



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2020 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap
Hovedveileder Professor Harald Carlsen

Betydningen av NOX1 for utviklingen av metabolsk syndrom i mus føret med høyfettdiett med og uten favabønner

The significans of NOX1 for the developement of
metabolic syndrom in mice fed on a high fat diet
with or without favabeans

Sissel Katrine Hulsund

Matvitenskap - retning ernæring

Forord

Ønsker med dette å få takke for muligheten til å skrive masteroppgaven min for molekylære cellebiologi gruppen ved fakultetet for kjemi, biokjemi og matvitenskap ved NMBU. Opplevelsen har vært svært spennende og lærerik med mange nye og utfordrende oppgaver.

Vil rette en ekstra stor takk til hovedveileder professor Harald Carlsen for oppmuntring og tett oppfølging særlig i slutt prosessen av denne oppgaven. Og takk for tålmodigheten til min andre veileder stipendiat Dimitrious Papoutsis og stipendiat Anne Mari Herfindal som jevnt og trutt har tatt seg tid til å diskutere og svare på alle mine spørsmål.

Takk til resten av teamet som alle har bidratt til å berike dette året både med kunnskap, trivsel og sosiale sammenkomster.

Folka:

Førsteamanuensis Siv Bøhn, Forsker Sergio Rocha, stipendiat Henriette Arnesen, stipendiat Silje Else Harvei, senioringeniør Lars Fredrik Moen, avdelingsingeniør Aping Yuan og alle medstudenter.

Til slutt vil jeg rette en ekstra stor takk til min gode medstudent og kollega Eirin Haraldsdatter Wesenberg for godt samarbeid i på CareIN kurs, i muselabben, og for gode samtaler og oppmuntring underveis.

November 2020, Drøbak

Sissel Katrine Hulsund

Sammendrag

Bakgrunn: Metabolsk syndrom er sterkt knyttet til fedme hvor vanligste årsak er høyfettdietter og sedativ livsstil. Fedme fører til lavgradsinflammasjon i fettvev og lever og er pådriver for insulinresistens og MetS. Belgvekster slik som favabønner blir benyttet i behandling og forebygging av T2D, da de er funnet å inneholde komponenter som bedrer insulinresistens. I de seinere årene er det funnet at reaktive oksygen forbindelser (ROS) har en medvirkende rolle i opprettholdelse av homeostasen i tarmen. Det er sett at ved forhøyet bakterievekst i tarm vil NOX1 enzymet i samspill med iNOS sørge for ROS produksjon med antimikrobiell effekt i tynntarm. Det er også funnet at tarmens mikrobiota, barrierefunksjoner og inflammasjonstilstand spiller en viktig rolle i utviklingen av fedme og metabolske sykdommer. Høyfettdietter er funnet å føre til metabolsk endotoksemi som er en tilstand hvor økt tilstedeværelse av gramnegative endotoksinproduserende bakterier aktiverer immunsystemet og bidrar til systemisk inflammasjon med metabolsk syndrom som følge.

Hensikt: Med denne oppgaven skulle det undersøkes om det var noen effekt av høyfettdiett med og uten favabønner på barrierefunksjon i tynntarm hos NOX1KO mus og om en eventuell svikt i barrieren ville føre til økt lekkasje av endotoksiner, endring i kroppsvekt, leverfett og insulinresistens.

Metode: For å oppnå rask vekt oppgang og metabolske forandringer ble våre C57BL/6 hannmus føret *ad libitum* med en 60% høyfettdiett med eller uten favabønner. Etter 9 uker på diett ble ROS målt ved hjelp av in vivo avbildning etter IP injeksjon av L-012 probe. Etter 10 uker ble blodprøver tatt fra leggvænen etter 5 timers faste for å evaluere insulinresistens ved blodglukose og plasma insulin. Etter anesthesiinjeksjon ble hjertepunktur utført før terminering i uke 14. Blod ble benyttet til serum LBP analyse og til slutt ble levervev høstet for kvantifisering av triglyserider. Blodglukosen ble målt ved hjelp av en *accu check* glukosemåler. Insulin, LBP og TAGs ble analysert ved hjelp av ELISA.

Resultat: Etter 14 uker viste alle de fire eksperimentelle gruppene (VT HF, VT HF+FB, NOX1KO HF, NOX1KO HF + FB) signifikant vekt oppgang som følge av høyfettdiett med eller uten favabønner. Selv om det ikke ble funnet noen signifikante forskjeller ble det vist ved energiomdannelse at genotype kan utgjøre en liten forskjell, at intakt ROS produksjon via NOX1 fører til høyere vekt oppgang på mindre mengder for særlig for favabønne - gruppen. In vivo avbildning bekreftet redusert lyssignal fra mageregion hos NOX1KO mus. Mellom VT gruppene ble det funnet en svak trend til at høyfettdietten med Favabønner bidro til redusert lyssignal sammenlignet med ren høyfett diett. Sammenlignet med kontrolldyr på standard lavfettdiett ble det funnet høyere grad av insulinresistens hos alle mus i de eksperimentelle gruppene, det ble videre ikke sett noen korrelasjon mellom vekt og HOMA indeks som antyder at effekten kan komme fra høyfettdietten. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom genotypene ved målte triglyserider i levervev. NOX1KO mus viste seg å være mer utsatt for akkumulering av TAGs, også her ble det funnet en svak trend til lavere TAGs i favabønne gruppen. Korrelasjon mellom vekt og mengde TAG ble ikke funnet, til tross for at de tyngre musene hadde blekere utseende på levervevet. Alle mus viste ekstremt høye LBP verdier i serum, inkludert kontrollgruppen på standard lavfett. Resultatet kunne derfor ikke gi oss noe informasjon vedrørende tilstedeværelse av endotoksiner og effekt av NOX1 eller favabønner.

Konklusjon: På tross av få signifikante funn ble det likevel sett en trend til at ROS produsert via NOX1 kan ha en betydning for utviklingen av metabolsk syndrom ved en intervensjon med høyfettdiett med eller uten favabønner.

Abstract

Background: Metabolic syndrome is strongly connected to obesity usually caused by high fat diets and a sedentary lifestyle. Obesity creates a low-grade inflammation in adipose and liver tissue and causes insulin resistance and MetS. Legumes, such as favabeans are being used both preventive and in treatment of T2D as legumes has been found to contain components that ameliorate insulin resistance. Recent research has discovered that reactive oxygen species (ROS) has a contributing role in maintaining the gut homeostasis. It has been shown that iNOS and NOX1 enzymes collaborate to decrease bacterial growth by their production of antimicrobial ROS. It has also been discovered that the gut's microbiota, barrier functions and state of inflammation has a crucial role in the development of obesity and metabolic syndrome. High fat diets has been shown to create a condition known as metabolic endotoxemia where the presence of gram- negative- endotoxin producing bacteria contributes to a systemic inflammation with metabolic syndrome as a result.

Aim: The purpose with this research was to investigate whether there was any effect of the high fat diet with and without fava beans on gut barrier function in NOX1KO mice. And further if a potential barrier breach would lead to increased leakage of endotoxins, change in body weight, liver fat and insulin resistance.

Method: To achieve rapid weight gain and metabolic changes, our C57BL / 6 male mice were fed *ad libitum* with a 60% high-fat diet with or without fava beans. After 9 weeks on the diet, ROS was measured by in vivo imaging after IP injection of the L-012 probe. After 10 weeks, blood samples were taken from the leg vein after 5 hours of fasting to evaluate insulin resistance by blood glucose and plasma insulin. Following anesthesia injection, cardiac puncture was performed before termination at week 14. Blood was used for serum LBP analysis and finally liver tissue was harvested for quantification of triglycerides. Blood glucose was measured using a *Accu Check* glucose meter. Insulin, LBP and TAGs were analyzed by ELISA.

Result: After 14 weeks, all four experimental groups (VT HF, VT HF + FB, NOX1KO HF, NOX1KO HF + FB) showed significant weight gain due to high-fat diet with or without fava beans. Although no significant differences were found, it was shown by energy conversion that genotype can make a small difference, that intact ROS production via NOX1 leads to higher weight gain on smaller amounts of feed especially for the fava bean group. In vivo imaging confirmed decreased light signal from the abdominal region in NOX1KO mice. Between the VT groups, a slight trend was found that the high-fat diet with Fava beans contributed to a reduced light signal compared with a pure high-fat diet. Compared with control animals on the standard low-fat diet, a higher prevalence of insulin resistance was found in all mice in the experimental groups, no correlation was seen between weight and HOMA index, which suggests that the effect may come from the high-fat diet. Significant differences were found between the genotypes when triglycerides in liver tissue was measured. NOX1KO mice were found to be more prone to accumulation of TAGs, a slight trend for lower TAGs in the fava bean group was also found. Correlation between weight and TAG was not found, despite the heavier mice having a paler appearance on the liver tissue. All mice showed extremely high serum LBP values, including the standard low-fat control group. The assumption that our result is incorrect makes us in no position to evaluate the effect of NOX1 or fava beans on the potential endotoxins produced.

