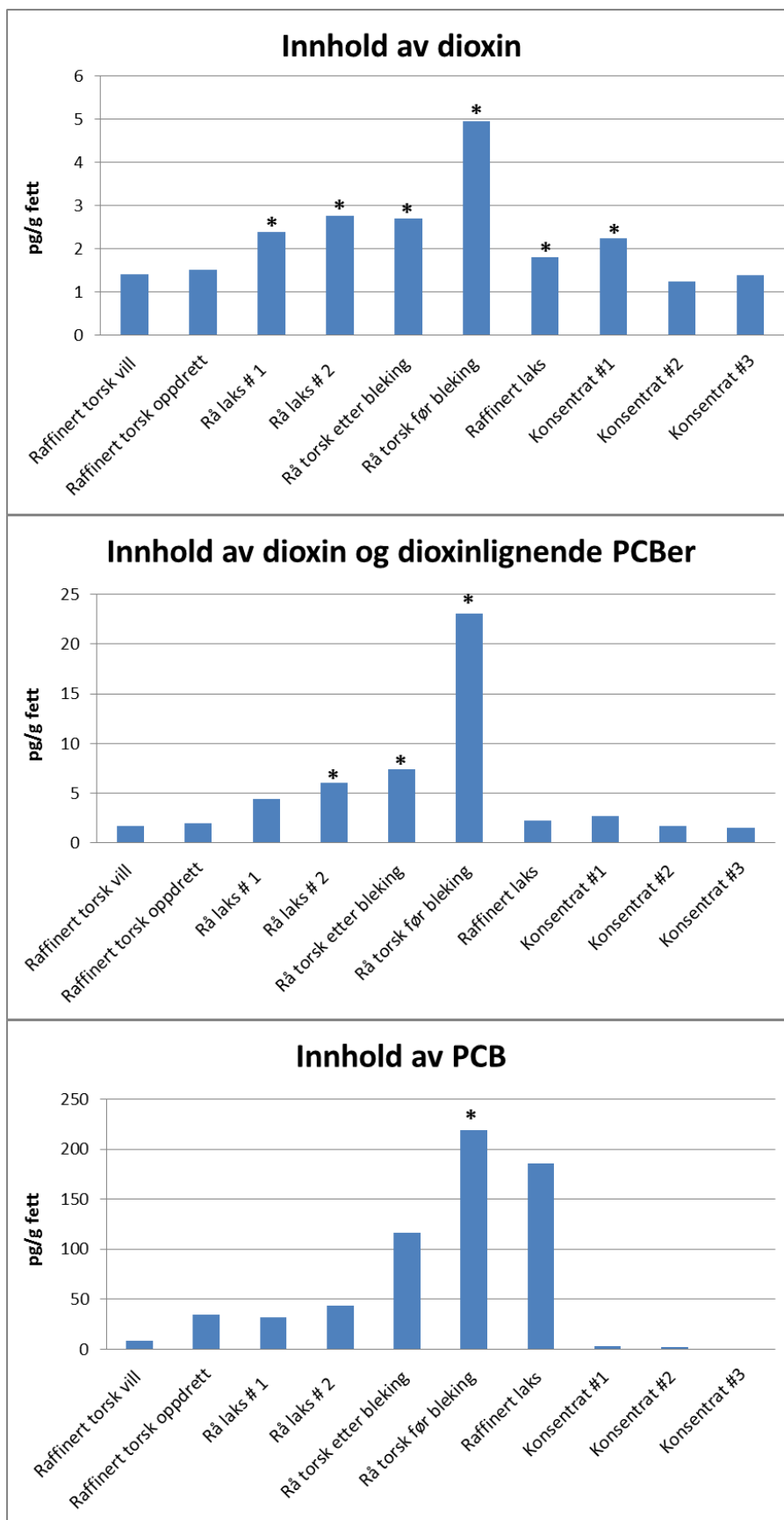
Tabell 3 Grenseverdier for dioksin, dioksinlignende PCB og PCB

	Sum av dioxin (PCDD+PCDF-TEQ)	Sum av dioxin og dioxinlignende PCBer (non-ortho PCB og mono-ortho PCB- TEQ)	PCB6 (Sum av PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180-TEQ)
Marine oljer til humant konsum	1.75 pg/g fat	4.0 pg/g fat	200 pg/g fat

Olje fra raffinert torsk oppdrett, rå laks #1, rå laks #2, rå torsk etter bleking, rå torsk før bleking og raffinert laks inneholdt pesticidet DDT og dets metabolitter, men nivået var svært sprikende fra 16 til 169 ng/g. Det er per i dag ikke noen gitte grenseverdier for pesticider i marine oljer.

Alle oljene inneholdt PBDE og HBCD, sistnevnte med nivåer på mellom 0,08 til 4,53 ng/g. Det er per i dag ikke noen gitte grenseverdier for PBDE og HBCD i marine oljer.

Det ble ikke funnet PAH, PFOS eller TBBPA i noen av oljene. Det vil si at dersom det er noe av disse komponentene tilstede, så er nivået under kvantifiseringsgrensen.



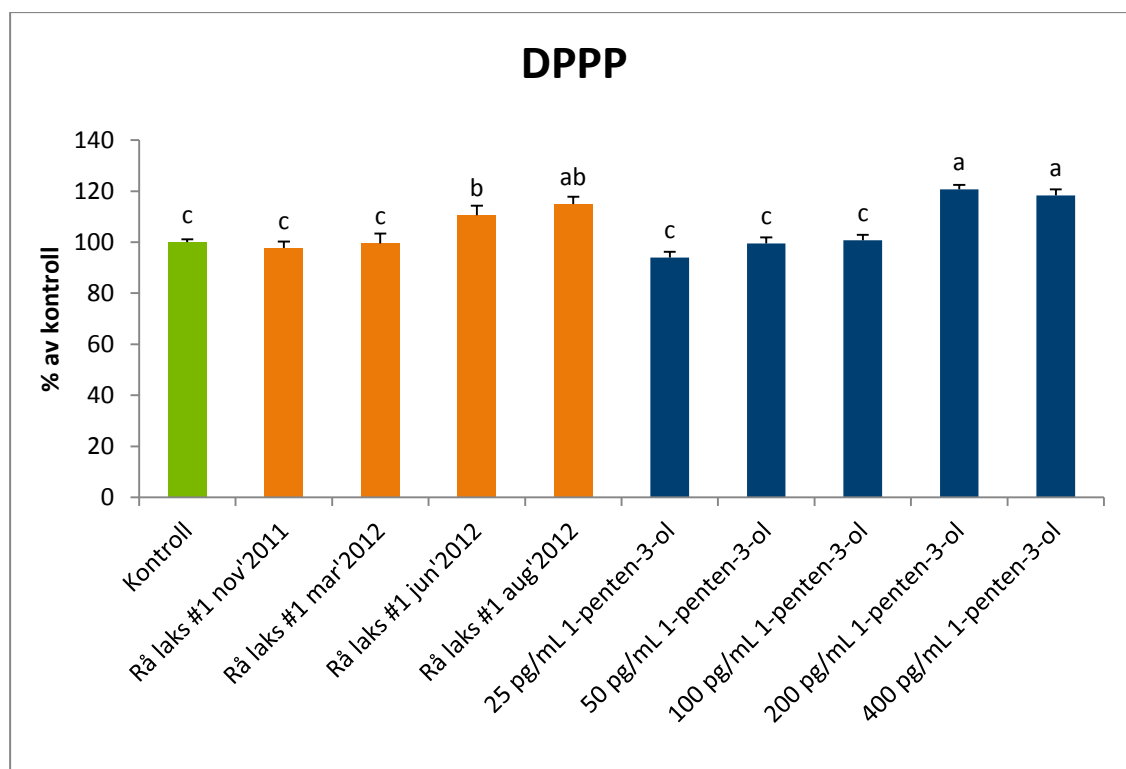
Figur 15 Innhold av dioxin, dioxinlignende PCBer og PCB i 10 ulike marine oljer. * antyder at verdien er over grenseverdien satt for marine oljer til human bruk

