

d liver



Prosjekt #900919 -
Biotilgjengelighet for bioaktive
peptider

Sluttrapport

Prosjekttittel	Biotilgjengelighet for bioaktive peptider
Prosjektansvarlig	D'Liver AS
Prosjektleder	Kjetil H. Elvevold Mobil: +47 40 22 03 65
Oppdragsgiver	Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond Universitetsgata 10 0659 Oslo
Styringsgruppe	Jaran Rauø, Marealis (leder) Kjartan Sandnes, Biomega Tore Remman, Nutrimar
Analyselokaler	Barents BioCentre Lab Sykehusveien 21 9019 Tromsø
Rapport utstedt	13 mars 2014

Ansvarlig personell

Følgende personell var ansvarlige for sentrale elementer i studien:

Prosjektleder	Kjetil H. Elvevold, PhD, D'Liver
Daglig leder	Mari Nilsen, D'Liver
Ansvarlig dyreforsøk	Britt Fuglesteg, PhD, D'Liver
Ansvarlig LC-MS analyse	Terje Vasskog, PhD, Norut

Innhold

Innhold.....	4
1. Sammendrag.....	6
2. Bakgrunn	7
2.1. D'Liver.....	8
2.2. Norut.....	8
2.3. Prosjektbeskrivelse	9
2.3.1. Trinn 1: Utvikling og validering av metode for analyse av peptid i blodplasma	9
2.3.2. Trinn 2: Pilotstudie – Studie i forsøksdyr.....	10
2.3.3. Trinn 3: Hovedstudie – Studie i forsøksdyr	12
3. Gjennomføring	13
3.1. Material og Metode.....	13
3.1.1. Forsøksdyr	13
3.1.2. Material.....	14
3.2. Trinn 1 – Ekstraksjon og analyse av FSY	14
3.2.1. Analyse ved bruk av LC-MS	14
3.2.2. Ekstraksjon av FSY fra plasma	16
3.3. Trinn 2 – Pilotstudie – Studie i forsøksdyr	17
3.3.1. Testgruppe	17
3.3.2. Kontrollgruppe	17
3.3.3. Prøveopparbeiding	18
3.3.4. LC-MS	18
3.4. Trinn 2 – Del 2.....	19
3.4.1. Bakgrunn	19
3.4.2. Oppgaver	19
3.5. Trinn 3 - Hovedstudie – Studie i forsøksdyr	21
3.5.1. Testgruppe	21
3.5.2. Kontrollgruppe	22

3.5.3. Prøveopparbeiding	22
4. Resultater og diskusjon	23
4.1. Trinn 1.....	23
4.2. Trinn 2 – Pilotstudie – Studie i forsøksdyr	23
4.3. Trinn 2 – Del 2.....	27
4.4. Trinn 3.....	29
4.5. Avvik fra protokollen	31
5. Konklusjon.....	33

1. Sammendrag

Hensikten med prosjektet var å utvikle en metode for å dokumentere biotilgjengelighet for marine peptider etter oral administrasjon.

Biotilgjengeligheten ble målt i blodprøver fra forsøksdyr og tripeptidet FSY ble brukt som modellpeptid. Forsøksdyrene ble fastet i 4 timer før de ble sondeført med 100 mg/kg FSY suspendert i vann. Etter 15-60 minutter ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet til hepariniserte rør som så ble sentrifugert for å lage plasma. Prøver av aorta ble klippet ut og homogenisert. Plasma og aortamateriale ble denaturert med Gu-SCN før syrefelling av proteiner med TCA. Supernatanten ble filtrert og tilsatt en kjent mengde ^{13}C -FSY som internstandard før den ble ekstrahert på en fast fase kolonne. Etter ekstraksjon ble prøven analysert ved hjelp av liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS. Mengden FSY i prøven ble deretter bestemt semikvantitativt gjennom forholdet mellom FSY og ^{13}C -FSY.

3 milepæler ble satt for prosjektet. Første milepæl for prosjektet var å undersøke om FSY lot seg måle i blodplasma. Dette ble oppnådd ved å tilsette FSY til plasma og deretter detektere FSY ved hjelp av LC-MS. Neste milepæl bestod i å fastslå om FSY passerer tarmveggen og absorberes til blod og resultatene viste at ved å administrere en høy konsentrasjon av FSY (100 mg/kg) kunne det detekteres i blodet etter 1 time. Vi fant derimot ikke FSY i aorta-prøver. Siden metodene ga resultater med til dels store variasjoner, ble det gjort forsøk på å gjøre metoden mer robust. For å frigjøre mer FSY fra plasmakomponenter, ble prøvene tilsatt acetonitril, metanol, urea og natrium dodecyl sulfat uten at problemet med store resultatvariasjoner ble løst. Plasmaprøvene ble varmet opp, pH ble endret og vi behandlet med en proteasecocktail, men heller ikke det ga ønsket resultat. Pga usikkerheten i måle metodene kunne vi ikke konkludere med at co-administrasjon med andre proteiner (kasein) påvirket opptak av FSY, eller bestemme minimum dose for at FSY skal kunne tas opp til blodplasma over tarmvegg. Variasjonene i resultatene gjorde at vi ikke oppnådde den tredje milepælen.

Selv om vi i disse analysene har konstatert at peptidet FSY passerer tarmveggen og absorberes til blodplasma i dyremodell (rotte), må det utføres flere undersøkelser, antakelig med annen metodologi for å oppnå alle milepælene i prosjektet.

2. Bakgrunn

Marine proteiner og peptider er spådd å bli den neste store utviklingen innenfor marin ingrediensindustri. Mange utfordringer, ikke minst tilpasning til det regulatoriske regelverket, må avklares for å lykkes med kommersialisering innen dette feltet.

For produkter som skal selges med godkjent helsepåstand er det europeiske mattilsynet (EFSA) spesielt krevende med hensyn til dokumentasjon av sammenheng mellom produkt og påstått virkning. Mange aktører får ikke EFSA's godkjenning for å markedsføre og selge produktet med godkjent helsepåstand på grunn av manglende dokumentasjon av sammenhengen mellom årsak (produkt) og virkning (påstått helseeffekt).

Kliniske effektstudier er ofte ikke tilstrekkelig, og ytterligere dokumentasjon knyttet direkte til hvordan produktet virker (mekanisme) må fremskaffes for å underbygge målte kliniske effekter.

I dette prosjektet skulle det undersøkes om oralt administrerte bioaktive peptider passerer fra tarmen til blodsirkulasjonen. Selv om det ble fokusert på et bestemt peptid som hemmer et blodtrykksregulerende enzym, vil de beskrevne analysemetoder – forutsatt at de fungerer for FSY - også kunne benyttes på peptider med andre biologiske aktiviteter.

Betegnelsen "bioaktive peptider" henspiller på at disse substanser har biologisk effekt. Peptider som antas å ha en biologisk effekt, analyseres først i såkalte *in vitro* assays, dvs. analyser i cellekulturer eller andre typer testsystem uten å bruke intakte dyr eller mennesker. *In vitro* assays som påviser effekt, følges gjerne opp med effekt-studier i dyr (preklinisk) og mennesker (klinisk).

Studier i dyr eller mennesker brukes for å dokumentere den faktiske biologiske effekten. For oralt administrerte peptider kan dette være forbedret blodsukkerregulering, eller effekter knyttet til inflammasjonshemming, kolesterolsenking eller blodtrykkdemping.

En positiv effekt kan i mange tilfeller måles i kliniske studier, men den faktiske årsaken til at peptidene virker systemisk, og slik som antatt, mangler.

Angiotensin-konverterende enzym (ACE) er en viktig fysiologisk regulator av blodtrykket, og representerer et nøkkelenzym i behandling av høyt blodtrykk. Blodtrykkdempende peptider antas å virke ved å hemme ACE.

In vitro målinger har vist at blodtrykksdempende peptider er ACE-hemmende, og man antar at den observerte blodtrykkshemmende effekten av slike peptider administrert oralt i dyr eller mennesker skyldes at peptidene virker ACE-hemmende også *in vivo*. Men den faktiske mekanismen har man pr i dag ikke dokumentert, og det er lite dokumentasjon på at ACE-hemmende peptider passerer fra tarmen til blodsirkulasjonen. Kun ett arbeid¹ rapporterer at oralt administrerte tripeptid gjenfinnes i endotelceller i aortaveggen, og forfatterne spekulerer i at disse peptidene kan ha en ACE-hemmende effekt.