Conclusion: The results from this study did not show us many significant findings, although several trends support the theory that the ROS produced by NOX1 is important regarding the development of metabolic syndrome induced by high fat diets with or without favabeans.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Abstract.....	III
Forkortelser.....	VI
Innledning	1
1.1 Fedme og metabolsk syndrom og lav grad inflammasjon	2
1.2 Reaktive oksygen forbindelser (ROS).....	4
1.3 Belgvekster.....	6
1.4 Sammenhengen mellom tarmmikrobiota og fedme	8
1.5 Tarmens barrierefunksjoner og forsvarsmekanismer	9
1.6 Endotoksemi og metabolsk syndrom.....	10
1.7 Effekter av HFD på barrierefunksjon, inflammasjon og metabolsk sykdom	11
1.8 Hensikten med oppgaven	13
2.0 Metode og materialer	14
2.1 Dyreforsøk.....	14
2.2 Tillaging av musefôr.....	15
2.3 Vekt og fôr-registering.....	17
2.4 In vivo avbildning	17
2.4.1 Tillaging av L- 012 probe	18
2.5 Insulinresistens målt ved HOMA-IR indeks.....	18
2.6. Måling av insulin med ELISA	19
2.7 Kvantifisering av triglyserider i lever.....	20
2.8 Lipopolysakkarid-bindende protein (LBP).....	21
2.9 Terminering.....	22
2.10 Statistiske analyse	22
2.11 Etikk.....	23
3.0 Resultater	24
3.1 Sammenhengen mellom vekt og fôr-inntak	24
3.2 NOX1KO har betydelig lavere ROS produksjon enn villtypemus og Favabønner påvirker ikke ROS- produksjon i tarm etter 9 uker	28
3.3 Insulinresistens ble funnet hos alle mus på høfett diett, men ingen effekt av Favabønner eller NOX1 ble observert	29

3.4 Villtype mus så ut til å være bedre beskyttet mot akkumulering av TAG i levervev enn NOX1KO mus	31
3.5 Det ble funnet høye verdier av LBP i serum hos alle forsøksdyrene, men ingen forskjeller ble observert mellom gruppene.....	33
4.0 Diskusjon.....	35
4.1 Effekt av musefôr på vekt hos NOX1 og villtypemus.....	35
4.2 Bekreftelse på ROS-signal fra ileum hos villtypemus.....	37
4.3 Det ble påvist insulinresistens hos alle grupper på eksperimentell diett.....	38
4.4 NOX1KO mus viste høye nivåer av TAGs i levervev	39
4.5 Alle mus viste unormalt høye verdier LBP i serum	40
4.6 Metodologiske betraktninger	41
4.6 Videre arbeid.....	43
5.0 Konklusjon.....	44
Kilder	45
Vedlegg	53

Forkortelser

$^1\text{O}_2$	Singlet oksygen
CD14 / MyD88/ MD2	Komponenter i signalveien tilhørende signaloverføring av LPS via TLR
CGD	Kronisk granulomatøs sykdom (<i>Chronic Granulomatous Disease</i>)
CVD	Kardiovaskulær sykdom (<i>Cardio Vascular Disease</i>)
DSS	Dextran Sodium Sulfate
DUOX	Dual oksidase
e/ n /i NOS	Nitrogen oksid syntase i endotelvev/ nervevev/ induserbar
Fe^{2+}	To-verdig jern
FFA	Frie fettsyrer (<i>Free Fatty Acids</i>)
GAPs	Goblet Associated Pathways
GI	Fordøyelsessystemet (<i>Gastro Intestinal tract</i>)
GLUT4	Glukose transportør 4
H_2O_2	Hydrogenperoksid
HDL	Lipoproteiner med høy tetthet (<i>High Density Lipoproteins</i>)
HFD + FB	Høyfettdiett med Favabønner
HFD	Høyfettdiett
HO^*	Hydroksylradikal
HOCl	Hypoklorsyre
IL – 1β /6/10	Interleukin 1β /6/10
LBP	Lipopolysakkarid bindende protein
LPS	Lipopolysakkarid
MAG	Monoglyserid (<i>Mono Acyl Glyserol</i>)
Mets	Metabolsk syndrom
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid fosfat
NAFLD	Ikke alkohol indusert fettleversykdom (<i>Non Alcoholic Fatty Liver Disease</i>)
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain enhancer of activated B-cells

NLRP6	NOD-like reseptor høyt uttrykt i tarm
NLRs	NOD-liknende reseptorer (<i>NOD-Like Receptors</i>)
NO*	Nitrogenoksid
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
NOX	NADPH oksidase
O ₂	Oksygen
O ₂ ^{*-}	Superoksid anion
ONOO ⁻	Peroksinitritt
PPRs	Reseptorer som gjenkjenner spesifikke mønster (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
RNS	Reaktive nitrogenforbindelser (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Reaktive oksygenforbindelser (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
slgA	Sekretorisk Immunglobulin A
SREBP – 1C	Sterol Responsive Element Binding Protein -1c
T2D	Type 2 diabetes
TAG	Triglyserider (<i>Tri-Acyl Glycerol</i>)
TJ	Tette celledammenføyninger (<i>Tight Junctions</i>)
TLR4	Toll like reseptor 4
TLRs	Toll-liknende reseptorer (<i>Toll-Like Receptors</i>)
TNF-α	Tumor nekrose faktor alfa
WHO	Verdens helseorganisasjon (<i>World Health Organization</i>)

1 Innledning

På verdensbasis er det flere mennesker som har fedme enn undervekt og fedme blir i dag sett på som en pandemi (Geissler & Powers 2017). Fedme øker risiko for en rekke sykdommer som diabetes, hjerte- og karlidelser og en rekke kreftformer. Ubalanse i appetittregulering og energiomsetning er som oftest årsak til positiv energibalanse og vektoppgang. Dagens sedative livsstil og nærmest ubegrensede tilgang på mat og prosessert mat med høy energitetthet er hovedårsak (Mozaffarian et al. 2011). Andre faktorer som kan påvirke utvikling av overvekt er gener og epigenetiske faktorer, søvnmangel samt psykisk og somatisk sykdom (Geissler & Powers 2017). Det er godt etablert kunnskap at høyfettdietter, som for eksempel vestlig diett (45% fett), bidrar til økt vekt i befolkningen (Buettner et al. 2007).

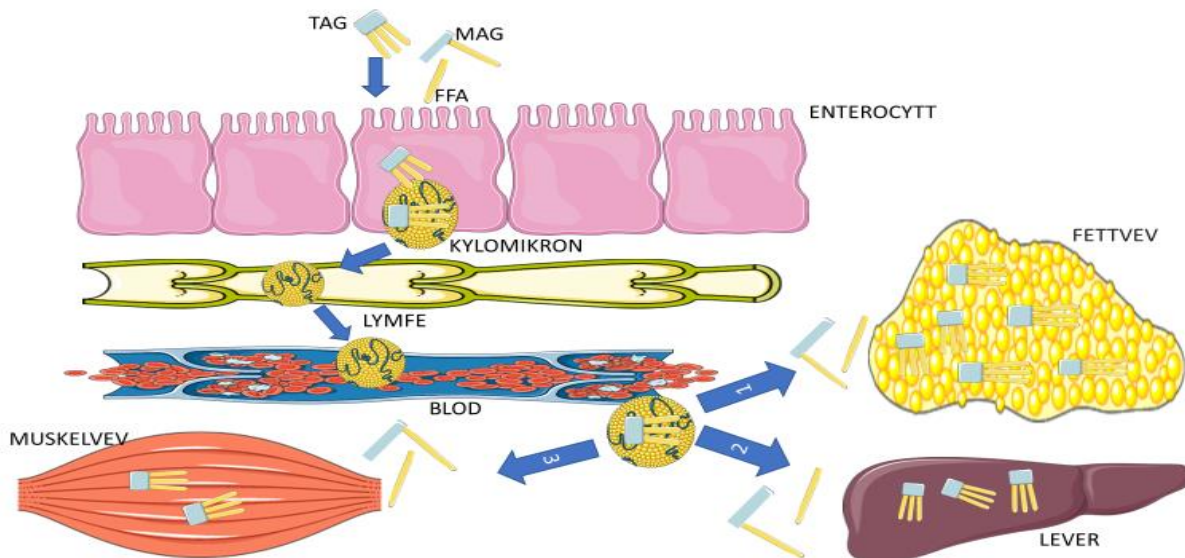
I de senere årene er det flere funn som tyder på at også tarmhelse er en del av bildet knyttet til utviklingen av overvekt og fedmerelaterte sykdommer. Både tarmens sammensetning av bakterier (mikrobiota), barriereegenskaper og inflammasjonstilstand blir påvirket av høyfettdiett i en retning som anses som negativ, og er assosiert med metabolsk syndrom. For eksempel er en sentral hypotese at en fettrik diett kan føre til økt lekkasje fra tarm til blod som videre kan øke systemisk lavgradsinflammasjon og øke forekomst av blant annet insulin resistens. Det er derfor viktig at tarmen har systemer som opprettholder en likevekt i tarm som sikrer at uønskede bakterier og bakterielle produkter ikke påvirker verten negativt. En rekke slike forsvarssystemer eksisterer i form av fysiske, kjemiske og immunologiske barrierer. I de senere årene er det vist at også reaktive oksygenforbindelser (ROS) kan ha betydning i forsvaret av tarmens integritet. Flere tarmspesifikke ROS-produserende enzymer finnes langs tarmen, deriblant NADPH oksidase 1 (NOX1). Hvilken rolle de har der er først nå begynt å komme til syne, og hovedfunn viser at de har betydning for sårheling i tarm, bakteriemengde og sammensetning. Det er også funn som tyder på at NOX1 også kan beskytte mot lekkasje fra tarm til blod. Så langt har ingen undersøkt om NOX1 har betydning for fedme og insulinresistens induisert med høyfettdiett.

Innledning

1.1 Fedme og metabolsk syndrom og lav grad inflammasjon

Metabolsk syndrom (MetS) er et begrep som beskriver en ansamling av risikofaktorer for hjerte og karsykdom (CVD) og diabetes type 2 (T2D) (Huang 2009). Ifølge WHO inkluderer disse fedme, insulinresistens, dysregulerte lipidnivåer som lave HDL- nivåer og forhøyede triglyserider i blod og høyt blodtrykk. Behandlingen rettes mot risikofaktorene og den mest effektive behandlingen er per i dag vektnedgang ved fedme (Nikolopoulou & Kadoğlu 2012). For å klassifiseres MetS er det allment akseptert at tre av fem kriterier må oppfylles.

Det er godt dokumentert at lavgradinflammasjon som følge av fedme er en viktig faktor i utviklingen av fedmerelaterte sykdommer slik som insulinresistens og T2D (Hotamisligil 2006). Fett som blir tatt opp fra kosten blir fraktet i blodet med kylomikroner, og lagret som triglyserider, hovedsakelig i fettvev (Figur 1). Når inntaket av energi er i overskudd vil fettvevsceller (adipocytter) øke i volum (Sun et al. 2011). Denne hypertrofien fører til hypoksi i deler av vevet som gir økt inflammasjon og endrer adipocyttenes normalfunksjon. Hypertrofiske adipocytter utvikler en mer inflammatorisk fenotype, det vil si de blir lettere nekrotiske og tiltrekker makrofager til fettvevet (Jernås et al. 2006). Utviklingen av den kroniske inflammasjonen er kort sagt preget av unormalt mye makrofager i perifere vev, med påfølgende aktivering av immunceller og proinflammatoriske cytokiner slik som TNF- α , IL-6 og IL-1 β (Lumeng et al. 2007; Weisberg et al. 2003).