3.3 Effekt av oksidasjonsgrad i olje og 1-penten-3-ol på helsemarkører i primærceller fra lakselever (hepatocytter)

Hepatocytter i kultur ble inkubert med enten rå lakseolje #1 med ulik oksidasjonsgrad eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol. Lakseoljen hadde forut for forsøket blitt lagret ved 20°C i henholdsvis 4 mnd, 7 mnd og 9 mnd og dermed fått ulikt innhold av primære og sekundære oksidasjonsprodukter (se Figur 6-10). Alle uttak av lakseoljen hadde totox verdier under 20, noe som betyr at alle uttakene av lakseolje, testet i denne studien, var under Europeisk Farmakopøens krav til olje og godkjent i forhold til humant konsum. Konsentrasjoner av 1-penten-3-ol testet i denne studien var mellom 25-400 pg/mL, hvorav de fire høyeste nivåene tilsvarer nivåene funnet i de fire lakseolje uttakene fra holdbarhetsstudien testet i celleforsøket.

3.3.1 Peroksidering av membranlipider

Diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) inkorporeres raskt i cellemembraner, og brukes som en følsom fluoriserende sensor for lipidperoksidering i membranene. Figur 16 viser høyest lipidperoksidering i cellene (DPPP) inkubert med lakseolje lagret i henholdsvis 7 (juni 2012) og 9 mnd (august 2012). De to høyeste konsentrasjonene av 1-penten-3-ol (200 og 400 pg/mL) gav signifikant høyere lipidperoksidering i cellene enn nivået i cellene tilsatt de laveste konsentrasjonene av 1-penten-3-ol.



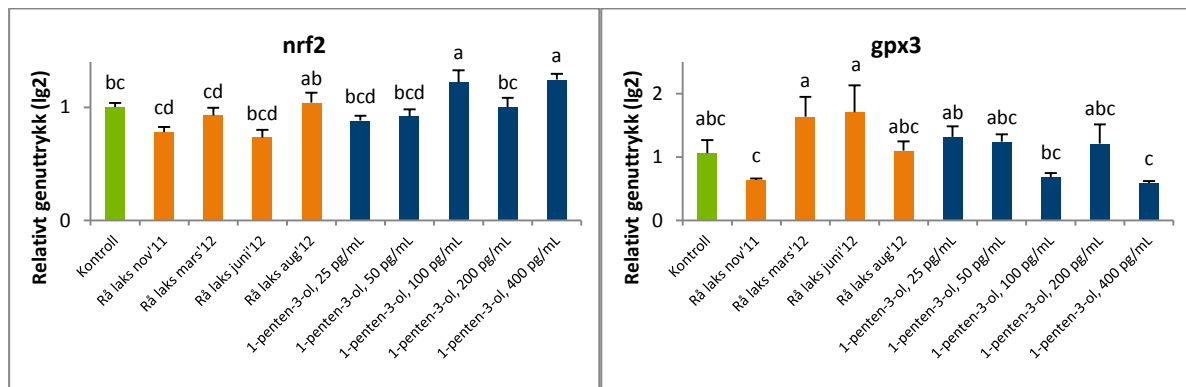
Figur 16 Lipidperoksidering detektert som fluorescence av DPPP i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Kontrollverdien er satt til 100 og responsen i celler er beregnet relativt til kontrollverdien

3.3.2 Genuttryksanalyse

Ved oksidativt stress vil transkripsjonsfaktoren nrf2 oppregulere uttrykk av gener involvert i intracellulært antioksidant forsvar. Figur 17a viser økt genuttrykk av nrf2 i heptocytter tilsatt lakseoljen som er lagret lengst og de høyeste konsentrasjonene av 1-penten-3-ol.

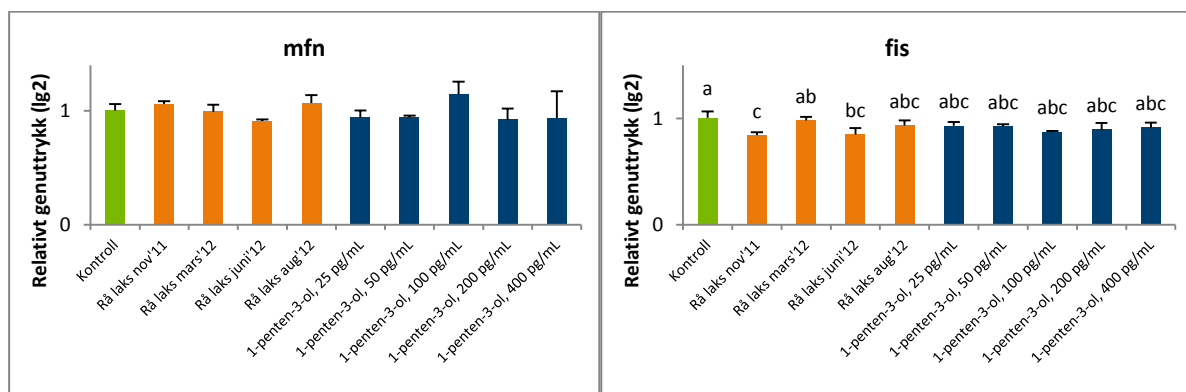
Glutathione peroksidase er regulert av nrf2 og involvert i cellenes antioksidant forsvar. Oljene fra mars og juni 2012 medfører økt genuttrykk av gpx3 (Figur 17 b), sammenliknet med den ferskeste oljen. 1-penten-3-ol ser ikke ut til å gi samme ekspresjonsmønster av gpx3 som lakseoljene. Den høyeste konsentrasjonen av 1-penten-3-ol gir lavere uttrykk av gpx3 enn den laveste konsentrasjonen.

Balansen mellom fusjon og fisjon regulerer morfologien til mitokondrier. Mitofusin (mfn) formidler mitokondriefusjon mens Mitochondrial fission protein 1 (fis1) fremmer mitokondriefisjon. Genuttrykk av fis er nedregulert i celler tilsatt den ferskeste lakseoljen sammenliknet med kontrollcellene og cellene tilsatt lakseolje fra mars 2012 (Figur 17d). En mulig forklaring kan være at moderat harsk olje initierer mitokondriefisjon for håndtere cellulær stress reaksjon. Dette stemmer overens med gpx3 genuttrykk. Det er ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i genuttrykk av mfn (Figur 17c), aif (Apoptose induserende faktor) (Figur 17 e) eller nfkb (involvert i cellulær respons på stress og betennelse) (Figur 17 f). Det kan tyde på at hverken nivåene av miljøgifter og harskningsprodukter i oljene eller 1-penten-3-ol er så høy at cellene blir apoptotiske eller igangsetter en betennelsesreaksjon.