For alle *in vitro* analyserte og dokumenterte bioaktive peptider, med antatt effekt på blodtrykk, kolesterol, inflammasjon, blodsukkerregulering eller andre fysiologiske og patofysiologiske parametere er det mht. dokumentasjon og godkjennelse viktig å finne svar på følgende:

- Passerer et oralt administrert peptid fordøyelsen, og passerer det tarmvegg og lever til blodsirkulasjonen?
- Om det påvises i blod, hvor raskt skjer overføringen og hvor stor andel av peptidet overføres totalt fra tarm til blod?

Jo flere slike spørsmål man kan besvare, desto mer relevant kunnskap vil ligge til grunn for å dokumentere peptidets effekt i kroppen.

2.1. D'Liver

D'Liver er en tjenesteleverandør for den biofarmasøytiske industrien og holder til i Tromsø. Basert på D'Liver's spesialiserte kunnskap om opptaksmekanismene i lever tilbys unike produkter og tjenester for å løse utfordringer i forhold til biofilgjengelighet og uønsket opptak av legemidler i lever. D'Liver er en spin-off bedrift fra Universitetet i Tromsø.

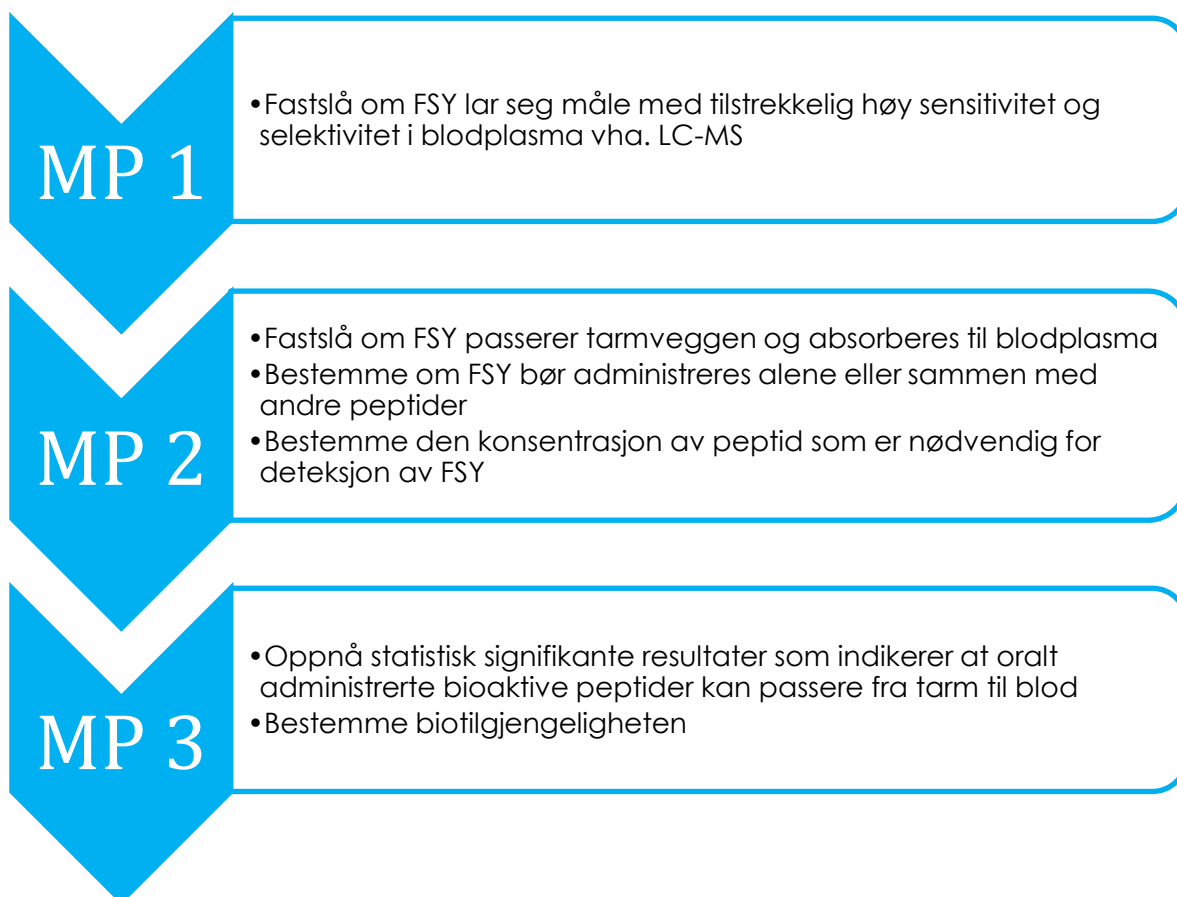
2.2. Norut

Northern Research Institute (Norut) bygger på 30 års erfaring og er et tverrfaglig forsknings- og innovasjonskonsern som leverer tjenester av høy kvalitet og god anvendbarhet for sine oppdragsgivere innen teknologi og samfunnsvitenskap. Norut er lokalisert i alle de tre nordnorske fylkene, og har spesiell kompetanse på nordområdene.

¹Kawaguchi K, Nakamura T, Kamiie J, Takahashi T, Yamamoto N. Accumulation of ACE inhibitory tripeptides, Val-Pro,Pro and Ile-Pro-Pro, in vascular endothelial cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(9), 1792-1795, 2012.

2.3. Prosjektbeskrivelse

Prosjektet ble planlagt utført i 3 trinn med følgende milepæler (MP):



2.3.1. Trinn 1: Utvikling og validering av metode for analyse av peptid i blodplasma

Et tripeptid (FSY, fenylalanin-serin-tyrosin) brukes som modell-peptid for å undersøke om oralt tilført peptid kan detekteres i blodplasma. Som viktig innledende trinn er det nødvendig å avklare hvorvidt FSY lar seg måle med tilstrekkelig høy sensitivitet og selektivitet vha. liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). Til dette må det syntetiseres en ^{13}C merket internstandard med samme aminosyre sekvens som FSY (^{13}C -FSY). Siden ^{13}C -FSY ikke er radioaktiv er den derfor enkel å håndtere, samt ideell for å detektere og kvantifisere FSY i LC-MS.

Internstandarden vil bli analysert i en vannbasert buffer for å klarlegge retensjon, ionisering og respons i LC-MS-systemet. Forskjellige stasjonære og mobile faser, samt gradienter for å finne de beste deteksjonsbetingelsene vil bli utprøvd. Når optimale betingelser er fastlagt, tilsettes ^{13}C -FSY til en prøve med blodplasma, enten alene eller sammen med umerket FSY. Deretter må metoder utarbeides for å slå fast om det er mulig å ekstrahere FSY fra blodplasma før deteksjon i LC-MS. I LC-MS analysen sammenholdes signalet av FSY med signalet fra ^{13}C -FSY. Ratio mellom disse signalene brukes for å beregne mengden FSY i prøven.

Metoden valideres i henhold til U.S. Food and Drug Administration guidelines. Uten en slik validering kan kvantitative målinger av FSY i prekliniske og kliniske forsøk vanskelig benyttes.

Arbeidet med å utvikle og validere metodene for analyse av FSY vil utføres av Terje Vasskog, Norut. D'Liver vil ha koordineringsansvaret.

Milepæl 1

- Fastslå om FSY lar seg måle med tilstrekkelig høy sensitivitet og selektivitet i blodplasma vha. LC-MS

2.3.2. Trinn 2: Pilotstudie – Studie i forsøksdyr

Iverksettes etter at milepæl 1 er oppnådd.

Vitenskapelige publikasjoner^{2,3} om biotilgjengelighet for bioaktive peptider og ikke-publiserte data fra Marealis AS^{4,5} indikerer at konsentrasjonen av peptider i

² Matsui et al (2002): "VAL-TYR as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system", *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 29, 204–208

³ Vermeirssen et al (2004): "Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides", *British Journal of Nutrition* (2004), 92, 357–366.

⁴ "Effects of repeated administration of test item on blood pressure in the SHR rats", SBW Toxis, Final Study Report TOX40137-10.

⁵ MARE-study: "Assessment on antihypertensive effect and safety of bioactive peptides derived from Coldwater Shrimp (*Pandalus borealis*) in healthy subjects with mild or moderate hypertension. A randomized, double-blind, placebo-controlled, three-armed parallel group, one-centre pilot trial with a 4-week run-in period, a 8-week intervention period and a 3-week follow-up period", Oy Foodfiles Lt, February 26, 2013.

en oral dosering må være høyere enn 60 mg/kg for at peptidene skal kunne transporteres gjennom tarmvegg og absorberes til blodplasma. Det antas at dersom konsentrasjonen av peptidene/proteinene er for lave, vil de ikke absorberes til plasma, men degraderes av proteaser i tarmveggen.

Resultater fra slike pilotanalyser er viktige som grunnlag for design av hovedstudie der biotilgjengelighet av peptider undersøkes. Pilotstudien innebærer bruk av forsøksdyr (rotter) som gis oral gavage (sondeforing direkte i magesekken).