Figur 1. Opptak og transport av TAG til vevene. For at Triglyseridene (TAG) fra matfettet skal kunne passere tarmlumen må det brytes ned til mindre enheter (Mahan & Raymond 2016). TAG består av tre fettsyrer bundet til glyserol via en esterbinding. I tarmlumen spaltes TAG til mono – glyserider (MAGs) og frie fettsyrer (FFA) via lipaser og tas opp av enterocytene, bygges opp igjen, fraktes via kylomikroner (lipoprotein) via lymfevevet og over i blodbanen. Kylomikronene fraktes så videre i blodet til blant annet fettvevet, som frigir lipoprotein-lipase som hydrolyserer TAG til frie fettsyrer (FFA) og glyserol, frakter de inn i fettvevet og setter de sammen (esterifiseres) til TAG. Høyfett dietter er assosiert med økt lagring av TAGs og akkumulering av frie fettsyrer i fettvev og levervev. Bildene til figuren er hentet fra smart servier medical art: <https://smart.servier.com/>

Innledning

Evnen adipocytterne har til å øke i størrelse ser ut til å være avhengig av fettkilden. I en studie ble det funnet at mettet fett bidro til at fettvevet økte to ganger i størrelse sammenliknet med flerumettet fett selv om energiinntaket var det samme (Rosqvist et al. 2014). Mettet fett ble også akkumulert i lever, mens flerumettet fett i større grad ble lagret i magre vev som skjelettmuskel. Når inntaket av fett i kosten stadig er i overskudd, vil også kapasiteten adipocytterne har til å lagre frie fettsyrer (FFA) som TAG i fettvevet overskrides (Parker 2018). De frie fettsyrene vil dermed tas opp i lever, esterifiseres til TAG i hepatocytterne og lagres der. Om fettlagring i hepatocytterne ikke stagnerer, men fortsetter, vil fettlever med påfølgende lipotoksisitet utvikles og videre føre til «*non alcoholic fatty liver disease*» (NAFLD).

Den økte importen av FFA i lever fører til svekket insulinsensitivitet (Bevilacqua et al. 1987). Insulinsensitiviteten gir økt transkripsjon av «*sterol responsive element binding protein 1c*» (SREBP-1c) og de novo-lipogenese i levervevet, som begge fører til økt steatose. I tillegg til de metabolske forandringene, er de frie fettsyrene pro-inflammatoriske ved at de stimulerer NF- κ B signalveien og aktiverer levervevets makrofager (Kupffer cellene) hvor immunresponsen gir lav grad av inflammasjon i levervevet (Boden et al. 2005).

På bakgrunn av dette er systemisk inflammasjon derfor antatt å ha sitt opphav i fettvevet. Det er allikevel økende evidens for at også tarm og tarmmikrobiota bidrar til utviklingen av metabolsk sykdom (De Wit et al. 2008; Ding et al. 2010). Karaktertrekkene ved fedme og T2D med både insulinresistens og lavgradinflammasjon indikerer at immunrespons og metabolsk regulering hører sammen.

1.1.2 Insulinresistens

En konsekvens av økt fettakkumulering i lever og fettvev kan bli insulinresistens, som er forstadiet til diabetes. Insulin produseres av bukspyttkjertelens β -celler som respons på økte glukosenivåer i blodet stiger som etter et måltid (Mahan & Raymond 2016). Insulins fremste oppgave er å stimulere til lagring av makronæringsstoffer etter et måltid (overskudd av energi). Blant annet stimulerer insulin ulike vev til å ta opp glukose. Mekanismen for dette er at insulin først binder til insulinreseptor på cellens overflate som via intracellulær signaloverføring stimulerer GLUT4-inneholdende vesikler til å transporteres til cellens overflate og dermed øke tettheten av glukosetransportører som mer effektivt kan transportere inn glukose. De vevene som tar opp det meste av glukosen er skjelettmuskel, men lever og fettvev tar også opp glukose. I skjelettmuskelen og i levervev stimulerer insulinet også til syntese av glykogen fra glukose. Videre stimulerer insulin til opptak av fett fra både kylomikroner og VLDL særlig i fettvev, og stimulerer proteinsyntese særlig i muskel. I leveren hemmer insulinet glukoneogenese og glykogenolyse som dermed hindrer at mer glukose frigis til blodet. I fettvevet hindrer insulin nedbrytning av fett og stimulerer til opptak av glukose. Alle disse mekanismene er til stede for å øke glukoseopptaket, redusere sirkulerende glukose og øke konvertering til lagringsmolekylene glykogen, fett og proteiner.

Insulinresistens alene anses som en forløper for T2D og omtales som prediabetes. Ved insulinresistens responderer ikke fett, lever og muskelceller optimalt på insulin. Dette skjer først og fremst ved at signaloverføring fra insulinreseptor til effektormolekylene blir redusert. Denne reduksjonen kan ha genetisk opphav (Mahan & Raymond 2016) eller opptre som følge av fedme og lite fysisk aktivitet.

Innledning

Lavgradsinflammasjon i fettvevet synes å være en viktig pådriver i utvikling av insulinresistens. Når adipocytene vokser i størrelse vil blodtilførsel til fettvevet avta og oksygenmangel oppstår (Harford et al. 2011). Hypertrofisk fettvev fører også til en endring i fettvevets lokale immunceller. Makrofager og T-celler endrer seg fra en anti-inflammatorisk til en pro-inflammatorisk tilstand ved at pro-inflammatoriske makrofager (M1 makrofager) frigir cytokiner (IL-1 β , IL-6 og TNF- α). Det er vist at inflammatoriske cytokiner kan blokkere insulinets effekt på adipocytter (Harford et al. 2011). Individuer med normal fettmasse har færre M1-makrofager og flere M2-makrofager. M2-makrofagene er assosiert med sårtilheling og produksjon av anti-inflammatoriske cytokiner slik som IL -10. Videre er effektor T- celler (cytotoksiske T-celler) funnet å fremme rekruttering og aktivering av M1- makrofagene i hypertrofisk fettvev ved å skille ut pro-inflammatorisk interferon gamma (IFN- γ).

I tillegg vil hypertrofisk fettvev typisk føre til mer nekrose som også bidrar til økt makrofagaktivering og immuncellerekruttering med påfølgende inflammasjon og systemisk insulinresistens (Strissel et al. 2007; Ye 2009).

Til slutt, større mengder FFA ser også ut til å være problematisk for effekt av insulin i fettcellene siden økt mengde FFA som følge av HFD vil gi en økt syntese av TAG i fettvevet. Dette er vist å blokkere insulin-signalveien via belastning av endoplasmatisk retikulum og aktivering av JNK-signalveien (Jiao et al. (2011). En annen studie viste at en økning av adipocytstørrelse med påfølgende hypoksi og frigitte FFA til sirkulasjonen ga hemmet glukose opptak i adipocytene ved å blokkere insulinsignalveien (Yin et al. (2009).

1.2 Reaktive oksygen forbindelser (ROS)

Reaktive oksygenforbindelser (ROS) er en samlebetegnelse for forbindelser som inneholder oksygen og som har sitt utspring fra superoksid anion. Superoksid anion produseres kontinuerlig i alle celler i mitokondriene som et biprodukt av aerob respirasjon. Tidligere ble ROS sett på som utelukkende uønskede og toksiske produkter der de ble satt i sammenheng med inflammasjon og degenerative sykdommer (Aviello & Knaus 2018). Dette er en generalisering som ikke har vurdert diversiteten til oksygenmetabolittene som dannes, deres fysiokjemiske karakter og / eller deres produksjon via spesifikke enzymer til enhver tid. Elektrontransportkjeden har ROS som et biprodukt, men NOX /DUOX NADPH oksidaser er de eneste enzymene som bare er dedikert til ROS produksjon. De er å anse som hovedprodusent av ROS og for intracellulær kommunikasjon da deres reguleringsmekanismer er funnet høyt uttrykt i mange vev.

Reaktive oksygen forbindelser er en rekke forbindelser som stammer fra oksygen (O₂). Deres levetid avhenger av hvor lett de reagerer med andre komponenter og hvor stabile de er. ROS omfatter radikale forbindelser slik som superoksid (O₂^{*-}), hydroksylradikal (HO^{*}), singlet oksygen (¹O₂) og noen ikke-radikale forbindelser slik som hydrogenperoksid (H₂O₂) og hypoklorsyre (HOCl) (Aviello & Knaus 2018). HO^{*} er svært reaktiv med en halveringstid på 10⁻⁹s, deretter kommer O₂^{*-} (10⁻⁵s). H₂O₂ er den ROS med lengst halveringstid; 10⁻³s som gjør den til en relativt stabil og svak oksidant. ROS kan med sin reaktive natur potensielt reagere med de fleste molekyler og endre deres struktur eller skade dem. Men det er sett at ROS også gir et positivt bidrag med viktige funksjoner i alle kroppens celler og vev som blant annet forsvar mot bakterier, celledifferensiering, uttrykk av gener og cellevekst (Bedard & Krause 2007).

Innledning

I likhet med ROS, finns reaktive nitrogenforbindelser (RNS), forbindelser som stammer fra nitrogenoksid (NO^*). NO^* er ikke særlig reaktivt alene, men i nærvær av superoksid vil den kunne danne peroksinitritt (ONOO^-). Peroksinitritt er ikke en radikal men er like reaktiv som HO^* (Brown & Griending 2009). I motsetning til HO^* er ONOO^- mye mer stabil (Beckman 1996). Likevel kan ONOO^- ha skadelige effekter i seg selv eller gjennom dannelse av andre nitrogenholdige forbindelser (Singer et al. 1996).

I elektrontransportkjeden i cellens mitokondrium vil superoksid anion være starten for en rekke reaksjoner som danner andre ROS (Aviello & Knaus 2017; Aviello & Knaus 2018). Produksjonen av superoksid anion er høy i mitokondriet og i rommet rundt (cytosol) grunnet ufullstendig reduksjon av oksygen til vann. For å unngå opphoping av superoksid anion har cellen ulike superoksid dismutaser (SODer) som kan omdanne superoksid til hydrogenperoksid. Hydrogen peroksid kan videre bli omdannet til vann ved hjelp av katalase eller glutatation peroksidase.

H_2O_2 kan også danne hydroksyl radikaler i nærvær av Fe^{2+} (Fenton-reaksjonen). Dette radikalet er svært reaktivt og gir oksidative skader i cellene, som DNA mutasjoner (Chen & Schopfer 1999). Om H_2O_2 er i kontakt med klor, kan det i tillegg omdannes via peroksidaser til den svært celletoksiske metabolitten hypoklorsyre (HOCl) (Aviello & Knaus 2017).