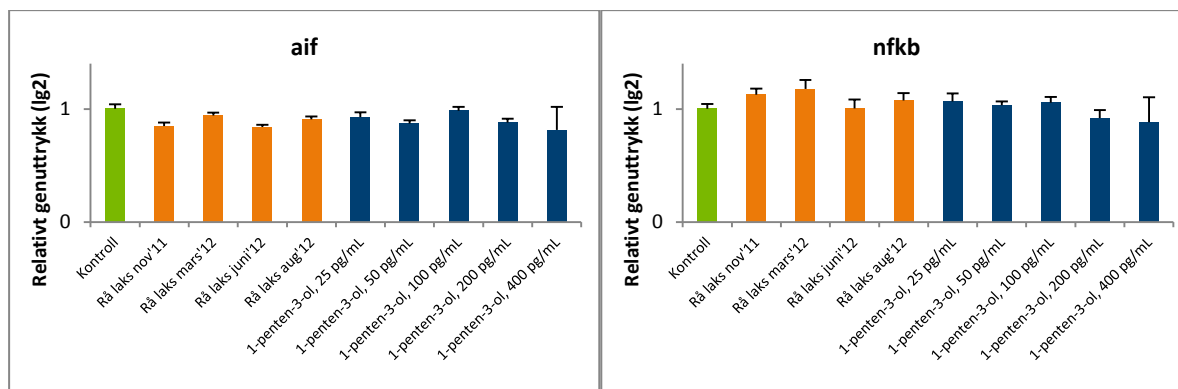
a)

b)



c)

d)



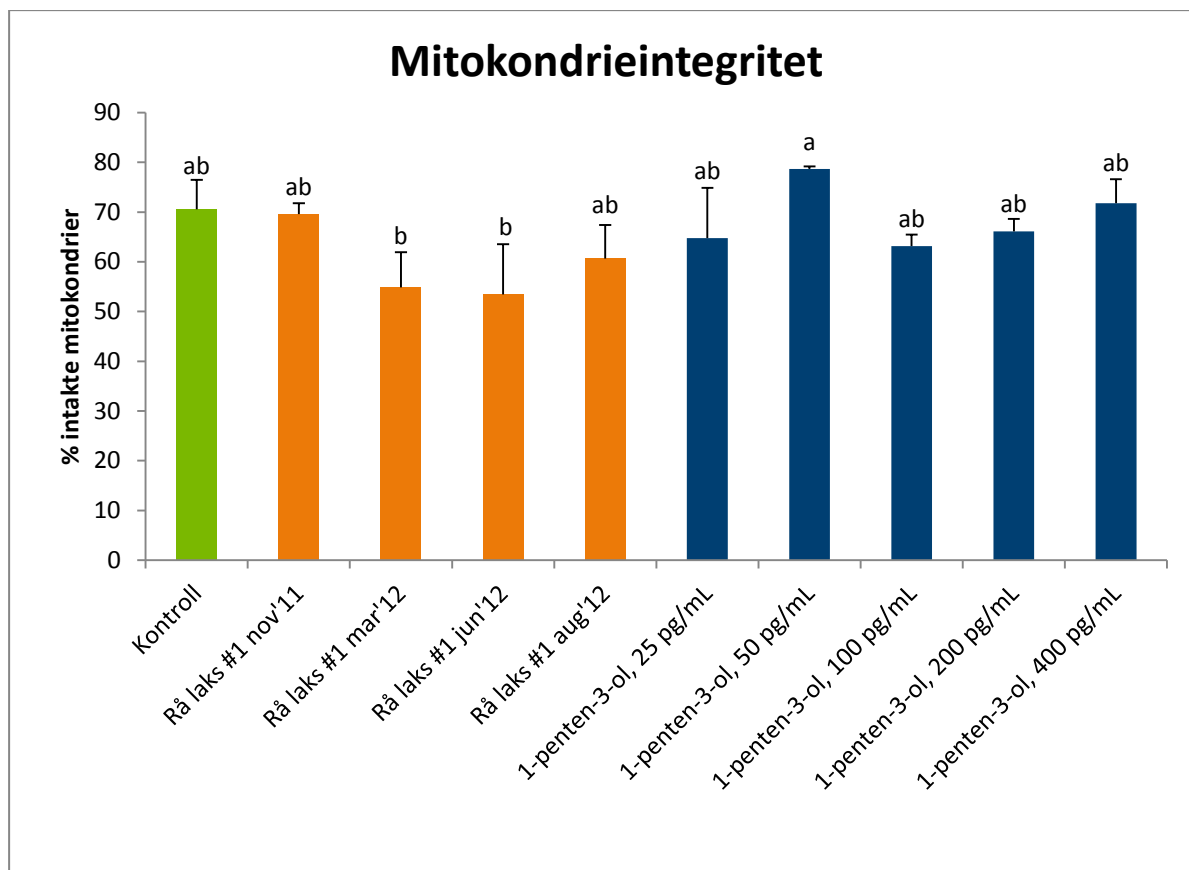
e)

f)

Figur 17 Genuttrykk av en rekke markører involvert i oksidativ stress respons, inflammasjon, mitokondrie helse og celledød. a) Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (*nfr2*), b) glutathione peroxidase (*gpx3*), c) Mitofusin (*mfu*), d) Mitokondrie fisjon protein 1 (*fis*), e) apoptose induserende faktor (*aif*) og f) nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (*nfkb*), i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Data er vist som log₂ av relativt genuttrykk, med standard feil (SEM), n=5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

3.3.3 Cytochrome c oxidase

Cytochrome c oksidase er det siste enzymet i elektrontransportkjeden i mitokondriene. Integriteten av ytre mitokondriemembran kan bestemmes ved å måle cytochrome c oksidase aktiviteten i mitokondriemembraner med og uten detergenten n-dodecyl b-D-maltoside. Det er ingen signifikante forskjeller i mitokondrieintegritet mellom cellene tilsatt de ulike lakseoljene. Det er imidlertid numerisk lavere nivå av intakte mitokondriemembraner i cellene tilsatt de tre oljene som er lagret lengst. 1-penten-3-ol ser ikke ut til å ha effekt på mitokondrieintegriteten.