Lav konsentrasjon av peptider

Kjent mengde FSY administreres ved oral gavage til forsøksdyr.

Høy konsentrasjon av peptider

Kjent mengde FSY administreres sammen med 60 mg/kg andre vilkårlige peptider ved oral gavage til forsøksdyr.

Blodprøver fra hvert forsøksdyr blir tatt med gitte tidsintervaller over en periode på opp til 24 timer. Kjent mengde ¹³C-FSY tilsettes hver blodprøve. Prøvene behandles for å ekstrahere FSY. Deretter analyseres prøvene på LC-MS, og signalet av FSY sammenliknes med signalet fra ¹³C-FSY. Ratio mellom disse signalene brukes for å beregne mengden FSY i blodprøven.

D'Liver vil utføre pilotstudien i samarbeid med Norut. D'Liver vil ha koordineringsansvaret for studien.

Milepæl 2

- Fastslå om FSY passerer tarmveggen og absorberes til blodplasma
- Bestemme om FSY bør administreres alene eller sammen med andre peptider
- Bestemme den konsentrasjon av peptid som er nødvendig for deteksjon av FSY

2.3.3. Trinn 3: Hovedstudie – Studie i forsøksdyr

Iverksettes etter at milepæl 2 er oppnådd.

Kjent mengde FSY med eller uten vilkårlige peptider, basert på resultater fra pilotstudien, administreres ved sondeforing direkte i magesekken på 6 forsøksdyr. 6 kontrolldyr får samme behandling, men uten FSY.

Blodprøver i alle forsøksgruppene blir tatt med gitte tidsintervaller. Tidsintervallene bestemmes ut fra resultatene fra pilotstudien. Kjent mengde ¹³C-FSY tilsettes hver blodprøve. Prøvene behandles på samme måte som i pilotstudien for å beregne mengden FSY i hver blodprøve.

D'Liver vil utføre denne prekliniske hovedstudien i samarbeid med Norut. D'Liver vil ha koordineringsansvaret for studien.

Milepæl 3

- Oppnå statistisk signifikante resultater som indikerer at oralt administrerte bioaktive peptider kan passere fra tarm til blod
- Bestemme biotilgjengeligheten

3. Gjennomføring

3.1. Material og Metode

3.1.1. Forsøksdyr

Dyreforsøket ble godkjent 6. juni 2013 av Forsøksdyrutvalget v/ ansvarshavende ved Avdeling for komparativ medisin (AMK), Helsevitenskapelig fakultet, UiT, godkj. nr: FOTS id 5474.

Oppstillings- og miljøforholdene var oppfylt etter retningslinjene i appendiks A i Europarådets Forsøksdyrkonvensjon av 18. mars 1986.

Det ble benyttet Sprague Dawley hannrotter fra Charles River Laboratories, Research Models and Services, Tyskland. Dyrene ble levert av Scanbur, Nittedal, Norge.

Rottene ble bestilt ut fra vekt. Vekten på rottene var mellom 300 og 500 g.

Rottene ble plassert med 2 dyr pr bur og akklimatisert i en periode på minst 7 dager før forsøk. Oppstillingsrommene holdt en temperatur på $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ og en relativ fuktighet på 40 – 70 %, og ble belyst med en syklus på 12 timer lys (fra omtrent kl. 06.00 til 18.00) og 12 timer mørke samt luftveksling 20 ganger/t. Dyrene ble føret med RM1 (P) fra Special diet service. Dyrene fikk mat og springvann ad libitum.

Randomisering

Rottene ankom fra leverandøren i esker á 3-5 dyr og ble deretter fordelt tilfeldig i bur med 2 rotter i hvert bur av ansatte ved Avdeling for komparativ medisin (AKM). Burene ble valgt tilfeldig av forskeren og begge rottene ble avlivet samme dag for å unngå stressituasjonen som oppstår dersom en rotte blir alene i buret. Siden dette var akutforsøk ble prøvene fra forsøksdyrene tatt fortløpende samme dag og registrert med en tallkode av forsøksdyroperatøren. Prøvene ble levert som tallkoder til LC-MS operatøren og resultatene fra LC-MS ble til slutt knyttet sammen med de enkelte forsøksdyr.

3.1.2. Material

Tripeptid FSY med >98 % renhet ble levert fra GenScript (New Jersey, USA). Kasein ble levert fra MP Biomedicals (California, USA). ¹³C merket FSY ble syntetisert ved Norut med isotopmerkede aminosyrer levert fra Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, USA) og ordinære aminosyrer fra Novabiochem (Darmstadt, Tyskland). Guanidin-tiocyanat (Gu-SCN) og trikloreddiksyre (TCA) ble levert av Sigma-Aldrich (Oslo, Norge). Renheten til den isotopmerkede aminosyren er oppgitt til 98 %, noe som igjen påvirker renheten til ¹³C-FSY.

Formulering og oppveining av Gu-SCN, TCA, FSY og kasein ble gjort av D'Liver.

3.2. Trinn 1 – Ekstraksjon og analyse av FSY

Milepæl 1

- Fastslå om FSY lar seg måle med tilstrekkelig høy sensitivitet og selektivitet i blodplasma vha. LC-MS

Trinn 1 ble igangsatt 5. juni 2013.

FSY ble analysert ved å benytte et LC-MS system.

3.2.1. Analyse ved bruk av LC-MS

Instrument:

- Waters Acquity UPLC
- Waters Xevo TQ MS

Analysen ble utført med en C18 kolonne (Waters Acquity C18 2,1x150 mm 1,7 µm) med følgende gradient:

Tid	Flow (ml/min)	% A	% B
0	0,6	98	2
2	0,6	98	2
6	0,6	10	90
10	0,6	10	90

Tabell 1. Gradient for væskechromatografisk eluering av FSY på LC-MS.

Mobilfase A inneholdt H₂O med 0,1 % maursyre, mens mobilfase B inneholdt acetonitril med 0,1 % maursyre.

LC-MS-analysen ble utført med en såkalt Multiple Reaction Monitoring metode. Dette innebærer at man isolerer FSY på bakgrunn av massen til molekylet, for så å fragmentere det til mindre deler som igjen detekteres av en detektor basert på massen til fragmentene.

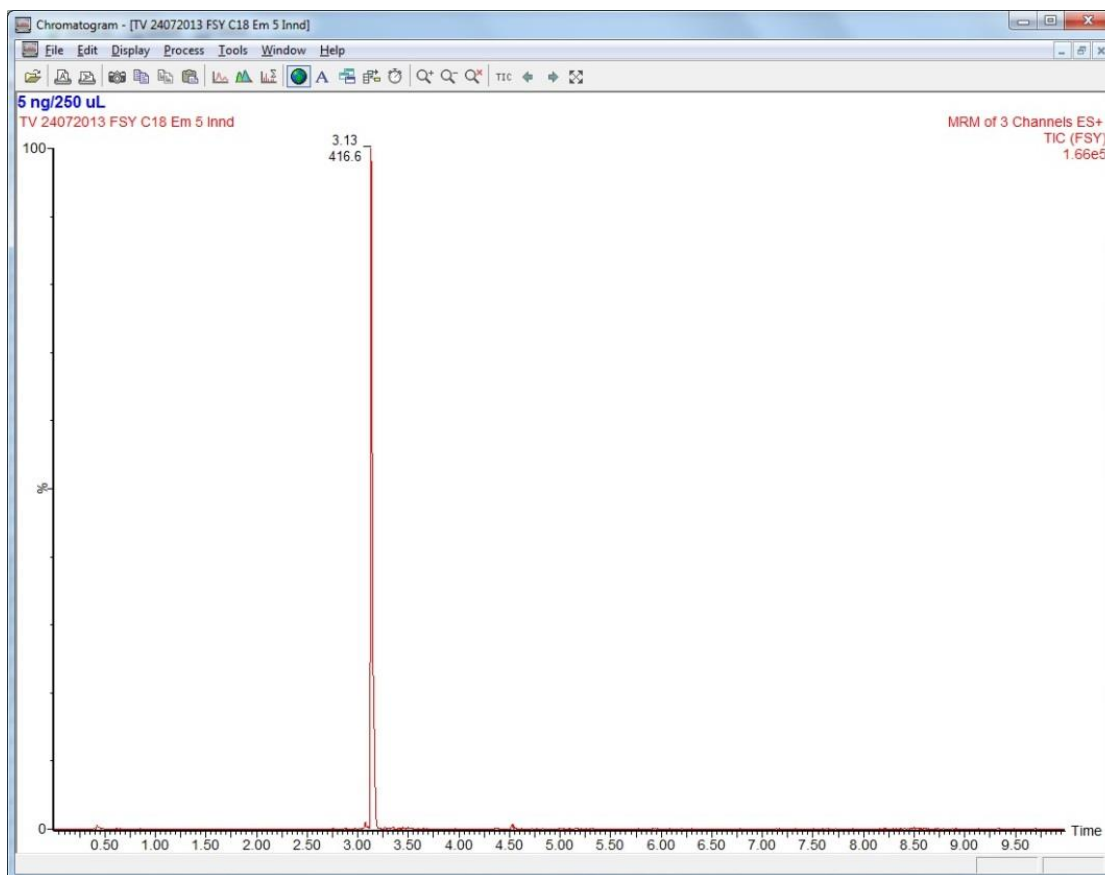
3 fragmenteringer ble brukt for å øke selektiviteten til metoden. Kun når alle 3 fragmenter detekteres i riktig ratio i forhold til hverandre kan man konkludere sikkert at FSY er detektert.