1.2.1 NADPH oksidaser

I tillegg til elektrontransportkjeden kan ROS produseres av transmembrankomplekser; NADPH-oksidaser. Det er funnet syv isoformer av NADPH-oksidaser hos mennesker; NOX 1-5 og DUOX 1-2 (Aviello & Knaus 2017; Bedard & Krause 2007). Av disse er det kun NOX5 som ikke uttrykkes i mus. NOX og DUOX enzymene finnes i ulike vev med forskjellig funksjoner. NOX2 var det første som ble funnet. NOX2 produserer superoksid særlig i nøytrofile granulocytter, men også makrofager ved aktivering av det medfødte immunsystemet som følge av en infeksjon (Snelgrove et al. 2004). I disse cellene blir NOX2 aktivert via ulike pattern recognition reseptorer og produserer massive mengder ROS i en reaksjon omtalt som respiratorisk utbrudd (Parham 2014). Hensikten med dette er først og fremst å hjelpe nøytrofile granulocytter og makrofager i å drepe bakterier tatt inn ved fagocytose.

At NOX2 har en viktig rolle i fjerning av bakterier vises tydelig i pasienter som har en mutasjon i NOX2. Dette fører til mangel på ROS-produksjon og gir opphav til kronisk granulomatøs sykdom (CGD) (Romani et al. 2008).

NOX1 er i motsetning til NOX2, ikke uttrykt i immunceller, men er til gjengjeld høyt uttrykt i epitelcellene i tykktarmen og i noe mindre grad i tynntarmssegmentet ileum og cecum (Bedard & Krause 2007). NOX1 er også funnet i andre vev som glatt muskulatur, livmor, prostata, og endotelceller. De resterende NOX3-5 er blitt funnet i lever, lunger, nyrer, milt, eggstokker og testikler, mens DUOX1-2 er å finne i hele fordøyelsessystemet (Panday et al. 2015).

Nitrogenoksid syntaser (NOS) danner også ROS med viktige roller i kroppen (Förstermann & Sessa 2012). NOS produseres i 3 ulike isotyper i ulike vev; nNOS (nervevev) og eNOS (endotelceller) og iNOS (induserbar NOS). eNOS og nNOS er til stede i vevene i korte perioder i lave konsentrasjoner og er sett å være svært viktige for kontroll med blodtilførsel til mukosa i tarm, samt tarmens bevegelighet og barriere funksjoner. iNOS uttrykkes i alle vev men ikke før etter aktivering av spesifikke proinflammatoriske cytokiner og mikrobielle produkter som følge av infeksjoner hvor iNOS produserer NO i større mengder (Kolios et al. 2004).

Innledning

1.2.2 ROS og NOX1 i tynntarmen

I de senere år er også reaktive oksygenforbindelser (ROS) ansett som en del av forsvarssystemet i tarmveggen, trolig som følge av deres antimikrobielle egenskaper. Det er flere studier som kan vise til sammenhenger mellom verten og dens mikrobiota og NOX1 sin rolle for å opprettholde homeostase i tarmen.

NOX1 uttrykkes som nevnt i mindre grad i tynntarm enn i tykktarm. iNOS derimot er høyt uttrykt i tynntarmsegmentet ileum. Ved aktivering av iNOS ved høy bakterievekst som følge av sykdomstilstand i tarmen er det funnet at iNOS og NOX1 i tynntarmsepellet sammen er ansvarlig for produksjon av ROS i form av peroksinitritt (Matziouridou et al. 2018). Peroksinitritt er svært reaktivt og kan blant annet måles via den kjemiluminescerende proben L-012 og in vivo avbildning (Dyke et al. 2007; Kielland, Anders et al. 2009). Matziouridou et al. (2018) fant at ROS signalet i villtypemus økte proporsjonalt med bakterieveksten, mens det for NOX1 og iNOSKO mus ble redusert. Økt mengde bakterier som følge av manglende ROS produksjon (via DUOX) er også demonstrert i andre studier, for eksempel i bananfluer (*Drosophila melanogaster*) og gulfebermygg (*Aedes aegypti*) (Ha et al. 2005; Xiao et al. 2017). En studie av Kato et al. (2016) viste at ved å påføre irritasjoner i tarmvevet via lave konsentrasjoner av DSS (2%), ble NOX1 aktivitet oppregulert som en følge av frigjøring av cytokiner og vekstfaktorer fra immunforsvaret. Selv om studien så på NOX1 i tykktarm er det nærliggende å tro at samme mekanisme finnes i ileum. For å opprettholde homeostase i tarmen er det viktig å holde patogener unna. NOX1 er funnet å beskytte mot kolonisering av patogener via oppregulering av DUOX2 og ROS produksjon (Pircalabioru et al. 2016)

Matziouridou et al. (2018) har også funnet grunnlag for å tro at ROS har en antimikrobiell rolle i tynntarm. Som vil bidra til å opprettholde homeostasen ved å hemme bakteriell overvekst og refluks av bakterier fra tykktarm.

1.2.3 NOX1 i levervevets endotel

NOX1 funnet i endotelet i levervevets sinusoider er også blitt undersøkt i forhold til NAFLD. Matsumoto et al. (2018) fant oppregulering av NOX1 hos villtypemus etter 8 uker på høyfettdiett. Sammenlignet med NOX1KO fant de økt skade på levervev som følge av redusert tilgang på NO med økt peroksinitritt.

1.3 Belgvekster

Globalt sett kan bruk av belgvekster som menneskemat spores langt tilbake i tid (Martín-Cabrejas 2019). Tradisjon for dyrking og bruk av belgvekster i Norge er funnet at begrenser seg til erter og Favabønner (*Vici fabae*) hvor sistnevnte stort sett har blitt benyttet som fôr til husdyr (Abrahamsen et al. 2018). De senere årene hvor bærekraft, helse, klima og dyrevelferd er mer i fokus har også interessen for økt produksjon av belgvekster steget.

Forskning på belgvekstene har gitt oss kunnskap om deres ernæringsmessige og helsefremmende fordeler. Store deler av forskningen på belgvekster er forbeholdt soyabønner og kikerter (Clark et al. 2018). Her til lands har forskere sett på mulighetene for å øke produksjonen av både erter og Favabønner både til fôr og matproduksjon (Asheim et al. 2019).

Innledning

Belgvekstene er funnet å være rike på protein og komplekse karbohydrater slik som kostfiber og resistent stivelse. De inneholder relativt lite fett, er en god kilde til mineraler som jern, sink og kalsium, de inneholder i tillegg en god del B vitaminer (Martín-Cabrejas 2019). Belgvekster bidrar også med funksjonelle bioaktive komponenter. Det er funnet at visse antioksidanter ser ut til å regulere ned blodsukker og blodfettlipider og kan ha antikarsinogene effekter. Antioksidanter som er høyt presentert i belgvekster er fenolkomponenter som for eksempel flavonoider, lignans og tanniner. De med farge i skallet inneholder også anthocyaniner.

1.3.1 Favabønner (*Vicia faba*)

Belgvekster har lenge vært brukt i forebygging og behandling av MetS og T2D grunnet sin lave påvirkning på blodsukkeret. Favabønneens sammensetning vil trolig være et godt bidrag her. Bortsett fra soyabønner (~40% protein) er favabønne den belgveksten med høyest proteininnhold (~30% protein). Favabønner har også mindre fettinnhold enn soyabønne (El-Shemy et al. 2000). Proteininnhold i belgvekster kan påvirke blodglukose indirekte ved å gi mindre plass til karbohydrater. Proteintilgjengeligheten i Favabønner av sorten Columbo er optimal da den er fri for tanniner (Kantar et al. 1996). Karbohydratene i belgvekster består også av høy andel resistent stivelse (Bednar et al. 2001). Blodglukosen påvirkes ikke av resistent stivelse da den ikke spaltes til glukoseenheter av hydrolasene i tynntarmen slik annen type stivelse gjør, men passerer videre til tykktarmen og blir næring til bakteriene der. Dette gjelder også for kostfiber som vil utgjøre skallet på belgvekstene. Andel stivelse i Favabønner er målt til 25% og kostfiber 16,5% (matvaretabellen.no, 2020).

I forhold til helse effekter som følge av matvarer, såkalte «functional foods» har forskere rettet sin interesse også mot anti-næringsstoffer i belgvekstene og deres helseeffekter.

Polyfenoler slik som isoflavonoider og anthocyaniner er av flere sett å påvirke mange mekanismer involvert i insulinresistens (Clark et al. 2018). Favabønner er funnet å inneholde flere av isoflavonoidene som er involvert i disse mekanismene slik som Daidzein og Genistein, mengden funnet var derimot relativt lav sammenliknet med blant annet soyabønner (Franke et al. 1994; Turco et al. 2016). Favabønnesorter som har flekkvis pigmentering i skallet slik som «*Vicia faba columbo*» vil også inneholde en del anthocyaniner (Belwal et al. 2017). Generelt er Favabønner målt å inneholde ganske høye mengder antioksidanter totalt (Martín-Cabrejas 2019).

1.3.2 Belgvekster og helseeffekter assosiert med tarm

Interessen for koblingen mellom belgvekster i dietten, mikrobiota, inflammasjon og indikatorer for MetS er sett på av noen forskere.

Monk et al. (2017) viste at å erstatte melkeproteinene i standard diett (chow) med kikertmel ga en svært positiv effekt i forhold til krypt lengde og proliferasjon av epitelceller i tykktarmen. De fant også økt oppregulering av elementer assosiert med bedring i barrierefunksjon som blant annet økt mukusproduksjon og positive endringer i tykktarmsmikrobiota. Det ble også funnet ulikheter i bakteriesammensetningen i cecum og colon. Et interessant funn i denne studien var at kikerdietten ga musene en signifikant større vektøkning ($p = 0,03$) sammenliknet med standard dietten. På tross av dette ble det argumentert for at kikerter endrer bakteriesammensetningen til å bestå av mindre fedmerelaterte bakteriefylum.