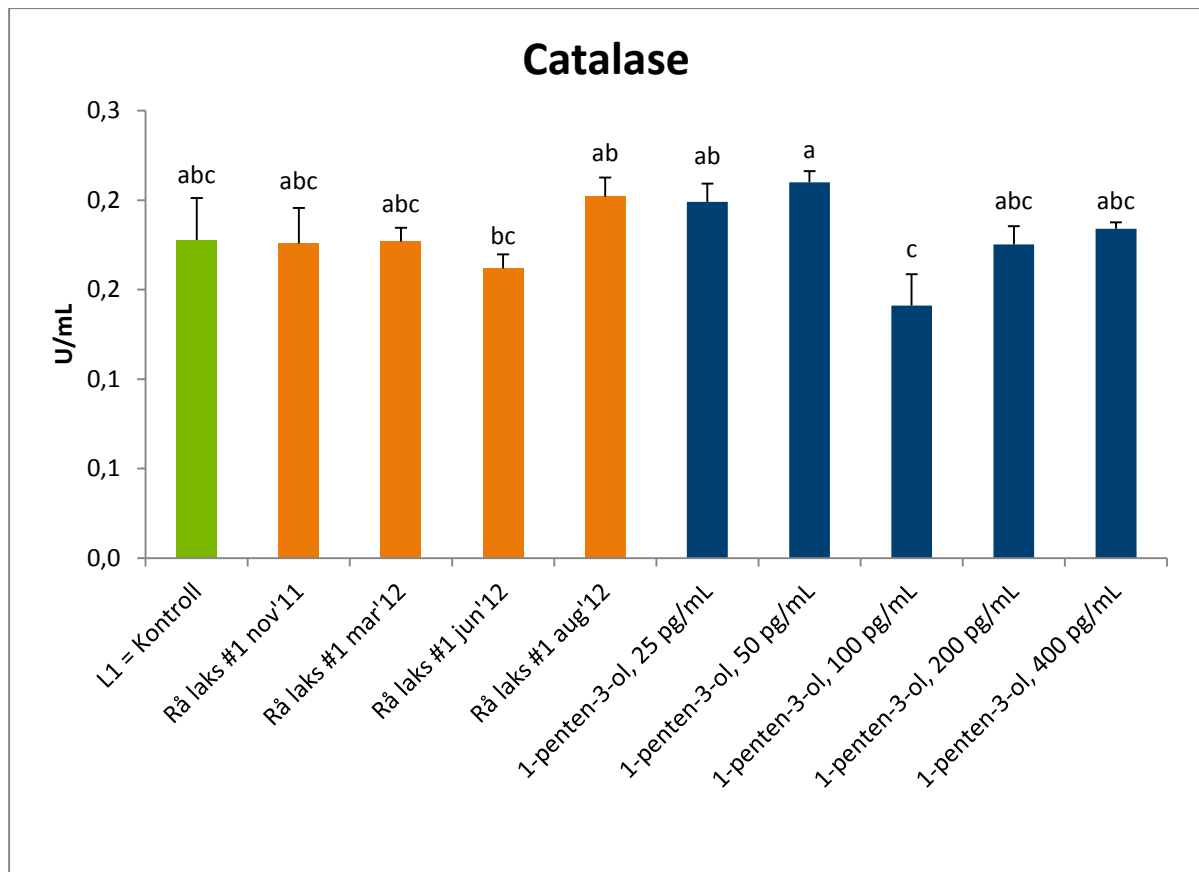


Figur 18 Mitokondrieintegritet i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Mitokondrieintegriteten er bestemt ut i fra cytochrome C oksidase aktivitet i mitokondriemembran med og uten tilsetning av detergenten n-dodecyl b-D-maltoside, Data er vist med standard feil (SEM), n=3-5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

3.3.4 Katalase

Katalase er et enzym som katalyserer reaksjonen der hydrogenperoksid omdannes til oksyngass og vann. Enzymet inngår dermed i organismens beskyttelse mot frie radikaler som ellers kan dannes fra hydrogenperoksid. Katalase kan også oksidere forskjellige giftige stoffer som formaldehyd, maursyre, fenoler og alkoholer.

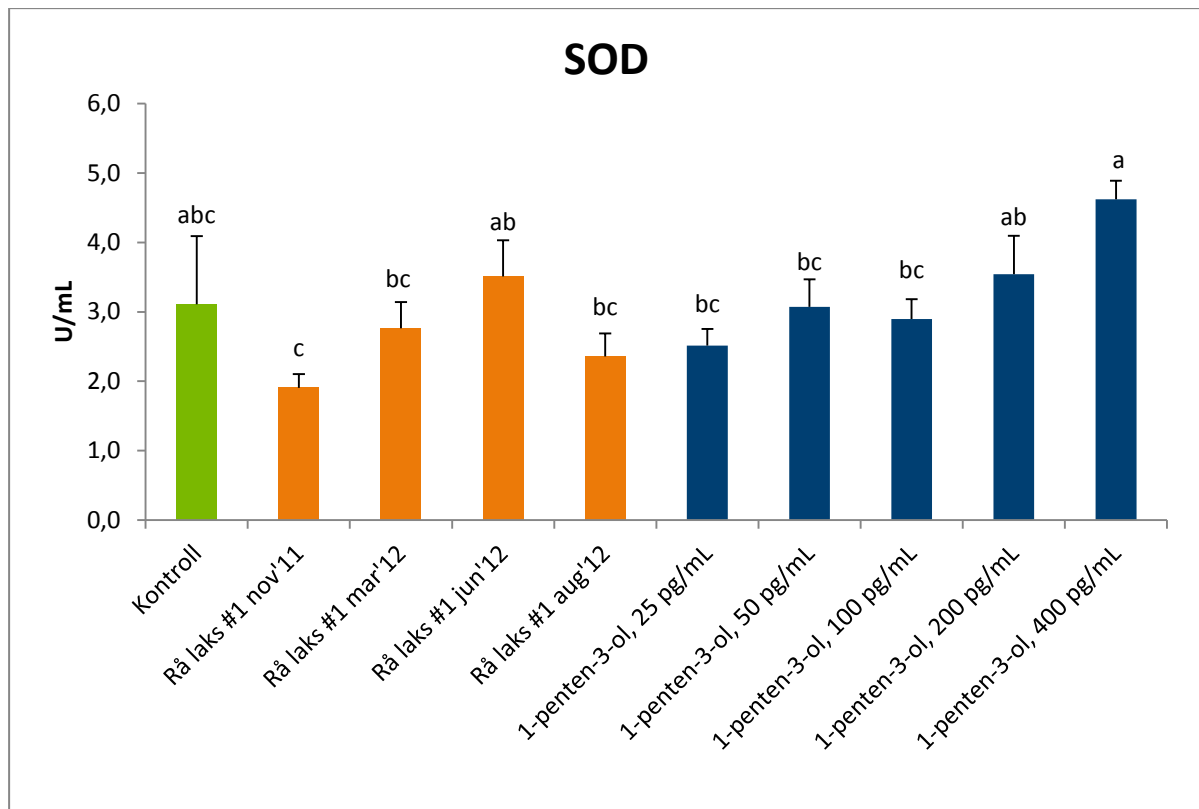
De ulike lakseolje behandligene hadde ingen signifikant effekt på katalase, men det var en svak tendens til økt enzymaktivitet i celler inkubert med oljen lagret lengst. Det var en tendens til redusert enzymaktivitet av katalase i celler inkubert med de høyeste dosene av 1-penten-3-ol sammenlignet med celler inkubert med de laveste dosene. Dette var for øvrig kun signifikant mellom 50 og 100 pg gruppene



Figur 19 Catalaseaktivitet i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Data er vist med standard feil (SEM), n=3-5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