Massen til FSY er 416,6 Da, og følgende fragmenteringer ble brukt:

Forbindelse	Molekyl ion (m/z)*	Fragmentering (m/z)	Dwell (s)	Kjegle spenning (V)	Kollisjons energi (V)
FSY	416,6	207,25	0,1	25	15
FSY	416,6	235,30	0,1	25	15
FSY	416,6	269,30	0,1	25	15

Tabell 2. Fragmentering av FSY. *m/z = mass-to-charge ratio, altså masse delt på ladning. FSY vil i dette tilfellet ha en ladning på 1, så m/z vil tilsvare massen på 416,6.

En tilsvarende metode ble brukt for å detektere ¹³C-FSY.



Figur 1. Kromatogram av FSY med en konsentrasjon på 5 ng/250 μ l ekstrahert fra plasma. FSY eluerer ut etter 3,13 min.

3.2.2. Ekstraksjon av FSY fra plasma

FSY ble ekstrahert fra plasma vha av fast fase ekstraksjonskolonner (3M Empore C18-SD).

Kolonnene ble aktivert ved å tilsette 1 ml metanol (MeOH). Deretter ble de ekvilibrert med 2x1 ml H₂O med 0,1 % maursyre før plasmaprøven ble satt på kolonnen. Kolonnen ble så vasket med 2x1 ml H₂O med 0,1 % maursyre, før FSY ble eluert ut med 0,6 ml 80 % acetonitril med 0,1 % maursyre. Acetonitrilen ble dampet av før analyse ved at prøvene ble satt i varmeblokk på 50°C under en strøm av nitrogengass i ca 15 min. Ideelt sluttvolum er 20-30 μ l.

3.3. Trinn 2 – Pilotstudie – Studie i forsøksdyr

Milepæl 2

- Fastslå om FSY passerer tarmveggen og absorberes til blodplasma
- Bestemme om FSY bør administreres alene eller sammen med andre peptider
- Bestemme den konsentrasjon av peptid som er nødvendig for deteksjon av FSY

Trinn 2 ble igangsatt 20. august 2013.

Det ble benyttet forsøksdyr for å undersøke biotilgjengeligheten av FSY.

3.3.1. Testgruppe

Til sammen 7 rotter ble sondefôret med FSY. Før forsøkene startet ble rottene fastet i 4 timer for å tømme magesekken. Deretter ble 5 rotter sondefôret med FSY alene mens 2 rotter fikk FSY i kombinasjon med kasein. Rottene ble fôret med hjelp av trent personell fra AMK med sonde i rustfritt stål, 76 mm, 16G fra Instech (Pennsylvania, USA). Ca. 50 min etter sondefôring ble dyrene lagt i anestesi (4 % isofluran til innsovning og deretter en vedlikeholdsdose på 2 %) og analgesi (Temgesic 0,05 mg/kg). Etter 10 min ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet. Dyrene ble deretter avlivet vha en overdose pentobarbital (100 mg/kg).

Av de 5 dyrene som ble fôret kun med FSY, fikk 2 rotter 25 mg FSY/kg kroppsvekt og 3 rotter fikk 100 mg FSY/kg kroppsvekt. De to rottene som ble fôret med FSY + kasein fikk 25 mg FSY/kg kroppsvekt og 75 mg kasein/kg kroppsvekt (se tabell 3).

3.3.2. Kontrollgruppe

4 rotter utgjorde kontrollgruppen. Disse ble ikke sondefôret, men ble som rottene i testgruppen fastet i 4 timer og deretter lagt direkte i anestesi (4 % isofluran til innsovning og deretter en vedlikeholdsdose på 2 %) og analgesi (Temgesic 0,05 mg/kg). Deretter ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet (se tabell 3 og 4). Dyrene ble så avlivet vha en overdose pentobarbital (100 mg/kg).

3.3.3. Prøveopparbeiding

Aortaprøver

En bit av aorta ble klippet ut fra 6 dyr og tatt vare på for videre analyser (se tabell 4). Pr 100 mg aorta ble det tilsatt 10 ml mettet Gu-SCN løsning som ble homogenisert med en IKA T-10 i 2 min på is. Deretter ble det tilsatt lik mengde (v/v) 20 % TCA. Løsningen ble sentrifugert, supernatanten filtrert og filtratet analysert på LC-MS.

Blodprøver

Blodprøver fra samtlige 12 rotter ble tilsatt heparin og umiddelbart sentrifugert ved 1500 g i 10 min ved 4°C. Deretter ble 2,5 ml av plasma tatt ut og tilsatt 10 ml av en mettet løsning med Gu-SCN (4x volum plasma). Løsningen ble homogenisert med en IKA T-10 på is i 2 min før plasmaproteiner ble syrefelt ved å tilsette 12,5 ml kald 20 % TCA, og sentrifugering ved 3500 g i 12 min ved 4°C. Supernatanten ble filtrert gjennom et 0,45 µm filter.

3.3.4. LC-MS

Den filtrerte supernatanten ble ekstrahert vha en C18 fast fase ekstraksjonskolonne. Ekstraksjonsmetoden er noe endret fra beskrivelsen i rapporten fra trinn 1 ettersom prøveopparbeidelsesmetoden måtte endres i trinn 2. Ny prosedyre ble som følger:

Kolonne: 3M Empore C18-SD

Kolonnen ble aktivert med 1 ml MeOH. MeOH ble vasket ut med 2x1 ml H₂O med 0,1 % maursyre. 3 ml av filtratet (plasma, Gu-SCN, TCA) ble tilsatt 100 ng internstandard (¹³C-FSY). Kolonnen ble deretter vasket med 2x1 ml H₂O med 0,1 % maursyre. FSY og internstandard ble eluert ut med 0,6 ml 80 % acetonitril og dampet ned på varmeblokk ved 50°C under nitrogen til et sluttvolum på 20-40 µl. Deretter ble prøvene analysert på LC-MS (Waters Xevo TQ MS tilkoblet Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, USA)). 3 parallelle målinger ble utført for hver plasmaprøve.

3.4. Trinn 2 – Del 2

3.4.1. Bakgrunn

Trinn 2 – del 2 ble innført etter telefonmøte med styringsgruppa 19. november 2013 (se kapittel 4.5 Avvik fra protokollen). Metodene så langt i prosjektet medførte at vi bare kunne analysere én blodprøve pr forsøksdyr. Målingene ga resultater som kunne tyde på at TCA var kontaminert med peptid.

Plasma prøvene viste seg også å være ustabile ved lagring, og vi valgte derfor å benytte serum istedenfor plasma.

Det var ønskelig å måle opptakshastighet, samt ta flere blodprøver pr dyr for å redusere antall dyr. Vi ønsket derfor å undersøke hvordan vi kunne gjøre målemetodene på LC-MS mer sensitive. Dette var utfordrende fordi det pr i dag finnes svært lite tilgjengelig adekvat litteratur. I trinn 2 – del 2 skulle 4 oppgaver løses.

3.4.2. Oppgaver

Oppgave 1

Teste 4 ulike batcher av TCA på LC-MS for å avdekke eventuell kontaminasjon av TCA.

Prøvene ble behandlet for applisering på LC-MS (se 3.3.4 LC-MS).

Oppgave 2

Undersøke om serumprøver egnet seg like bra som plasma prøver fra rotter som var blitt sondefôret med FSY. Serum skiller seg fra plasma hovedsakelig ved at koagulasjonsproteinene er fjernet, dvs at blodet er "ferdig koagulert" og ikke reaktivt. Serum er med andre ord mer stabilt. Dersom koagulasjons prosessen viste seg ikke å påvirke nivåene av FSY, ville vi arbeide med serum i fortsettelsen.

Vi brukte føtalt kalveserum (Sigma-Aldrich, Oslo) og tilsatte kjent mengde FSY (100 ng/ml). Prøvene ble behandlet for applisering på LC-MS (se 3.3.4 LC-MS).