Innledning

Nakatani et al. (2018) ønsket å undersøke om det var noen effekt av protein-isolat fra mungbønner i en HFD sammenliknet med HFD med melkeprotein på ulike parametere for MetS og deretter hvordan dette hang sammen med mikrobiota (Nakatani et al. 2018). De satte først opp et forsøk med vanlig VT-mus hvor blant annet kroppsvekt, insulin, blodsukker og TAG i lever ble funnet signifikant høyere i høyfettgruppen med melkeprotein. For å finne effekt av mikrobiota benyttet de seg deretter av bakteriefrie mus. Effekten fra mungbønne-protein viste seg da å avta og det var ikke lenger noen signifikant forskjell på de målte MetS-parametere. Funnene tyder på at effekt av belgvekster ser ut til å være avhengig av mikrobiotastatus. Forskergruppen fant også at vektøkningen var lavere i gruppen som fikk mungbønneprotein tilsatt i HFD.

Flere forskere har funnet at ulike belgvekster har beskyttende effekter i tarm når de ble gitt i forkant av en DSS-indusert kolittmodell (Graf et al. 2019; Monk et al. 2015; Monk et al. 2018a; Zhang et al. 2014). DSS (Dekstran saltsulfat) gitt i drikkevann er en veletablert metode for å inducere tarmbetennelse i mus og rotter. De fant også at det varierte hvor godt de enkelte belgvekstene beskyttet. Det synes å være konsensus rundt at årsak til effekt skyldes ulik mengde ikke-fordøyelige karbohydrater og fenolkomponenter i de forskjellige belgvekstene som videre er av betydning for tykktarmsbakterienes evne til å produsere kortkjedede fettsyrer og sekundære fenolkomponenter.

I 2015 utførte Monk et al. en studie hvor de sammenliknet tidligere funn av Zhang et al. (2014). Begge studiene gikk ut på å inducere betennelse i tarm ved hjelp av DSS. Zhang studien vurderte effekt av navy og sorte bønner mens Monkstudien vurderte effekt av hvite og mørke kidneybønner. Belgvekstdiettene i begge studiene ble gitt noen uker i forveien for å fremme en forebyggende effekt. Begge dietter viste seg å beskytte mot vekttap, gi fastere avføring med mindre blod og mindre inflammasjon. Kidneybønner i dietten viste seg likevel å beskytte mer enn navy og sorte bønner mot DSS-indusert skade i tykktarm.

Antioksidant status (ORAC) ble også vurdert i disse studiene hvor navy, sorte og hvite kidneybønner så ut til å gi høyere nivå etter DSS behandling enn vanlig standard diett (chow) og mørke kidneybønner ga.

Monk et al (2018) og Graf et al. (2019) vurderte også effekt av henholdsvis kikerter og røde linser ved DSS indusert kolitt. De fant tilnærmet de samme beskyttende effekter som overnevnte studier. Begge disse studiene så også på LBP nivå i serum, hvor kikerter reduserte LBP nivå i større grad enn røde linser gjorde.

1.4 Sammenhengen mellom tarmmikrobiota og fedme

Den gastrointestinale trakten (GI) er det stedet på kroppen hvor vi har flest bakterier (Sender et al. 2016). Mikrobiotaen består også av andre mikroorganismer som virus, sopp og arker, men klart i overvekt av bakterier. Sammensetningen og konsentrasjonen av bakterier øker fra proksimal til distal ende i tynntarm og er særlig høy i tykktarm (Donaldson et al. 2016; Tanaka & Nakayama 2017). Grunnen til ulik sammensetning og mengde skyldes forskjeller i pH, mengde antimikrobielle peptider i tarmslimhinnen, tilgang på O₂ samt tiden lumens innhold bruker på å passere fra A til Å. Sammensetningen av mikrobiota varierer fra person til person. Den påvirkes av hvilke arter vi først blir kolonisert med (via fødsel) og påvirkes deretter av det miljøet vi lever i.

Selv om det er enighet om at fedme kommer av et for høyt energiinntak i forhold til energiforbruk, har likevel tarmens samspill med verten vist seg å spille en viktig rolle i regulering av energihomeostasen.

Innledning

Det er funnet at tarm- mikrobiotaen inneholder gener som koder for proteiner og enzymer som kan bidra til å hente ut energi fra komponenter i maten.

Dette ble først demonstrert av Bäckhed et al. som viste at bakteriefrie mus ikke utviklet fedme og insulinresistens når de ble føret med høyfettdiett (Bäckhed et al. 2004; Bäckhed et al. 2007). De fant at de bakteriefrie musene var slankere av utseende og hadde lavere kroppsfett enn mus som var kolonisert med en normal mikrobiota. Når de bakteriefrie musene så ble kolonisert med normal mikrobiota ble det funnet at i løpet av kun 14 dager, på tross av et 29% lavere fôr-inntak, økte vekten raskt og fettlagrene steg med > 50%, det ble også funnet økte nivåer av fettlagringshormonet Leptin, nedsatt insulinsensitivitet (mindre insulin og mer glukose i blodet) og en 2.3% økning av triglyserider i lever. Funnene antyder at det er en sammenheng med utvikling av fedme og tilstedeværelse eller fravær av tarmmikrobiota.

Senere viste Turnbaugh et al. (2006) ved metagenomiske analyser at mikrobiota hos de med fedme inneholdt enzymer som hentet ut ekstra energi fra ikke-fordøyelige polysakkarider fra maten. Disse enzymene ble ikke påvist i en slankere mikrobiota, hvilket betyr at en fedmerelatert mikrobiota er flinkere til å hente ut energi fra maten. De målte også rest energi i feces for bekreftelse på energiutbytte. Til slutt overførte de tarmmikrobiota fra mus med fedme til slanke mus, hvor de fant at de slanke musene la på seg signifikante mengder kroppsfett over en 14 dagers periode på tross av uendret fôr-inntak.

Studier som har sett på mikrobiomet i tarm hos mennesker og mus har vist at *bacteroidetes* og *firmicutes* er de fyla som dominerer (Gill et al. 2006). Det er en del studier som har funnet at de med mer *firmicutes* og mindre *bacteroidetes* er mer utsatt for overvekt og fedme (Bäckhed et al. 2004; Ley et al. 2005; Turnbaugh et al. 2006; Turnbaugh et al. 2009). Studien utført av Ley et al. viste blant annet at mus som er genetisk disponert for overvekt, såkalte ob/ob mus, har større mengder *firmicutes* i sin tarmmikrobiota. Det er også studier som viser det motsatte (Carvalho et al. 2012; Schwartz et al. 2010) og de hvor det ikke ble sett noen endring (Duncan et al. 2008). Det er derfor fortsatt litt uklart hvilken betydning disse fyla faktisk har i forhold til fedme.

1.5 Tarmens barrierefunksjoner og forsvarsmekanismer

Tarmen bombarderes kontinuerlig av næringsstoffer og mikroorganismer fra mat og drikke. Det er kun et cellelag, kalt tarmepitelceller som skiller tarmlumens innhold fra blodet. Den korte avstanden fra tarmlumen til blodbanen er helt essensielt for at næringsstoffer skal kunne absorberes, men utfordrende med tanke på å hindre inntrenging av bakterier over barrieren og inn i det systemiske kretsløpet. Det er derfor helt essensielt for tarmen at den kan forsvare seg. Av denne grunn finnes fysiske, biokjemiske og immunologiske barrierefunksjoner (Nagpal & Yadav 2017).

Tynntarmslumen er som nevnt bygget opp av ett cellelag (Barrett 2014) som består av flere ulike celletyper som stammer fra en felles stamcelle organisert i tarmtotter og krypter. Cellelaget utgjøres av celletyper som enterocytter, begerceller (Gobletceller), Paneth-celler, enteroendokrine celler og stamceller. Mellom cellene er det tette sammenføyninger (*tight junctions*) som kontrollerer passasje av molekyler og eventuelt mikroorganismer mellom cellene. Slippes uønskede mikrober over i strukturen under epitelcellelaget (*lamina propria*), vil det potensielt kunne trigge en immunrespons (Assimakopoulos et al. 2011). En for kraftig immunrespons mot eventuelle inntrengere vil være svært

Innledning

skadelig for tynntarmsepitelet, og det er derfor essensielt at tarmens immunsystem har mekanismer som kan dempe denne immunresponsen. Dette kalles toleranse, og er en aktiv mekanisme som sørger blant annet for at immunceller i tarmvevet domineres av antiinflammatoriske T-regulatoriske celler og makrofager med antiinflammatorisk fenotype.

Begercellene produserer mukus (slim) som bidrar til en fysisk barriere som dekker og beskytter epitelcellelaget. Den bidrar også til kolonisering av kommensale bakterier. Kolonisering av kommensale bakterier er viktig for å konkurrere mot patogener og vekst av opportunistiske bakterier. Bakteriefrie mus har eksempelvis redusert slimlag i tarm, som bekrefter viktigheten av de kommensale bakteriene for regulering av slimproduksjonen i tarmen (Johansson et al. 2015). Slimlaget har også biokjemiske egenskaper da det inneholder glykoproteiner, peptider og antistoffer med antimikrobielle egenskaper som kan beskytte mot potensielle patogener (Mowat & Agace 2014).

Paneth-celler produserer antimikrobielle peptider til slimlaget slik som defensiner og lysosom C. Paneth cellene anses som en del av det medfødte immunforsvaret sammen med flere viktige immunceller som makrofager og dendrittiske celler som er å finne i Lamina propia.

Det adaptive immunforsvaret består av T- og B-celler som ligger latent i Lamina propia og som er induert til å gjenkjenne spesifikke bakterier og antigener. En særdeles viktig funksjon til B-celler er å skille ut store mengder immunglobulin A (sekretorisk IgA) som blir ført ut i tarmslimhinnen via epitelceller. Sekretorisk IgA er alltid tilstede i tarmslimhinnen og vil kunne binde opp både kommensale og potensielt patogene bakterier og hindre dem i å komme for nær vertsvetvet (Parham 2014).

Videre er tarmen utstyrt med en rekke medfødte immunreseptorer (Pattern recognition receptors) med det formål å sanse tilstedeværelse av mikrobielle inntrengere og stimulere forsvaret ytterligere. Eksempler er ulike Toll like reseptorer (TLRs) og Nukleotidbindende oligomeriseringsdomenholdig protein (NOD). Disse finnes blant annet i epitelceller, og kan blant annet stimulere Panethceller til å skille ut mer antimikrobielle peptider.