3.3.5 SOD

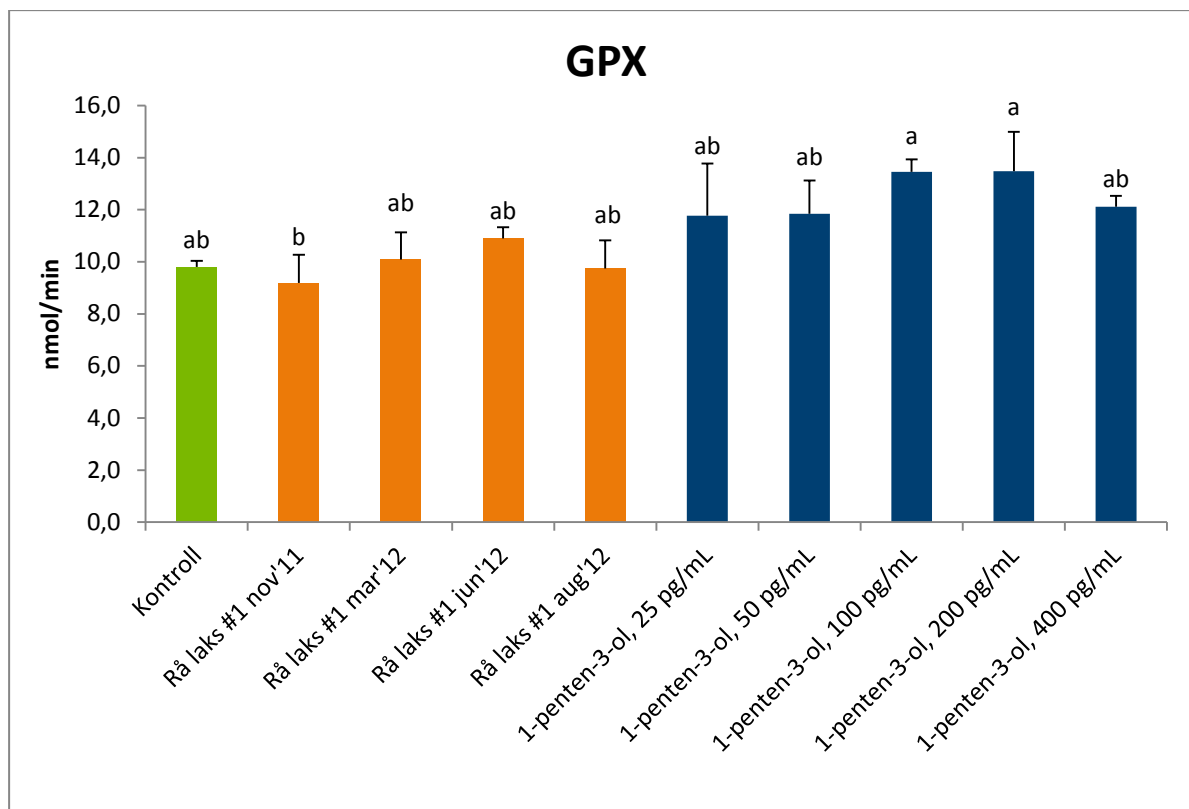
Superoksid dismutase er viktig i cellens antioksidantforsvar. Aktiviteten av SOD øker inntil et visst nivå med harskningsgraden av oljene tilsatt cellene. Den lengst lagrede oljen gir numerisk lavere SOD aktivitet i cellene enn de moderat harske oljene (mars 2012 og juni 2012). Det kan tyde på at SOD stimuleres av moderat harske oljer, men hemmes av mer harske oljer. Tilsetning av økende konsentrasjon av 1-penten-3-ol ser også ut til å stimulere til økt aktivitet av SOD.



Figur 20 SOD aktivitet i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Data er vist med standard feil (SEM), n=3-5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

3.3.6 GPX

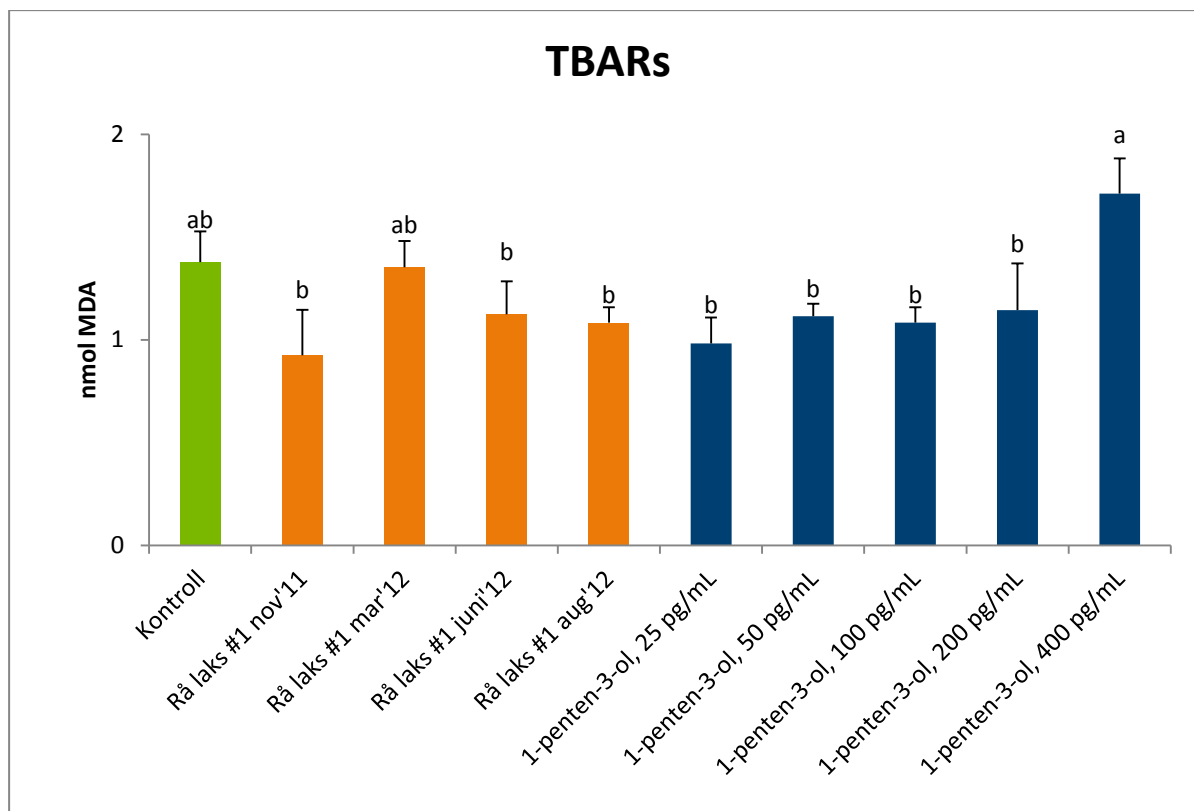
Glutathion peroksidase er involvert i cellens antioksidantforsvar. Det er ingen signifikante forskjeller i GPX aktivitet mellom cellene tilsatt oljene eller mellom cellene tilsatt 1-penten-3-ol. Moderat harske oljer gir imidlertid numerisk noe høyere nivå av GPX enn den ferskeste oljen, mens den lengst lagrede oljen gir lavere aktivitet. GPX aktiviteten følger samme mønster som SOD aktiviteten i cellene tilsatt oljer. GPX aktiviteten i cellene tilsatt olje viser også samme mønster som aktiviteten i cellene tilsatt 1-penten-3-ol, men aktiviteten er signifikant høyere i celler dyrket i medium tilsatt 100 og 200 pg sammenlignet med celler dyrket i medium tilsatt den gode olje ved start av lagringsstudien.



Figur 21 GPX aktivitet i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Data er vist med standard feil (SEM), n=3-5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

3.3.7 TBARs

TBARs dannes som biprodukt av lipidperoksidering. Det er ingen forskjell i TBARs mellom cellene tilsatt de ulike oljene. Den høyeste konsentrasjonen av 1-penten-3-ol gir signifikant høyere nivå av TBARs i cellene sammenliknet med de lavere konsentrasjonene.