Oppgave 3

Antall blodprøver vi kan ta pr dyr avhenger av hvor mye blod som behøves for å måle serum-FSY på LC-MS. Dersom serum kunne brukes og nivåene av FSY var

de samme som i plasma kunne vi sannsynligvis ta 3 blodprøver pr dyr for å måle opptakshastighet og biotilgjengelighet

Metoden for behandling av blodprøvene vi hadde basert oss på høst 2013¹ førte ikke til tilstrekkelige mengder FSY i prøven som ble analysert på LC-MS. Vi ønsket derfor å gjøre endringer i protokollen for å gjøre metoden mer sensitiv. For å forsøke å løse disse utfordringene valgte vi å videreutvikle metoden i to deler:

1. Frigjøre/løsrive FSY ved denaturering av plasmakomponenter

En stor del av FSY "forsvinner" i pellet sammen med plasmaproteinene etter TCA-felling. Vi prøvde først å fastslå om FSY binder seg til albumin, det vanligste proteinet i plasma, som er kjent for å binde en rekke ulike molekyler. Vi lagde derfor en løsning med albumin med samme konsentrasjon som i rotteplasma (40 mg/ml), og tilsatte FSY. Deretter TCA-felte vi det og målte innhold av FSY i løsningen.

Deretter ble plasmaprøvene tilsatt FSY inkubert med kjemikalier som er vist å hindre at proteiner "kleber" seg sammen:

- 4 forskjellige konsentrasjoner acetonitril
- 4 forskjellige konsentrasjoner metanol
- 3 forskjellige konsentrasjoner urea
- Gu-SCN
- Natrium dodecyl sulfat (SDS)

2. Separere FSY fra de andre serumkomponentene slik at prøven kan appliseres på LC-MS

Vi prøvde en annen metode enn TCA-felling for å skille FSY fra større molekyler. Vi brukte sentrifugerør med innebygd dialyse-membran på 3000 Da (Vivaspin). Rørene ble sentrifugert med det resultat at FSY på 415 Da gikk lett gjennom og ble samlet i bunnen av sentrifugerøret, mens alle store molekyler ble sittende igjen på dialyse-membranen.

Oppgave 4

Konsentrasjonene av hhv kasein og FSY vil avhenge av hvor mye FSY som er nødvendig for å detektere det i plasma. Dersom vi klarte å forbedre målesensitiviteten av FSY skulle FSY administreres sammen med kasein. Siden mengden FSY 60 min etter sondeforing var vanskelig å detektere i plasma, ble det bestemt at vi skulle prøve å ta ut blod ved et tidligere tidspunkt for å se om

konsentrasjonene var høyere. Med en eventuell forbedret målemetode ville vi kunne sette inn et kateter i halevenen på rotter og foreta sondefôring i våken tilstand. Dyrene skulle deretter legges i anestesi, og første blodprøve skulle tas 10-15 min etter sondefôringen. Antall blodprøver skulle bestemmes ut fra målesensitiviteten vi kunne oppnå.

Vi klarte ikke å forbedre målesensitiviteten så vi måtte fortsette med én blodprøve pr rotte. Ihht litteraturen vil små molekyler raskt tas opp fra tarm og kan nå en maksimal konsentrasjon i blod allerede etter 15 min.

4 rotter fikk tilført 100 mg/kg FSY i vann via sondeforing. Rottene ble så lagt direkte i anestesi (4 % isofluran til innsoving og deretter en vedlikeholdsdose på 2 %) og analgesi (Temgesic 0,05 mg/kg). Deretter ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet etter 15 min. Dyrene ble så avlivet vha en overdose pentobarbital (100 mg/kg).

3.5. Trinn 3 - Hovedstudie – Studie i forsøksdyr

Milepæl 3

- Oppnå statistisk signifikante resultater som indikerer at oralt administrerte bioaktive peptider kan passere fra tarm til blod
- Bestemme biotilgjengeligheten

Trinn 3 ble innført etter telefonmøte med styringsgruppa 29. januar 2014. Utførelsen startet 10. februar og avsluttet 27. februar 2014.

3.5.1. Testgruppe

8 rotter ble fastet i 4 timer for å tømme magesekken. Deretter ble de sondefôret med 100 mg FSY/kg ved hjelp av trent personell fra AMK. Ca. 5 min etter sondeforing ble dyrene lagt i anestesi (4 % isofluran til innsoving og deretter en vedlikeholdsdose på 2 %) og analgesi (Temgesic 0.05 mg/kg). 15 min etter sondefôring ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet. Dyrene ble deretter avlivet vha overdose pentobarbital (100 mg/kg).

3.5.2. Kontrollgruppe

4 rotter utgjorde kontrollgruppen. Disse ble ikke sondefôret, men ble som rottene i testgruppen fastet i 4 timer og deretter lagt direkte i anestesi (4 % isofluran til innsovning og deretter en vedlikeholdsdose på 2 %) og analgesi (Temgesic 0,05 mg/kg). Deretter ble blod ekstrahert ved tapping direkte fra hjertet.

3.5.3. Prøveoppbeiding

Blodprøver fra samtlige 12 rotter ble tilsatt heparin og umiddelbart sentrifugert ved 1500 g i 10 min ved 4°C. Fra hver kontrollrotte ble 2 ml blod tatt ut og tilsatt kjent mengde FSY for å undersøke hvor mye FSY som ble borte i prosessen med å gjøre prøvene klar til LC-MS. Deretter ble 2 ml av plasma tatt ut og tilsatt 8 ml av en mettet løsning med Gu-SCN (4x mengde plasma). Løsningen ble homogenisert med en IKA T-10 på is i 2 min før store plasmaproteiner ble syrefelt ved å tilsette 10 ml kald 20 % TCA (på is), og sentrifugert ved 3500 g i 12 min ved 4°C. Supernatanten ble filtrert gjennom et 1,2 µm filter og ble videre ekstrahert som tidligere beskrevet før analyse på LC-MS (se 3.3.4 LC-MS).

4. Resultater og diskusjon

4.1. Trinn 1

Milepæl 1

- Fastslå om FSY lar seg måle med tilstrekkelig høy sensitivitet og selektivitet i blodplasma vha. LC-MS

Utfordringen i trinn 1 var å utvikle en metode for å kunne fastslå om peptider lar seg måle med tilstrekkelig høy sensitivitet og selektivitet i blodplasma vha LC-MS. Til dette arbeidet ble tripeptidet FSY brukt som modellpeptid.

Dette målet ble innfridd med en nedre deteksjonsgrense på 5 ng FSY pr 250 µl plasma. Metoden ble på dette tidspunkt ikke endelig validert mhp linearitet og reproduserbarhet. Norut og D'Liver ble sammen enig om at endelig validering ikke var nødvendig før FSY eventuelt var påvist i rotteplasma.

Milepæl 1 ble på bakgrunn av dette resultatet vurdert oppnådd.

4.2. Trinn 2 – Pilotstudie – Studie i forsøksdyr

Milepæl 2

- Fastslå om FSY passerer tarmveggen og absorberes til blodplasma
- Bestemme om FSY bør administreres alene eller sammen med andre peptider
- Bestemme den konsentrasjon av peptid som er nødvendig for deteksjon av FSY

Dyreforsøkene i prosjektet ble utført ved AKM, UiT. Opparbeidelse og analysene av plasmaprøvene ble utført av Norut og D'Liver i Barents Biocentre Lab.

For å måle mengden FSY i plasmaprøvene ble det tilsatt en internstandard av en kjent mengde ¹³C-merket FSY. Når ¹³C-merket FSY syntetiseres blir det aldri 100 % rent og i dette tilfellet inneholdt internstandarden ca 2 % umerket FSY. Dette ble bekreftet ved LC-MS analyse av syntetisert ¹³C-merket FSY. Tilstedeværelsen av umerket FSY skyldes her at isotopmerkede aminosyrer brukt i syntesen ikke er 100 % isotopmerket. Dette er normalt ved bruk av ¹³C-merket materiale.

Tabell 3 viser verdier på 7 og 11 ng/ml FSY i kontrollrottene (rotte #8 og #9). Disse verdiene tilsvarende den andelen umerket FSY i internstandard som tilsettes plasmaprøven sammen med internstandard og indikerer at rottene ikke har naturlig FSY i sitt plasma.