1.6 Endotoksemi og metabolsk syndrom

Flere har koblet tarmbakterier og produkter av disse opp mot metabolsk syndrom via en mekanisme beskrevet som endotoksemi (Cani et al. 2007; Cani et al. 2008; Carvalho et al. 2012; Everard et al. 2012; Kim et al. 2012). Høyfettdietter har som nevnt en innvirkning på bakteriesammensetningen i tarmen og det er funnet at gramnegative bakterier av fyla som *proteobacteria* og *firmicutes* er høyt presentert i tarm hos de med fedme. De gramnegative bakteriene produserer endotoksiner av typen lipopolysakkarider (LPS). Disse er funnet i forhøyede mengder i plasma i overnevnte studier. Forhøyede plasma verdier av LPS er en indikasjon på økt permeabilitet i tynntarmsepitelet. Endotoksinene er potente til å aktivere signalveier via binding til Toll like reseptor 4 med påfølgende aktivering av immunresponser. Det er funnet at høy LPS i plasma øker makrofager i fettvevet, insulinsensitivitet og tri-glyserider i levervev (Cani et al. 2007). Cani et al. (2007) demonstrerte funksjonen til LPS ved å legge inn en osmotisk pumpe som ga fra seg små mengder LPS i fire uker. Sammenliknet med kontrolldyr fant de en økning av TLR4, fettvev og proinflammatoriske cytokiner i levervev. Effekten LPS så ut til å ha var lik den funnet ved høyfettdietter og kunne nå ses på som en potensiell igangsetter for metabolsk syndrom. Med denne kunnskapen er det derfor foreslått at kronisk forhøyede LPS i plasma kan føre til både å fremme og

Innledning

vedlikeholde systemisk lav grads inflammasjon og fremme fedme relaterte sykdommer som T2D (figur 1).



Figur 1. Hypotetisk kan en høyfettdiett påvirke tarm-mikrobiota og ROS-produksjon og svekke barrierefunksjon i tarm. Endotoksiner vil lekke ut og føre til inflammasjon som gir økt forekomst av metabolsk sykdom. Illustrasjon etter inspirasjon av Cani et al. (2008) sin hypotese for bakterie induisert metabolsk sykdom.

1.5.1 Lipopolysakkarid bindende protein (LBP)

LBP er en del av et kompleks som aktiverer det medfødte immunforsvaret via liganden LPS (Akira 2001). I immuncellenes cellemembran vil komplekset bestå av elementer som blant annet CD14, MD2 og TLR4. LBP er et 60 kDa akutfaseprotein som produseres i lever som respons på LPS fra gramnegative bakterier. Den transporteres via blodet til inflammasjonsstedet sammen med LPS og vil kunne presentere LPS til immuncellenes overflatereseptorer (CD14, MD2 og TLR4). LBP kan måles i både plasma og serum, og har en lengre halveringstid enn LPS i blod og er derfor lettere å detektere (Agirosotelli et al. 2017). Å måle LBP kan derfor benyttes som en markør for inflammasjon og tilstedeværelse av LPS.

Det er vist at høye konsentrasjoner av LBP in vivo reduserer LPS aktiviteten og beskytter mot septisk sjokk forårsaket av gramnegative bakterier (Lamping et al. 1998). Det er også funnet at LBP binder til HDL molekyler og at LPS kan tas opp av HDL og tilintetgjøres (Massamiri et al. 1997; Wurfel & Wright 1997). Det ser derfor ut som LBP både nøytraliserer og øker effekten av LPS.

1.7 Effekter av HFD på barrierefunksjon, inflammasjon og metabolsk sykdom

Det er flere potensielle mekanismer som kan påvirke barrierefunksjonen i tarm ved inntak av en høyfettdiett.

Et høyt fettinnhold i kosten krever at det frigjøres større mengder galle for å muliggjøre opptak av fett i tarmlumen. Det er flere studier som har vist at større konsentrasjoner av galle i tarmlumen gir økt permeabilitet og svekket barrierefunksjon (Murakami et al. 2016; Suzuki & Hara 2010).

Cani et al. (2008) påviste at barrierefunksjonen ble svekket via nedregulering av proteiner som finnes i TJ (ZO 1 og Occludin) som følge av endring av mikrobiota ved HFD. LPS er ikke bare funnet å passere paracellulært. Gosal et al. (2009) fant at LPS også kan forlate tarmlumen via kylomikroner (Ghoshal et al. 2009). Det er også sett at LPS fraktes via microfoldceller, som er logisk da disse er eksperter på å fange opp gramnegative bakterier dekket med LPS (Lapthorne et al. 2012).

Teorien om økt forstyrrelse i barrierefunksjon som følge av høyfettdietter ble utfordret av Kless et al. (2015). De fant ved bruk av Ussing chamber at tarmepitelet hos høyfettførede mus var intakt og at LPS nivå ikke var forhøyet på tross av økt inflammasjon i fettvevet (Kless et al. 2015).

Innledning

Andre har også foreslått at de mikroorganismene som finnes i dyrestallen der forsøk utføres, kan være av betydning for hvordan høyfett dietten påvirker barrierefunksjonen (Müller et al. 2016).

Flere har også vurdert effekten av HFD på tarmbarrieren over tid (Hamilton et al. 2015; Tomas et al. 2016). Hamilton et al. fant at gen-uttrykket til proteiner i TJ faktisk ble oppregulert etter lengre tid på HFD. Det skal også nevnes at barrierefunksjonen normaliserte seg når rottene fikk normalt fôr igjen. Funnene tyder på at tarmbarrieren, til en viss grad, kan tilpasse seg sitt nye miljø og at den kan gjenopprette normalfunksjon igjen ved å gå over til en fiberrik diett.

Det vi spiser påvirker bakteriesammensetningen i tarmen (Christ et al. 2019; Lam et al. 2012; Lam et al. 2015). En høyfett diett med lite fiber vil som tidligere nevnt gi en forskyvning av fylum i retning mer *Firmicutes* enn *Bacteroidetes*. I tillegg vil høyfett dietter gi en redusert diversitet i tarmens mikrobiota (Christ et al. 2019). Denne endringen i mikrobiotaen i negativ retning kalles for dysbiose, som vil påvirke vertens immunsystem via flere mekanismer slik som modifiserte signaler via NLRP6 (NOD-like reseptor høyt uttrykt i tarm) og TLRs, reduksjon i antimikrobielle peptider, frigjøring av mukus til lumen, degradering av sekretorisk IgA, og tap av T-regulatoriske celler som fører til blant annet mindre anti-inflammatoriske cytokiner slik som IL-10 (Tanoue & Honda 2012). Alle disse faktorene ble funnet å føre til forstyrrelser i barrierefunksjonen, tap av homeostasen til immuncellene i tynntarmen med påfølgende økt inflammasjon koblet til utvikling av metabolsk sykdom.

Caesar et al. (2015) fant også at tarm-mikrobiota ble endret av ulike typer fett. De sammenliknet isokalori-dietter med mettet fett fra gris «Lard» og flerumettet fett fra fiskeolje (Caesar et al. 2015). De fant at mus som fikk fett fra gris hadde en helt annen mikrobiotasammensetning i tarmen enn de som fikk fiskeolje. Grisefettgruppen viste også signifikant økning i vekt, fôr-inntak og insulinresistens sammenliknet med fiskeoljegruppen. De fant også en økt inflammasjon i fettvevet hos grisefettgruppen som de bekreftet ved funn av oppregulert TLR2 og TLR4. I samme studie valgte de blant annet å benytte MyD88KO mus, for å se på betydningen av TLR (MyD88 er en viktig komponent i signaloverføringen tilhørende TLR4). Sammenlikning med VT mus på tilsvarende diett viste MyD88KO mus bedring i insulinresistens, de hadde mindre store adipocytter og mindre makrofager i fettvevet. De fulgte opp med fekaltransplantasjon fra disse musene over i bakteriefriemus for å bekrefte hvordan mettet fett kan påvirke tarm mikrobiota og gi opphav til inflammasjon i fettvev.

1.8 Hensikten med oppgaven

Ved å manipulere ROS produksjon i tarm (NOX1KO) er det vist at bakteriesammensetningen i tynntarm kan endres, og at dette kan føre til en svekket barrierefunksjon (Matziouridou et al. 2018). I høfettfôrede mus er dette mindre undersøkt. Det er heller ikke undersøkt om et innslag av fiber vil oppveie potensielt negative effekt av høfett diett slik som inflammasjon og utvikling av metabolsk syndrom.

Vi ønsket derfor å undersøke effekt av høfett diett med og uten Favabønner på barrierefunksjon hos NOX1KO mus og om en eventuell svikt i barrieren vil føre til endring i kroppsvekt, leverfett og insulinresistens.

For å vurdere om det er noen forskjeller mellom genotype og/eller diett skal følgende undersøkelser utføres underveis i forsøket:

1. Ukentlige vektkontroller av enkelt mus og veiing av fôr for å følge vektutvikling og fôr-inntak
2. In vivo avbildning for å etablere produksjon av ROS
3. Vurdering av insulinresistens via blodprøver fra fastende mus
4. Måling av LBP i plasma som et indirekte mål for LPS for å vurdere grad av endotoksemi som følge NOX1 bortfall.
5. Måling av triglyserider i levervev som mål på grad av fettlever

Metode og materialer

Følgende metoder ble utført høst 2019-høst 2020 ved Norges miljø og biovitenskaplige universitet.