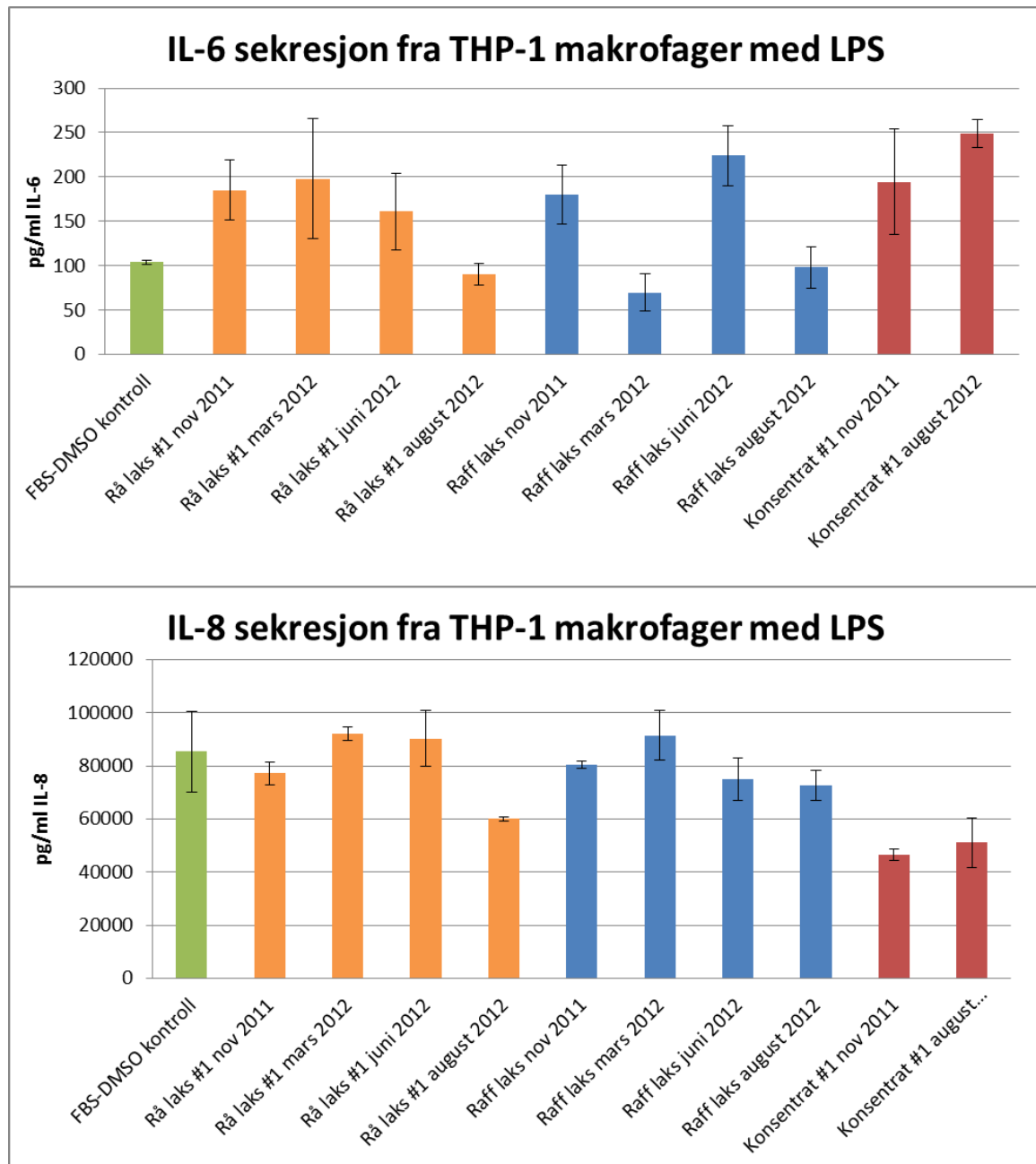
Figur 22 TBARs i hepatocytter inkubert med rå lakseolje (0,5 mg/mL) eller ulike konsentrasjoner av 1-penten-3-ol i 48 timer. Data er vist med standard feil (SEM), n=3-5, ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller

Konklusjon: Våre resultater tyder på at både olje med økende oksidasjonsgrad og 1-penten-3-ol alene i økende konsentrasjon gir noen av de samme responsene i leverceller fra laks. Økende nivå av begge behandlinger ser ut til å gi en moderat økning av lipidperoksidering i cellemembraner, økt aktivitet av de intracellulære beskyttelses enzymer, antioksidantene SOD, GPX og Katalase. Ved oksidativt stress vil transkripsjonsfaktoren nrf2 initiere transkripsjon av gener som koder for intracellulære antioksidanter. Både økende oksidasjonsgrad av olje og økende nivå av 1-penten-3-ol gav signifikant høyere genuttrykk av nrf2 og gpx3. Nrf2-er også viktig når det gjelder å beskytte mitokondriene mot oksidativt stress (Zhang et al., 2013). Lakseoljen ved start av lagringsstudien var av meget god kvalitet og så ut til å gi lavere stressrespons i celler enn kontroll ikke tilsatt olje og kan skyldes en positiv effekt av tilsetning av en omega-3 rik olje. Mitokondriemembranen er spesielt følsom for eventuelle oksidasjonsskader, men de ulike behandlingene forårsaket ingen signifikante endringer i mitokondrieintegritet. Celler tilsatt oljen med lavest oksidasjonsgrad, gav det laveste genuttrykk av mitokondrielt fission protein (fis 1), noe som kan skyldes at en god fiskeolje, omega-3 beskytter mitokondriene mot skade. Dette er i overensstemmelse med et tidligere funn hvor omega-3 fettsyrer beskyttet mitokondriene mot LPS induert skade (Jørgensen et al., 2012).

Resultatene viste ingen signifikante effekter på genuttrykk av faktorer involvert i apoptose (celledød, aif) og betennelse (nfkB), noe som kan tyde på at nivåene av oksidasjonsprodukter er såpass moderate at cellenes eget beskyttelses system med aktivering av intracellulære antioksidanter beskytter cellene mot alvorlige negative effekter av oksidasjonsproduktene.