Prøve #	Sondeforing (mg/kg)	FSY i plasma (ng/ml)	FSY i aorta (ng/mg)
Rotte #1	25 FSY	14	
Rotte #2	25 FSY	126	
Rotte #3	25 FSY + 75 kasein	13	
Rotte #4	25 FSY + 75 kasein	15	
Rotte #5	100 FSY	91	0,1
Rotte #6	100 FSY	149	0,2
Rotte #7	100 FSY	308	5,7
Rotte #8	Kontroll	7	
Rotte #9	Kontroll	11	
Rotte #10	Kontroll	27	0,3
Rotte #11	Kontroll	17	0,2
Rotte #12	Kontroll	92	0,5
13 Vann *	Nei	13	
14 Vann *	Nei	46	
15 Gu-SCN**	Nei	8	

Tabell 3. Resultater etter sondeforing av rotter (gjennomsnitt av tre paralleller). Målemetoden er semikvantitativ da den ikke er basert på en standardkurve, men på forholdet mellom FSY og ¹³C-FSY. *Vannprøven består i tillegg av Gu-SCN + TCA, **bare Gu-SCN.

Kvantifiseringen baserer seg ikke på en standardkurve, kun på forholdet mellom FSY og ¹³C-FSY i hver enkelt prøve. Metoden er derfor semikvantitativ, og det er ikke mulig å avgjøre om det er en reell forskjell i konsentrasjon mellom kontrollrottene og rottene som ble sondeført med 25 mg FSY/kg + 75 mg kasein/kg (#3 og #4). Det er derimot ingen tvil om at det er en stor og reell konsentrasjonsforskjell mellom rotte #3 og #4 og rottene som ble sondeført med 100 mg FSY/kg (#5, #6 og #7).

Rottene som ble sondeføret med 25 mg FSY/kg eller 25 mg FSY/kg + 75 mg kasein/kg viser i liten grad økte mengder av FSY sammenlignet med kontrollgruppen. Unntaket er rotte #2 som har 10 ganger høyere plasmainnhold av FSY. Ut fra disse resultatene kan det ikke konkluderes med at tilsetning av andre proteiner, dvs kasein i dette tilfellet, fører til endret opptak av FSY fra tarm til plasma.

Mengdene av FSY i plasma i rotte #5, #6 og #7 er betydelig høyere enn i kontrollrottene. Det er imidlertid store variasjoner mellom rottene. Siden det ble målt lite FSY i plasma fra rottene som fikk 25 mg FSY/kg, ble det vurdert om FSY kunne bli absorbert av det antatte målenzymet, ACE. Tidligere publiserte resultater¹ har vist at ACE finnes i aorta. Vi tok derfor også ut aorta fra rottene i forsøksserien som fikk 100 g FSY/kg. Det ble observert liten forskjell i mengde FSY i aorta mellom rotter i kontrollgruppa og sondeførede rotter, bortsett fra rotte #7 som hadde betydelig høyere nivå av FSY i aorta. Denne rotta hadde også høyest nivå av FSY i plasma.

Hvorvidt FSY passerer tarmveggen og kan gjenfinnes i blod/plasma vil avhenge av flere faktorer. Dersom det foregår aktiv transport av FSY over tarmveggen bør man kunne finne igjen FSY i plasma selv ved lave mengder FSY tilført rottene. Dersom det foregår passiv transport av FSY over tarmveggen vil konsentrasjonen i tarmen være svært avgjørende, og man vil kunne finne igjen FSY i plasma langt raskere ved tilførsel av en høy mengde FSY enn ved en lav mengde. Hvorvidt FSY transporteres aktivt eller passivt over tarmveggen er for oss ikke kjent⁶.

Tabell 3 viser også at de to kontrollprøvene hvor vi tilsatte vann i stedet for plasma (prøve 13 og 14), ga tilnærmet likt signal som plasmaprøvene fra kontrollrottene. Siden vann ikke skal inneholde FSY indikerer dette at plasmaprøvene fra kontrollrottene heller ikke inneholder naturlig FSY. Imidlertid er verdiene på plasmaprøvene fra kontrollrottene og vannprøvene en del høyere enn den forventede bakgrunnsverdien man får ved de 2 % FSY fra interstandarden.

De store variasjonene i detektert FSY i plasma mellom de rottene som fikk samme mengde FSY kan skyldes flere faktorer, som for eksempel individuelle forskjeller i opptakshastighet i rottene. Siden vi trengte store volum plasma for å

⁶ Transport over tarmen kan være aktiv eller passiv: aktiv transport skjer ved at spesialiserte transmembran proteiner gjenkjenner forbindelser og aktivt transporterer den over membranen. Aktiv transport er energikrevende, og foregår blant annet med ioner, glukose og aminosyrer. Passiv transport er et resultat av diffusjon over membranen der systemet søker likevekt. Transporten av en forbindelse vil skje fra et område med høy konsentrasjon til et område med lav konsentrasjon.

måle innhold av FSY kunne vi bare ta plasma fra ett tidspunkt pr dyr. Data i litteraturen¹ antyder at konsentrasjonen av sondefôret peptid er høyest etter ca. 1 time. Vi valgte derfor å ta blodprøver av dyrene 1 time etter sondefôring. Det påpekes i artikkelen til Kawaguchi¹ at tiden på 1 time gjelder for 2 tripeptider (Val-Pro-Pro og Ile-Pro-Pro), som har andre fysiske og kjemiske egenskaper enn FSY. Tid for opptak av dette peptidet vil dermed ikke nødvendigvis være den samme for FSY. Vi antar at noe av variasjonene i plasmaprøvene kan skyldes enten at noen rotter allerede hadde tatt opp FSY fra magesekken og at etter 1 time var FSY skilt ut fra plasma, eller at FSY etter 1 time fortsatt ikke hadde nådd den høyeste konsentrasjonen.

En annen observasjon vi gjorde under opparbeiding av prøvene var at andelen plasma i blodprøven etter sentrifugering varierte fra dyr til dyr. I enkelte dyr registrerte vi at ca 55 % av volumet var plasma, mens i andre dyr var bare 35 % plasma. Disse variasjonene var uavhengig av om dyrene fikk FSY eller ikke og kan også ha bidratt til at FSY konsentrasjonen varierte uten at vi klarte å se en umiddelbar sammenheng mellom plasma-andel og FSY konsentrasjon i plasmaet.

Det ble også tidlig i metodeutviklingen oppdaget at FSY trolig kan felle ut sammen med proteiner når de felles med TCA, noe som førte til varierende ekstraksjonsutbytter. Dette bedret seg gjennom bruken av Gu-SCN i prøveoppbeidelsen, men vi kan fortsatt ikke utelukke at co-presipitering av FSY forekommer i ulik grad i de ulike prøvene, noe som kan være en medvirkende årsak til variasjonen i resultatene. Andre fellingsreagenser vil kunne gi andre resultater. Normalt vil tilsetning av internstandard (¹³C-FSY) løse problemet rundt varierende ekstraksjonsutbytte, men i enkelte tilfeller vil dette ikke skje. I vårt tilfelle vil dette problemet ikke løses dersom FSY foreligger i en likevekt mellom fri FSY og kompleksert-FSY⁷ i plasmaet. I et slikt tilfelle vil det kunne ta lang tid før internstandard oppnår samme likevekt som FSY, og ekstraksjonsutbyttet av de to forbindelsene vil bli ulikt og påvirke resultatet.

For å utelukke at noen av kjemikaliene hadde blitt kontaminert med FSY, noe som ville påvirket resultatet, ble det utført kontroller med ekstraksjon av ren Gu-SCN-løsning, ren TCA-løsning og en løsning av både Gu-SCN og TCA (Løsningene gjennomgikk den totale prøveoppbeidelsesmetoden inkludert tilsetning av ¹³C-merket FSY og analysen). Kontrollprøve 15 inneholdt bare Gu-

⁷ Med kompleksert FSY menes FSY som enten har reagert (dannet kovalent binding) eller kompleksert med andre forbindelser i plasmaet (bundet seg til ved hydrogenbinding, dipol-dipol eller andre kjemiske ikke kovalente bindinger).

SCN og viste en verdi tilsvarende verdien av 2 % FSY fra internstandarden. Prøven med kun TCA og prøven med TCA og Gu-SCN ga derimot utslag for FSY på LC-MS. I etterkant av disse resultatene analyserte vi derfor noen prøver med ekstraherte TCA-løsninger på LC-MS, og resultatene viste at prøver fra én batch TCA gir et høyere utslag for FSY enn grunnlinja på 2 % tilsier. Denne batchen ble brukt i undersøkelsene våre og forklarer noe av de sprikende resultatene. Rent vann ga ikke noe utslag (resultatene ikke vist her). Det finnes ingen god forklaring på hvorfor TCA kan gi utslag for FSY.

4.3. Trinn 2 – Del 2

Oppgave 1

Vi fant feilkilden for deteksjon av FSY i de negative kontrollene: Flasken med TCA hadde blitt kontaminert med FSY. Vi kjøpte ny TCA som vi brukte i de videre forsøkene.