2.1 Dyreforsøk

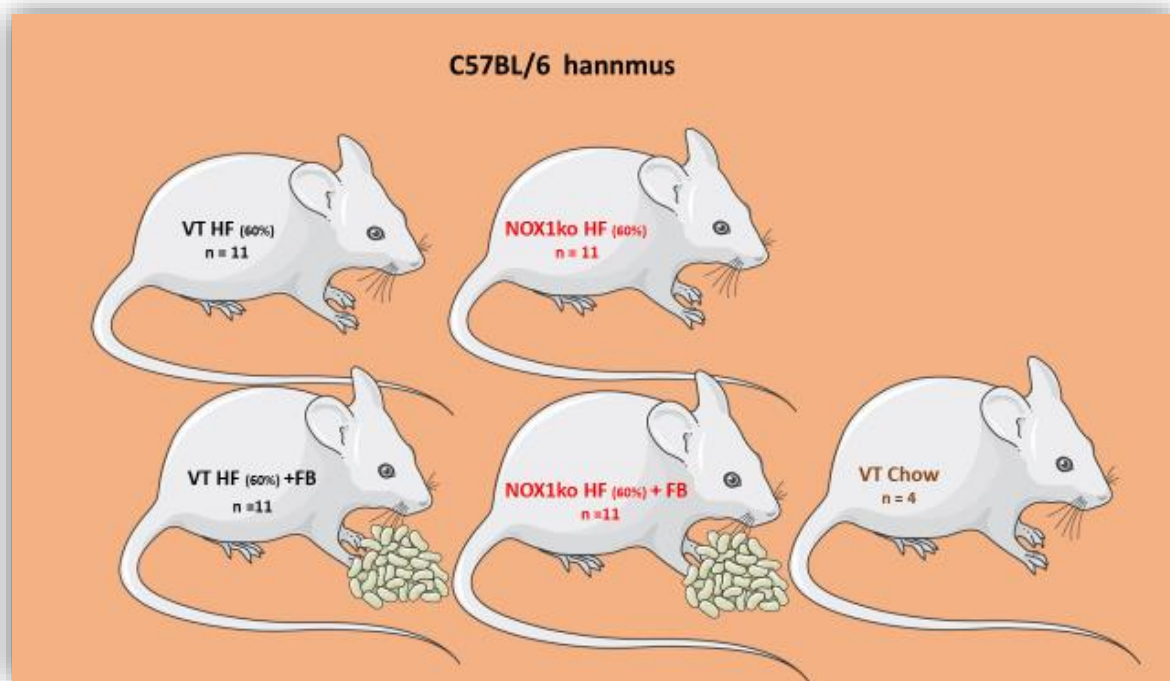
Til dette forsøket ble hannmus av typen NOX1 knock out (NOX1KO) og villtype (VT) mus benyttet. NOX1KO mus ble opprinnelig kjøpt inn fra Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) og avlet frem lokalt ved NMBUs dyrestall ved å krysse homozygote NOX1KO hunnmus med homozygote NOX1 hannmus. I disse musene er genet som koder for NOX1-proteinet slått ut i alle kroppens celler. VT mus med samme genetiske bakgrunn (C57BL/6J) og matchende alder med NOX1KO-musene ble benyttet som kontroller og innkjøpt fra Jackson labs.

Ved ankomst av villtypemus ble musene øremerket og fordelt tilfeldig i individuelt ventilerte bur (IVC). NOX1KO og VT mus ble holdt adskilt. Det ble fordelt 2-3 mus av samme genvariant i hvert bur. Burene ble plassert tilfeldig i oppstillingsstativet. Før forsøkets start ble dyrene akklimatisert i omtrent 10 dager slik at de skulle tilpasse seg de nye omgivelsene. For å harmonisere tarmfloraen mellom de innkjøpte VT musene og de lokalt avlede NOX1KO- musene ble bunnstrø fra alle musene mikset. Siden mus vil spise hverandres avføring er dette en anerkjent metode for å overføre mikrobiota mellom mus. Forholdene i dyrestallen ble holdt kontrollert slik som temperaturer (24-25 °C), luftfuktighet (45-55%) og regulert lysstyring (12 timer lys / 12 timer mørke). Frem til forsøkets start ble musene fôret med standard lavfett chow pellets (RMI/SDS, Withham, UK) *ad libitum*. Ellers var burene utstyrt med drikkevann, løpehjul med hus, tyggepinne, bunnstrø og reirmateriale. Ved oppstart på høyfett (HF) og høyfett + favabønne (HF + FB) diett ble løpehjul fjernet. I tillegg til de eksperimentelle høyfettfôrene valgte vi å benytte en ekstra kontrollgruppe som fikk standard lavfett chow-fôr hele perioden.

Figur 1 viser forskningsdesignet. Det ble benyttet 48 mus, 24 VT og 22 NOX1KO mus. For å bestemme hvor mange mus som var nødvendige i hver forsøksgruppe for å oppnå statistisk styrke ble det utført en styrkeberegning (Poweranalyse). Vurdering av hvilken effektverdi som var nødvendig ble gjort med utgangspunkt i et tidligere forsøk hvor in vivo avbildning ble benyttet etter en intervensjon med vestlig diett (40% fett).

Selve utregningen ble gjort ved hjelp av en web-basert kalkulator hvor effekt verdi på 0,05 og en styrkeverdi (*power*) på 80% ble lagt inn. Antall dyr nødvendig for å oppnå statistisk styrke ble beregnet til 10-15 dyr per gruppe. Kontrollgruppen på 4 dyr er derfor for liten til å kunne gi statistisk styrke, men ble benyttet i enkelt eksperimenter (insulinresistens og LBP-eksperimentet) der det var naturlig å fremstille disse sammen med verdier målt hos de andre fire forsøksgruppene.

Metode og materialer



Figur 2.1. **Forsøksdesign.** Det ble benyttet 48 C57BL/6-hannmus i dette forsøket, henholdsvis 22 NOX1KO ($n = 11$ HF og $n=11$ HF+FB) og 22 VT ($n = 11$ HF og $n = 11$ HF+FB) og 4 VT på standard lavfett fôr /chow). Bildene til figuren er hentet fra smart servier medical art <https://smart.servier.com/>

2.2 Tillaging av musefôr

Til forsøket ble det tilberedt høfetttdiett med og uten Favabønner. Fettkildene var fra melk (fløtepulver) og grisespekk og inneholdt for begge fôrtypene 60% energi fra fett. Alle ingrediensene ble bestilt fra Altromin (Detmold, Tyskland). Ingrediensene til 1 kg pellets kan ses i tabell 1. Siden favabønnene inneholder mye proteiner og stivelse, ble de tilsatte ingredienser fra Altromin justert i henhold til det slik at innholdet i begge fôrtypen var identiske for alle makro og mikro næringsstoffer med unntak av ukjent bidrag fra favabønnene. På grunn av mangel på norske data om belgvekstkonsument er andel Favabønner tilsatt høfetttdietten basert på belgvekstkonsument estimert i den kanadiske befolkningen (Mudryj et al. 2012).

Favabønnene (Columbo) ble dyrket på Vollebakk i ÅS, Norge. Favabønnene ble omgjort til pulver. Først ble de tørkede bønnene bløtlagt over natten og deretter kokt møre i destillert vann i ~40 minutter. Etter koking ble bønnene avkjølt, homogenisert til en jevn masse, fryst til -80 °C og til slutt frysetørket til pulver. Etter frysetørkingen ble pulveret siktet slik at mesteparten av det ytterste skallet på favabønnene ble fjernet. Pulveret ble oppbevart i tette bokser, mørkt og ved romtemperatur frem til det skulle brukes. Metoden som ble fulgt var adoptert fra studie hvor kikerter ble benyttet (Monk, Jennifer M. et al. 2017).

Til frysetørkingen ble det benyttet en frysetørkemaskin (Heto DW 85 DryWinner, Heto-Holten, Allerød, Danmark). Under følgende forhold; vakuumtrykk på ~0,1 ved -40°C. Glasskolber ble fylt ca. 1/3 fulle.

Metode og materialer

Favabønnemassen tørket til pulver i løpet av to til tre dager. Næringsinnholdet i favabønnepulveret ble analysert av Institutt for husdyr og akvakulturvitenskap ved NMBU (vedlegg 1).

Musefôret (pellets) ble laget først ved å blande alle de tørre ingrediensene i en bolle. Deretter ble fett fra gris (lard) tilsatt og arbeidet godt inn i massen til den hadde en smuldrete konsistens. Destillert vann ble gradvis tilsatt slik at massen samlet seg til en formbar masse. Toppen av 20mL sprøyter ble kuttet av og fylt med masse, som så ble stappet godt inn i sprøyten og presset ut til en pølse. Pølsen ble delt i mindre biter, pakket i poser og forseilet. Posene ble fyst ved -80°C. Pellets ble frysetørket som vist i figur 2.2, og oppbevart ved -20 °C frem til bruk.

Tabell 2.1. Musefôr (pellets). Ingredienser til ca.1 kg ferdig HF og HF+FB pellets. Alle ingredienser bortsett fra favabønnene ble bestilt fra Altromin. Mengdene av hver ingrediens vises som vekt i gram, utregnede verdier for energi som (kcal) og prosentandel (% kcal) i 100 gram av dietten, Totalvekt (g) og energi per kg er også vist. Analysebevis for Favabønner i vedlegg 1. Nedre del av tabellen viser prosentvis andel av makronæringsstoffer i de to diettene som vekt og kcal.

Ingredienser		Høyfettdiett+Favabønner			Høyfettdiett		
		Vekt (g)	kcal	% kcal	Vekt (g)	kcal	% kcal
Protein	Kasein	23	92	1,76	35	140	2,63
	Kollagen	77	308	5,88	120	480	9,03
Karbohydrat	Stivelse	60,8			125	500	9,4
	Sukrose	90	360	6,87	90	360	6,77
	Cellulose, BW200	0	0	0	34	0	0
Fløtepulver (FP)		300			300		
	FP fett	126	1134	21,64	126	1134	21,32
	FP protein	60	180	3,44	60	240	4,51
	FP monosakkarid	101,1	404,4	7,72	101,1	404,4	7,6
Fett	Lard (spekk)	215	1935	36,93	220	1980	37,23
Mineraler	Mineral Mix	35		0	35		0
Vitaminer	Vitamin mix	20	80	1,53	20	80	1,5
Favabønne-pulver (FB)		200			-	-	-
	FB stivelse	64,2	256,8	4,9	-	-	-
	FB protein	68	272	5,19	-	-	-
	FB fiber	32	64	1,22	-	-	-
	FB andre karbohydrater; mono-, di-, poly-)	33,8	135,2	2,58	-	-	-
	FB fett	2	18	0,34	-	-	-
Sum		1 008	5 239	100	966	5 318	100
Energi (kcal)/kg musefôr			5 198			5 505	

Sum makronæringsstoffer:	Høyfett+Favabønner			Høyfett		
	Vekt (%)		Kcal (%)	Vekt (%)		Kcal (%)
Protein	22,6		16,3	22,3		16,2

Metode og materialer

Karbohydrater (fordøyelige)	37,9		23,3	36		23,4
Fett	34		58,9	35,8		58,6
Fiber	3,5		0	3,2		1,2



Figur 2.2. **Frysetørkemaskin.** Glasskolbene med pellet ble festet til maskinen og frysetørket ved hjelp av nedkjølt luft (-40°C) tilført via ståltuten i lokket.