3.4 Effekt av oksidasjonsgrad i et utvalg oljer på inflammasjonsresponsen til THP-1 makrofager

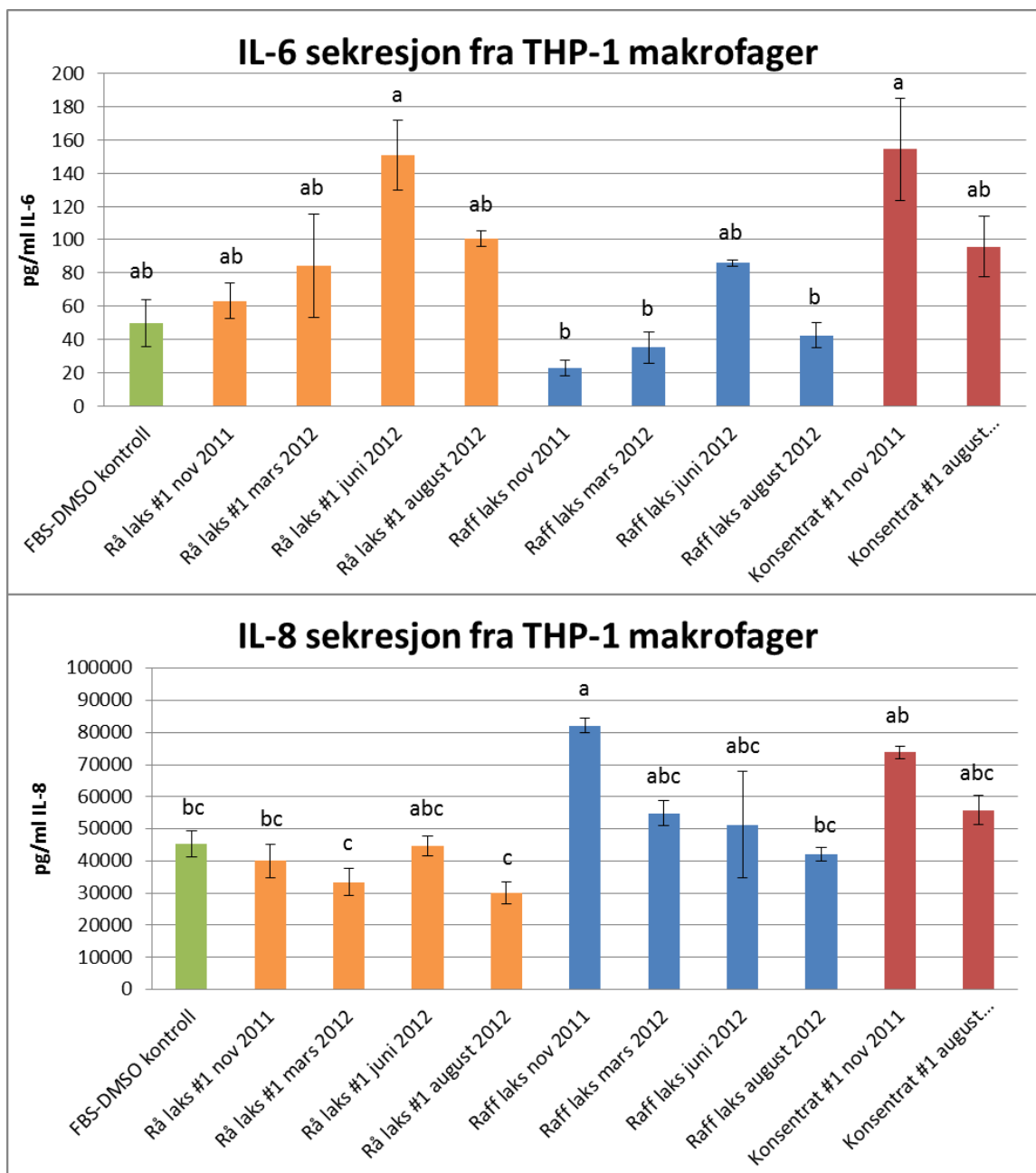
Ingen av oljene hadde noen statistisk signifikant effekt på LPS-stimulert sekresjon av IL-6 og IL-8 (Figur 23). Det er tidligere vist at EPA og DHA har en hemmende effekt på IL-6 sekresjonen fra THP-1 makrofager etter stimulering med LPS (Mullen et al., 2010; Wang et al., 2009). Årsaken til at vi ikke fikk samme effekt i dette forsøket kan skyldes at vi har benyttet oljer med en sammensetning av mange typer fettsyrer i tillegg til EPA og DHA istedenfor rene EPA og DHA fettsyrer. De andre fettsyrene i oljene vil ha en medvirkende effekt på cellene og dermed påvirke responsen fra EPA og DHA.



Figur 23 Sekresjonen av IL-6 og IL-8 fra humane THP-1 makrofager inkubert med ulike oljer med økende grad av oksidering (0,5 mg/ml) i 24 timer før stimulering med LPS i 6 timer (Totalt 30 timer med oljer). Statistiske forskjeller er beregnet ved bruk av «one-way» ANOVA og Tukey test

Derimot var det enkelte statistiske forskjeller mellom oljene på basalsekresjonen av IL-6 og IL-8 (Figur 24). Det er en statistisk forskjell mellom «raffinert laks nov 2011» og «konsentrat #1 nov 2011» på IL-6 sekresjonen som mest sannsynlig skyldes ulik fettsyresammensetning (Tabell 2a og b). Det er også en antydning til at økende oksidasjonsgrad gir først en økt IL-6 sekresjon etterfulgt av en nedgang. Alle tre typer olje viser samme tendens for dette forløpet på IL-6 sekresjonen selv om resultatene ikke er statistisk signifikante. Videre gir «Raffinert laks august 2012» en statistisk signifikant nedgang i IL-8 sekresjonen sammenlignet med «Raffinert laks nov 2011». Denne nedgangen i IL-8 sekresjonen kan skyldes økende oksidasjonsgrad i oljeprøven. Det er igjen en antydning til at økende oksidasjonsgrad også gir redusert IL-8 sekresjon i de øvrige prøvene selv om resultatene ikke er statistisk signifikante.

Konklusjon: Økt oksidasjonsgrad ser ut til å kunne påvirke inflammasjonsresponsen i immunceller fra mennesker til en viss grad. De tre oljene som ble testet på THP-1 makrofagene skiller seg fra hverandre med ulik PV/AV profil, ulik innhold av sekundære oksidasjonsprodukter og ulik fettsyresammensetning. Årsaken til at de ulike oljene gir samme tendensen i cytokinrespons som følge av økende oksidasjonsgrad er derfor ikke opplagt.



Figur 24 Sekresjonen av IL-6 og IL-8 fra humane THP-1 makrofager inkubert med ulike oljer med økende grad av oksidering (0,5 mg/ml) i 30 timer. Statistiske forskjeller er beregnet ved bruk av «one-way» ANOVA og Tukey test. Søyler med ulike bokstaver er statistisk signifikant forskjellige

4 Avsluttende kommentarer og fremtidige perspektiver

I prosjektet ble det samlet inn en rekke marine råoljer fra ulike produsenter. Oljene var av ulik opprinnelse (laks, torsk, Søramerikanske fiskeoljekonsentrater) og med ulik raffineringsgrad. Oljene ble lagret ved henholdsvis 4- og 20°C, og oksidasjonsforløpet ble analysert ved bruk av en rekke analysemetoder som; PV og AV, ulike metoder for analyse av flyktige komponenter, samt ikke flyktige hydroksoy-alkenaler (forteller mer om historikken til oljen, da de i liten grad fjernes ved raffinering).

Ulike analyser av oljekvalitet, gjenspeiler ulik oksidasjonskjemi og forløp i de ulike typer olje pga ulik fettsyresammensetning, miljøgift og kjemisk sammensetning, som igjen antagelig bidrar til ulik avspaltning og dannelse av flyktige sekundære oksidasjonskomponenter (aldehyder). Det er hovedsakelig innholdet av 1-Penten-3-ol som samsvarer med PV og AV verdiene mens innholdet av flyktige aldehyder i stor grad ikke samsvarer. Det er de flyktige aldehydene som gir opphav til den harske smaken i oljene ved oksidering, og ved økt oksidering får man dannet økt mengde flyktige diu-mettede aldehyder.