Oppgave 2

Vi fant ut at serum egner seg forholdsvis dårlig for å måle FSY. Vi fortsatte derfor å lage plasma av rotteblodet.

Oppgave 3

Vi videreutviklet metoden i to deler for å få en mer sensitiv metode og fikk følgende resultater:

1. *Frigjøre/løsrive FSY ved denaturering av plasmakomponenter*

Vi ville fastslå om FSY binder seg til albumin, det vanligste proteinet i plasma, som er kjent for å binde en rekke ulike molekyler. Resultatene viste at albumin ikke binder seg til FSY.

Plasmaprøver tilsatt FSY ble inkubert med ulike kjemikalier som er vist å hindre at proteiner "kleber" seg sammen. Ingen av disse kjemikaliene var bedre egnet til å frigi mer FSY fra plasmaprøver enn Gu-SCN som vi brukte i de første protokollene.

Deretter inkuberte vi plasmaprøver tilsatt FSY under andre fysiske betingelser ved å forandre pH i løsningen, samt ved å varme prøvene opp. Disse tiltakene førte heller ikke til at mer FSY ble frigitt i prøvene. Vi inkuberte også plasmaprøver tilsatt FSY i den samme proteasecocktailen som brukes for å bryte ned rekeskall ifbm produksjon av peptidblandingen som inneholder FSY. Denne

proteasecocktailen bryter ned proteiner til mindre bestanddeler som f.eks FSY. Hensikten med dette tiltaket var å finne ut om proteasene ville bryte ned plasmaproteinene som binder FSY og på den måten frigjøre FSY. Heller ikke disse forsøkene førte til økt deteksjon av FSY i plasmaprøvene. Dette kan indikere at problemet ikke er at FSY binder seg til proteiner, men muligens andre lavmolekylære forbindelser i plasmaet.

2. *Separere FSY fra de andre serumkomponentene slik at prøven kan appliseres på LC-MS*

En vanlig metode for å skille ut proteiner i en løsning er å tilsette TCA som danner et kompleks med proteiner, som så kan sentrifugeres ned i en pellet. Bare de store proteinene blir en del av komplekset mens de små proteinene og peptidene fortsatt vil være i løsning. I dette prosjektet ble denne løsningen satt på en "solid phase column" som har den egenskapen at den binder FSY. Deretter ble FSY eluert ut og løsningen analysert på LC-MS.

Vi prøvde derfor en annen metode for å skille FSY fra større molekyler. Vi brukte sentrifuge-rør med innebygd dialyse-membran på 3000 Da (Vivaspin). Rørene ble sentrifugert med det resultat at FSY på 415 Da gikk lett gjennom og ble samlet i bunnen av sentrifuge røret, mens alle store molekyler ble i sittende igjen på dialyse-membranen. Denne løsningen ble applisert direkte i LC-MS maskinen, men heller ikke denne metoden førte til at vi detekterte større mengder FSY.

Ingen av metodene vi testet ut klarte å frigjøre FSY fra plasmakomponenter. Det viste seg til slutt at den metoden vi brukte tidligere i høst med Gu-SCN kombinert med TCA-felling fungerte best, selv om den ikke er så sensitiv som vi hadde håpet. Resultatene i dette delprosjektet betyr at vi ikke kunne ta mer enn en blodprøve pr dyr og at vi dermed behøver flere dyr for å få tilfredsstillende datagrunnlag.

Oppgave 4

Siden vi ikke klarte å oppnå en mer sensitiv metode for å detektere FSY i plasmaprøver måtte vi derfor fortsette å gjøre forsøk basert på sondeføring av rotter med 100 mg FSY/kg.

Til tross for variasjon mellom mengden FSY i plasma fra de 4 rottene, viser rotte #15 og #16 like nivåer (tabell 4).

Prøve #	FSY i plasma* (ng/ml)	Mengde FSY i blod (μ g)	% av administrert
Rotte #13	617	197	0,39
Rotte #14	1360	435	0,87
Rotte #15	108	34	0,07
Rotte #16	106	34	0,07

Tabell 4. Mengden FSY i blodplasma 15 minutter etter sondeføring med 100 mg FSY/kg.

Vi fant ut at det er FSY i blodet 15 minutter etter sondeføring. Men siden spredningen av resultatene fra de 4 dyrene var relativt stor er det ikke mulig å konkludere med om det er mer FSY i blodet 15 min etter sondeføring enn etter 1 time (tabell 4).

4.4. Trinn 3

Milepæl 3

- Oppnå statistisk signifikante resultater som indikerer at oralt administrerte bioaktive peptider kan passere fra tarm til blod
- Bestemme biotilgjengeligheten

Resultatene fra de første 8 rotter fikk tilført 100 mg FSY/kg var som følger:

Prøve #	FSY i plasma (ng/ml) (\pm STD)	Dato
Rotte #17	279 (\pm 73)	11 feb
Rotte #18	298 (\pm 12)	11 feb
Rotte #20	32 (\pm 8)	13 feb
Rotte #22	18 (\pm 2)	26 feb
Rotte #23	16 (\pm 1)	26 feb
Rotte #24	17 (\pm 4)	26 feb
Rotte #26	27 (\pm 1)	27 feb
Rotte #27	27 (\pm 3)	27 feb

Tabell 5. Mengden FSY i blodplasma 15 minutter etter sondeføring med 100 mg FSY/kg.

Av de 8 rottene som ble sondeføret med FSY fant vi detekterbare mengder FSY i rotte #17 og #18 (tabell 5). Kontrollrotte #19, fra samme forsøksdato (tabell 6) hadde imidlertid nesten samme mengder FSY. Rotte #22, #23 og #24 hadde også nesten samme FSY-nivå som kontrollrotte #25 fra samme forsøksdato. Vi observerte det samme mønsteret i rottene fra de to andre forsøksdatoene.

Siden resultatene tyder mer på dag til dag variasjoner enn dyr til dyr variasjoner valgte vi å inkludere forsøksdatoene i tabell 5 og 6.

Prøve #	Plasma fra kontrollrotter (ng/ml)	Plasma fra kontrollrotter tilsatt FSY (ng/ml)	Fullblod fra kontrollrotter tilsatt FSY (ng/ml)	Dato
Rotte #19	244 (± 5)	337 (± 32)	494 (± 50)	11 feb
Rotte #21	35 (± 2)	32 (± 2)	285 (± 6)	13 feb
Rotte #25	16 (± 2)	20 (± 3)	-	26 feb
Rotte #28	33 (± 9)	26 (± 7)	28 (± 2)	27 feb

Tabell 6. Mengden FSY i plasma fra kontrollrotter, plasma tilsatt FSY, samt fullblod tilsatt FSY.

Blodprøvene fra de sondefôrede rottene kan ikke analyseres direkte på LC-MS pga det høye innholdet av blodkomponenter. Hver prøve går derfor igjennom flere trinn fra blodtapping fra hjertet til de blir analysert ved hjelp av LC-MS. I hvert trinn vil dermed en ukjent andel FSY gå tapt. Den verdien vi får fra LC-MS viser således kun mengden FSY som var i prøven i det siste trinnet før den ble satt på LC-MS, og ikke mengden FSY i den opprinnelige blodprøven. For å beregne hvor stor andel av FSY som gikk tapt underveis ble hhv fullblod og plasma fra kontrollrotter tilsatt 300 ng/ml FSY (tabell 6). Det forventes at plasma som tilsettes FSY inneholder mer FSY enn fullblod som tilsettes FSY, fordi noe FSY sannsynligvis vil følge blodcellene som sentrifugeres bort. Plasma fra kontrollrotter (tabell 6) forventer man ikke inneholde FSY, slik rotte # 21, #25 og #28 viser. Derimot viser resultatene fra rotte #19 verdier vi ikke kan forklare, både fordi vi fant igjen mer FSY enn de 300 ng/ml vi tilsatte i plasma og fullblod, og fordi plasma uten tilsatt FSY inneholdt FSY (244 ng/ml).

Resultatene var ikke konsistente, selv om fullblod fra kontrollrotte #21 hadde en FSY verdi på 285 ng/ml, noe som tilsvarer de 300 ng som ble tilsatt pr ml. Denne verdien indikerer at FSY ikke ble borte i ekstraheringsprosessen, men stemmer dårlig overens med verdien målt av FSY tilsatt plasma fra samme rotte (32 ng/ml). Plasma og fullblod som fikk tilsatt kjent mengde FSY fra rotte #19, #25 og #28 ga heller ikke verdier som kan tolkes.

De varierende resultatene i kontrollrottene gjorde at vi ville undersøke om FSY finnes i blod fra mennesker så vi tappet blod fra 2 frivillige personer og behandlet prøvene på samme måte som rotteblod. Ingen av disse personene hadde målbare verdier av FSY i plasma (resultatene ikke vist).

Vi ikke kunne bestemme biotilgjengeligheten av FSY på grunn av problemer med sensitiviteten med å detektere FSY, og vi oppnådde heller ikke statistisk signifikante resultater som viser at oralt administrert FSY passerte fra tarm til blod.

Vi tror ikke at årsaken til varierende resultater skyldes at vi i Trinn 3 tok blodprøver etter 15 min i motsetning til tidligere der vi fikk mer "forståelige" resultater når vi tok prøver etter 60 min. Biologiske variasjoner er ofte en årsak til at man får varierende resultater ved bruk av forsøksdyr. I dette prosjektet ser vi at dag til dag variasjonene er større enn dyr til dyr variasjonene. I Trinn 3 hele tiden etterstrebet å redusere mulige feilkilder ved alltid å bruke ferske plasmaprøver, samme batch kjemikalier, samme temperatur, opparbeide prøvene så raskt som mulig, samt bruk av engangsutstyr.

Videre tror vi heller ikke at årsaken til varierende resultater skyldes instrumentfeil i LC-MS fordi de parallelle prøvene som ble applisert alltid ga små standardavvik.

Resultatene fra tabell 6 viser at FSY blir borte selv om det tilsettes direkte i fullblod eller i plasma. Vi har brukt TCA og Gu-SCN for å fjerne store proteiner fra plasma både i prøvene fra de sondefôrede dyrene og fra kontrolldyrene. Selv om publiserte resultater tilsier at disse to kjemikaliene ikke bør kombineres, så var det ingen av de andre protokollene vi prøvde ut som ga bedre resultater. Det finnes heller ingen andre publikasjoner i litteraturen å støtte seg til som beskriver hvordan man kan ekstrahere peptider fra blod og deretter måle det på LC-MS.

En forklaring på de uventede lave nivåer av FSY i flere av prøvene kan skyldes at blodprøver fra enkelte rotter inneholder komponenter som binder seg til FSY. I trinn 3 hadde vi ny operatør på dyreavdelingen med lite sondefôring-erfaring. Komplikasjoner med sondefôringen førte til at dyrene ble svært stresset. Resultatene fra disse dyrene viste at tilsatt FSY ikke ble påvist i prøvene mens internstandarder var tilstede. Dersom det ved en stressreaksjon skilles ut substanser i blodet som binder seg til FSY, vil dette kunne føre til at substansen skjuler tilstedeværelsen av FSY med det resultat at FSY ikke blir å finne i prøvene med de utviklede metodene.

4.5. Avvik fra protokollen

I den opprinnelige protokollen anslo vi at vi kunne ta opp til 12 blodprøver pr dyr over en periode på 2 timer etter sondefôring. Man kan imidlertid ikke ta ut mer enn 4-5 ml pr rotte uten at det vil få stor innvirkning på hemodynamikken. Siden mengde blod pr prøvetaking må være minimum 3 ml, fikk vi derfor bare tatt 1 blodprøve pr rotte.

Ved oppstart av trinn 2 oppsto det uforutsette problemer i forhold til reproduktibiliteten, noe som førte til at det ble nødvendig med videre innsats for å validere metoden. Den endelige metoden hadde ingen påvirkning på

deteksjonsgrensen i analysen, men førte til endringer i ekstraksjonsprosessen. Dette er beskrevet i kapittel 3.3.4 LC-MS.

Problemene som oppsto ifbm validering av metoden gikk hovedsakelig ut på at plasmaet koagulerte uforutsigbart og førte til tap av mye prøvemateriale. Dette førte igjen til at mengden tilgjengelig plasma ikke var stor nok til en full metodevalidering. For å fullføre milepæl 1 var det nødvendig med plasma fra 8-10 rotter, noe som ikke lot seg gjennomføre innenfor budsjetttrammene for trinn 1. Til tross for at beregning av linearitet og reproduserbarhet ikke er bestemt, er det liten grunn til å betvile de semikvantitative målingene som er utført da spredningen i målingene mellom de 3 ulike parallellene fra hver enkelt prøve er små.

Etter konsultasjon med styringsgruppa for prosjektet ble det vedtatt å utføre flere forsøk i trinn 2 for å se om problemene lot seg løse. Derfor ble det utført et trinn 2 – del 2 der 4 oppgaver for å løse utfordringene i prosjektet ble lagt skriftlig frem for styringsgruppen 14. november 2013, beskrevet under kapittel 3.4.

5. Konklusjon

Hensikten med prosjektet var å utvikle en metode for å dokumentere biotilgjengelighet av oralt administrerte peptider. Tripeptidet FSY ble brukt som modellpeptid og FSY ble detektert i LC-MS. Konsentrasjonen av FSY ble beregnet ved hjelp av en semikvantitativ metode der en kjent mengde ^{13}C merket FSY ble tilsatt hver prøve og forholdet mellom ^{13}C -FSY og FSY sammenliknet. Før oppstart ble prosjektet delt opp i 3 trinn. Milepælene i trinn 1 og trinn 2 ble oppnådd.

I trinn 3 skulle vi oppnå statistisk signifikante resultater for å kunne konkludere om oralt administrert FSY kan passere fra tarm til blod, samt bestemme biotilgjengeligheten. Dette lot seg ikke gjennomføre med metodene vi prøvde ut. Metodene vi brukte for måling av FSY i plasma viste seg å ha dag til dag variasjoner i større grad enn dyr til dyr variasjoner. Det betyr at forsøk utført på dyr samme dag ga FSY-verdier med liten eller ingen variasjon mellom kontrolldyr og sondeførede dyr, mens forsøkene utført en annen dag fortsatt ga liten eller ingen variasjon mellom kontrolldyr og sondeførede dyr men hvor FSY-verdiene var forskjellige fra den første dagen. Vi tror derfor ikke at variasjonene skyldes biologiske forskjeller mellom forsøksdyrene.

Videre tror vi heller ikke at variasjonene skyldes instrumenteringsfeil på LC-MS fordi hver prøve ble målt i 3 paralleller og med lavt standardavvik.

Vi har to potensielt plausible forklaringer på hva variasjonene kan skyldes. Den ene forklaringen kan være at stress hos rottene muligens påvirker prøvene. I trinn 3 hadde vi ny operatør på dyreavdelingen som bisto med sondeføring og blodtapping. Komplikasjoner med sondeføringen førte til at dyrene ble svært stresset. Resultatene fra disse dyrene viste at internstandarder var tilstede, men FSY ble ikke påvist i prøvene. Dersom det ved en stressreaksjon skiller ut substanser i blodet som binder seg til FSY, vil dette kunne føre til at substansen skjuler tilstedeværelsen av FSY med det resultat at FSY ikke blir å finne i prøvene med de utviklede metodene.

Den andre forklaringen kan skyldes opparbeidelse av prøvene etter blodtapping av dyrene. Vi har brukt TCA og Gu-SCN i alle plasmaprøvene. Data fra litteraturen sier at disse to kjemikaliene ikke bør kombineres fordi de kan reagere med hverandre. Ingen av de andre alternative kjemikaliene vi prøvde ga bedre resultater, så vi valgte å fortsette med TCA og Gu-SCN. Det er dessuten verdt å merke seg at disse to kjemikaliene ble benyttet i det eneste

publiserte arbeidet der man har kunnet påvise oralt administrerte tripeptider i blod.

Den mest anvendelige metoden for å detektere små molekyler i blod er vha LC-MS. Dette prosjektet har vist at for et lite molekyl som FSY, og formodentlig også andre små peptider, må metoden forbedres ytterligere. For FSY mener vi at det er mulig å oppnå dette ved å benytte FSY merket med ^{14}C (istedenfor ^{13}C). ^{14}C merking tillater bruk av enkel og svært sensitiv metodikk for å måle substanser i blod og andre typer vev, slik at farmakokinetiske parametre som halveringstid og organfordeling over tid kan måles. Dersom blodprøvene behandles på samme måte som i dette prosjektet vil en ved ^{14}C merking kunne identifisere hvor tripeptidet befinner seg til enhver tid i prosessen. Det vil dermed være enklere å identifisere årsakene til variasjonene og dermed gi et godt utgangspunkt for å utarbeide en bedre protokoll for å bestemme biotilgjengelighet av tripeptider ved bruk av LC-MS.

Til slutt: Dersom hypotesen om at stressede rotter utskiller blodfaktorer som binder FSY (se avsnittet over), vil dette kunne prøves ut med relativt sikkert utfall vha ^{14}C -FSY. Dersom det viser seg at FSY-bindende stress-proteiner er en realitet, vil dette være en svært viktig observasjon, som vil ha meget stor interesse innen betydelige deler av forskningsmiljøet.