Oljer med høyere oksidasjonsgrad viste generelt høyere nivå av hydroksoy-alkenaler. De målte konsentrasjoner av tr-4-hydroksoy-2-heksenal varierte fra 0,05-2,3 mikrogr/gram olje. Tilsvarende mengder 4-hydroksoy-nonenal (oksidasjonsprodukt fra n-6 fettsyrer) er tidligere også målt i vegetabiliske fritureoljer (LaFond et al., 2011).

Resultatene så langt viser at man må benytte et spekter av ulike analysemetoder for å få et mest mulig riktig bilde av oljekvalitet og hvordan raffinering påvirker oksidasjons- og lagringsstabilitet. I videre arbeid er det spesielt viktig å utvikle gode analyseverktøy for analyse av de ikke flyktige oksidasjonskomponentene som hydroksoyalkenaler og core-aldehyder, siden disse komponentene er vanskelig å fjerne ved raffinering av oljen. Det er videre viktig å studere hvorvidt disse komponentene innvirker på evt helseeffekt.

Prosjektet har vist at både oksidasjonskomponenter tilstede i ulike oljer og enkelte utvalgte oksidasjonskomponenter alene, kan påvirke cellulære responser involvert i stress og inflammasjonsprosesser. Resultatene peker på viktigheten av å få kunnskap både om hvilket nivå og hvordan de enkelte oksidasjonskomponentene tilstede i oljen kan påvirke cellulære responser. Foreløpige resultater fra cellemodeller må forøvrig verifiseres i mer relevante biologiske systemer som pattedyrmodeller og humane studier før man kan konkludere vedrørende mulige helseeffekter i menneske.

5 Referanser

- Allen, J.C., and R.J. Hamilton. 1994. Rancidity in Foods Chapman & Hall, London.
- AOCS. 1990a. Official Methods and Recommended Practises of the American Oil Chemists' Society. SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS & OILS. AOCS Official Method Cd 18-90. American Oil Chemists' Society Champaign, IL.
- AOCS. 1990b. Official Methods and Recommended Practises of the American Oil Chemists' Society. SAMPLING AND ANALYSIS OF COMMERCIAL FATS & OILS. AOCS Official Method Cd 8-53. American Oil Chemists' Society Champaign, IL.
- Blomhoff, R. 2004. Antioksidanter og oksidativt stress. *Tidsskrift for den norske legeforening*. 124:1643-1645.
- Calder, P.C. 2010. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*. 2:355-374.
- Dannevig, B.H., and T. Berg. 1985. Endocytosis of galactose-terminated glycoproteins by isolated liver cells of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol*. 82:683-688.
- EFSA. 2010. Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity. *In EFSA Journal*. Vol. 8. 1874.
- Esterbauer, H., J. Gebicki, H. Puhl, and G. Jurgens. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 13:341-390.
- EuPharm. 2008. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg.
- Fiamegos, Y.C., and C.D. Stalikas. 2008. Gas chromatographic determination of carbonyl compounds in biological and oil samples by headspace single-drop microextraction with in-drop derivatisation. *Anal Chim Acta*. 609:175-183.
- Jørgensen, S-M., Sørensen, M., Torgersen, J., Østbye, T-K, Aas-Hansen, Ø., Johansen, L.H., Timmerhaus, G., Bou, M., Alarcon, Mørkøre, M., Krasnov, A., Ruyter., B og og Takle, H. (2012) Kunnskap- og metodeutvikling for å styrke laksens robusthet og helse. FHF, Rapport 40/2012.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry*. 226:497-509.
- Frankel, E.N. 2005. Lipid Oxidation. Bridgewater.
- GOED. 2006. Voluntary Monograph (v. 3). Global Organization for EPA and DHA omega-3s.
- Hoshi, M., M. Williams, and Y. Kishimoto. 1973. Esterification of fatty acids at room temperature by chloroform methanolic HCl cupric acetate. *Journal of Lipid Research*. 14:599-601.
- LaFond, S.I., J.P. Jerrell, K.R. Cadwallader, and W.E. Artz. 2011. Formation of 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal in a Corn-Soy Oil Blend: a Controlled Heating Study Using a French Fried Potato Model. *J Am Oil Chem Soc*. 88:763-772.
- Márquez-Ruiz, G., M.C. García-Martínez, and F. Holgado. 2008. Changes and Effects of Dietary Oxidized Lipids in the Gastrointestinal Tract. *Lipids Insights*. 2 11-19.
- Mason, M.E., and G.R. Waller. 1964. Dimethoxypropane Induced Transesterification of Fats + Oils in Preparation of Methyl Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Anal Chem*. 36:583-&.
- Mullen, A., C.E. Loscher, and H.M. Roche. 2010. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *The Journal of nutritional biochemistry*. 21:444-450.
- Olsen, E., G. Vogt, K. Saarem, T. Greibrokk, and A. Nilsson. 2005. Autoxidation of cod liver oil with tocopherol and ascorbyl palmitate. *J Am Oil Chem Soc*. 82:97-103.

- Ottestad, I., G. Vogt, K. Retterstol, M.C. Myhrstad, J.E. Haugen, A. Nilsson, G. Ravn-Haren, B. Nordvi, K.W. Bronner, L.F. Andersen, K.B. Holven, and S.M. Ulven. 2012. Oxidised fish oil does not influence established markers of oxidative stress in healthy human subjects: a randomised controlled trial. *The British journal of nutrition*. 108:315-326.
- Rieder, A., S. Grimmer, S.O. Kolset, T.E. Michaelsen, and S.H. Knutsen. 2011. Cereal beta-glucan preparations of different weight average molecular weights induce variable cytokine secretion in human intestinal epithelial cell lines. *Food Chem*. 128:1037-1043.
- RUBIN. 2009. N-3 oljer fra ferskt marint råstoff. En mulig konkurransestrategi for den norske n-3 industrien. Stiftelsen RUBIN, Trondheim, Norway.
- Ruyter, B., S. Grimmer, T. Thorkildsen, M. Todorcevic, M. Lalic, and G. Vogt. 2010. Lite oksiderte omega-3 oljer og potensielle helsefordeler. En screening av omega-3 oljer med hensyn til variasjon i oksidasjonsgrad, innhold av oksidasjonsprodukter og effekt på markørssystemer. FHF, RUBIN. 62.
- Shahidi, F., and U.N. Wanasundara. 1998. Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils. *In Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. C.C. Akoh and D.B. Min, editors. Marcel Dekker Inc., New York. 377-396.
- Todorcevic, M., S. Skugor, A. Krasnov, and B. Ruyter. 2010. Gene expression profiles in Atlantic salmon adipose-derived stromo-vascular fraction during differentiation into adipocytes. *Bmc Genomics*. 11.
- VKM. 2011. Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oil. Norwegian Scientific Committee for Food Safety.
- Wang, S., D. Wu, S. Lamon-Fava, N.R. Matthan, K.L. Honda, and A.H. Lichtenstein. 2009. In vitro fatty acid enrichment of macrophages alters inflammatory response and net cholesterol accumulation. *The British journal of nutrition*. 102:497-501.
- Zhang, Y.K., K.C. Wu, and C.D. Klaassen. 2013. Genetic activation of Nrf2 protects against fasting-induced oxidative stress in livers of mice. *PLoS one*. 8:e59122.



ISBN 978-82-8296-108-0 (trykt)
ISBN 978-82-8296-109-7 (pdf)
ISSN 1890-579X