2.3 Vekt og fôr-registrering

Under forsøket ble alle musene veid ukentlig. Registrering av vekt ble utført for å følge med på vektutvikling underveis i forsøket. Alle musene bortsett fra kontrolldyrene ble veid ukentlig. Siste veiing ble utført på termineringsdagen. Hver uke ble det fylt på fôr slik at musene hadde ~ 100 g tilgjengelig. Fôr-inntak ble registrert ved å veie restmengde i fôrbeholder i hvert enkelt bur.

2.4 In vivo avbildning

Vi var interessert i å avdekke om produksjon av ROS fra tarmregionen ble påvirket av genotype og fôr. For å avgjøre dette ble det utført *in vivo* avbildning av musene, som er en ikke-invasiv avbildningsmetode. L-012 reagerer med ulike typer ROS og avgir lys (bioluminescens) i denne reaksjonen. Injisert L-012 fordeler seg til alle kroppens celler og vil avgi lys med intensitet som er proporsjonal med mengde ROS som produseres i de ulike regionene i musene. Kielland et al har tidligere vist høy ROS-produksjon i tarm, nærmere bestemt ileum (Kielland, A. et al. 2009). Det avgitte lyset er meget svakt og vi må derfor bruke et svært følsomt kamera kombinert med en lang eksponeringstid. I

Metode og materialer

tillegg må musene være immobilisert ved hjelp av anestesi mens lyset som emitteres fra musene fangers opp av kamera. 1-2 dager i forkant av avbildningen ble musene barbert på magen. Barberingen ble gjennomført under anestesi med isofluran (2-2,5%).

På avbildningsdagen ble musene igjen bedøvet med isofluran (2,5%) før de ble injisert intraperitonealt med L-012 (10 mg/kg mus). To minutter etter injeksjon ble dyrene overført til et lystett kammer knyttet til kameraet og avbildet. In vivo- avbildning ble utført ved bruk av avbildningsinstrumentet IVIS Lumina II. Eksponeringstiden var 5 minutter. I avbildningskammeret ble dyrene holdt immobilisert med isofluran tilkoblet kammeret under hele eksponeringstiden. Lysintensiteten fra ventral side av musene ble analysert med programvaren Living Image, og uttrykt som fotoner/s/cm²/steradian. Forsøket ble gjennomført fire ganger i løpet av de første 9 ukene; tid 0 (baseline), 6 t, 24 t, 96 t og 9 uker etter endring av diett fra standard chow (RM1, SDS) til dietter av 60% høyfett og 60% høyfett + Favabønner. Til denne oppgaven er bilder tatt etter ti uker benyttet i resultatdelen. En representativ mus fra hver av de fire eksperimentelle gruppene ble valgt for å illustrere resultatene fra in vivo avbildningen. Utvelgelsen ble gjort ved å regne gjennomsnittet av bioluminescensen ved ti uker og velge den musen som lå nærmest gjennomsnittet.

2.4.1 Tillaging av L- 012 probe

L- 012 er en ROS-spesifikk probe som reagerer med ulike typer ROS og emitterer lys med maks emisjon ved 460nm (Zielonka et al. 2013). L-012 proben ble laget i forkant av forsøket og lagret ved -20°C. Et pulver av L- 012 probe (8-Amino-5-chloro-7-phenylpyrido [3,4-d] pyridazine-1,4-(2H,3H) dione Sodium Salt) fra Wako Pure Chemical Industries ble bragt til romtemperaturløst. 40mL destillert vann ble overført til et 50mL rør, litt av vannet i 50mL røret ble pipettert over i boksen med pulver og blandet godt. For å oppnå en homogen løsning ble blandingen mikset med pipetten og boksen ristet. I denne prosessen var det viktig å påse at blandingen var beskyttet mot lys siden L-012 er ustabil ved lyseksponeringer. 50mL røret med resten av væsken ble pakket i aluminiumsfolie og tilsatt 350mg NaCl. Den homogene løsningen av L-012 proben ble så blandet inn. Blandingene ble mikset godt og helt over i en folie-beskyttet kolbe og filtrert ved bruk av en 50mL sprøyte med 0.22µm filter. Filtratet ble overført til lys-beskyttede (sorte) 1250µl eppendorf rør og lagret ved -20°C.

2.5 Insulinresistens målt ved HOMA-IR indeks

Insulinresistens er en metabolsk forstyrrelse og oppstår vanligvis som en følge av lite fysisk aktivitet, høyt kaloriinntak og fedme. Insulinresistens oppstår når effekten insulinet har med å frakte glukose over i vevene svekkes. Dette fører til at glukose oppholder seg lenger i blodbanen og som respons skilles mer insulin ut. Homeostatic model assesement for Insulin resistance (HOMA -IR) er en metode for å estimere insulinresistens ved å benytte verdier for blodglukose og insulin hos fastende individer (Wallace et al. 2004).

Til utregning benyttes tall for glukose og insulin oppgitt i mmol/L og mU/L. Disse tallene multipliseres med hverandre og divideres på en konstant basert på friske individer. Hos mennesker er denne konstanten 22,5. En forskergruppe estimerte denne konstanten til 14,1 for friske mus (van Dijk, T. H. et al. 2013), og det er denne som vil bli benyttet i denne oppgaven.

Metode og materialer

Blodglukose mmol/L x Plasma insulin mU/L

14,1

HOMA modellen er å foretrekke da metoden er mindre belastende for musene. Da metoden gjøres på fastende mus uteligger sondefôring, og det er kun nødvendig med et blodprøveuttak med mindre mengder blod til analyse enn for eksempel standard blodglukose test (OGTT).

2.6.1 Blodprøvetagning fra leggvænen

Hår over leggvænen (*vena saphena*) ble fjernet en dag i forkant av forsøket for å unngå å påføre musene unødvendig stress prøvetakningsdagen. Stress kan påvirke resultatene av blodsukker og insulin ved at musene skiller ut adrenalin. Etter 5 timer faste ble musene stukket i leggvænen med en 23G kanyle. En bloddråpe ble påført en teststrimmel festet til en ACCU-CHEK blodglukosemåler og glukosenivå lest av direkte. Fra samme stikkåpning ble 50-100µl blod samlet i rør som inneholdt EDTA som antikoagulant. Blodprøvene ble oppbevart på is frem til plasmaoppbehandling ved sentrifugering (20 min, 4°C, 2,000 g). Plasma ble pipettert ut og frosset ned til -80°C til det skulle benyttes til insulinmåling.

2.6. Måling av insulin med ELISA

ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) er en sensitiv metode som benyttes ved kvantifisering av spesifikke proteiner i en prøve. Det finnes flere typer ELISA (direkte, indirekte, sandwich og kompetitiv). Det ble her benyttet et Ultra sensitiv mouse insulin ELISA fra Chrystal Chem som er en sandwich ELISA. Prinsippet i alle varianter av ELISA er at man utnytter de spesifikke bindeegenskapene til antistoffer og detekterer mengden bundet protein ved bruk av enzymer som katalyserer en fargereaksjon. Proteinet som ble detektert i våre prøver vil være insulin.

Protokollen fra produsenten for plasma og wide range assay ble fulgt (Tabell 2.2). Wide range ble valgt for å sikre at alle prøvene var innenfor sensitivitet området. Kittet ble bragt til romtemperatur og reagensene preparert. Til standard kurven ble tørket muse-insulin standard blandet med 100µl destillert vann slik at blandingen inneholdt 25,6ng/ml muse-insulin. Standard kurven ble laget ved først å tilføre 50µl muse-insulinblanding og 50µl prøvefortynner til 1 rør merket 12,8ng/mL. 8 nye rør ble merket 0,1, 0,2, 0,4 0,8, 3,2 ,6,4 og 0ng/mL. Rørene ble tilført 50µl prøvefortynner. 50µl fra røret merket 12,8ng/mL ble overført til rør merket 6,4ng/mL. Prosedyren gjentas frem til rør merket 0,1ng/mL. Det var viktig å påse at innholdet i rørene ble godt blandet gjennom hele fortynningsrekken. Rør merket 0ng/mL skulle kun inneholde prøvefortynner. For tillaging av blanding til enzymreaksjon ble 3,6mL anti-insulin enzym konjugat blandet med 1,8mL Enzym konjugat fortynter. Vaskebuffer ble laget ved å blande flasken med 50mL vaskebufferkonsentrat med destillert vann til 1 liter totalvolum. De andre reagensene, enzym substrat blanding, enzym reaksjon stop blanding og prøvefortynner var ferdig til bruk fra produsenten.

Tabell 2.2. **Standard kurve for wide range assay** (0,1 – 12,8ng/mL)

	Mouse Insulin concentration (ng/mL)								
	12.8	6.4	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	0.1	0
MISS*(µL)	50								
SD**(µL)	50	50	50	50	50	50	50	50	50
		50	50	50	50	50	50	50	
Total (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	50

MISS* : Mouse Insulin Stock Solution (25.6 ng/mL)

SD** : Sample Diluent

Metode og materialer

For å få plass til alle prøvene ble det benyttet 2 mikroplater. Disse ble analysert på ulike dager. Mikroplatene ble pakket ut rett før bruk for å unngå kontaminering. 95µl prøvefortynner ble tilført brønnene. 5µl av plasmaprøvene og standard kurven ble tilført brønnene i duplikater. Brønnene var på forhånd dekket med en anti-insulin antistoff fra marsvin som binder til insulinet i prøvene fra musene. Platen ble dekket til og inkubert i 2 timer ved 4°C. Innholdet i brønnene ble tømt ut og vasket med 300µl vaskebuffer 5x. Mellom hver vask ble innholdet tømt og forsiktig klappet mot et rent papir. Brønnene tilføres 100µl horse radish peroxidase (POD) konjugert anti-insulin antistoff, stoffet binder til marsvin antistoff-museinsulin komplekset i bunnen av brønnene. Etter 30 minutter inkubasjon i romtemperatur ble overskudd av POD konjugatet vasket vekk som beskrevet over men med flere vasketrinn (7x). Enzymreaksjonen ble satt i gang ved å tilsette 100µl enzym substrat blanding. Enzym substrat blandingen inneholder 3,3',5',5''-tetramethylbenzidine (TMB) og POD konjugatet som er bundet til brønnene blir detektert av dette. Mikroplaten ble dekket til med aluminiumsfolie (beskyttes mot lys) og inkubert i 40 minutter. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å tilsette 100µl enzym-reaksjon stopblanding til hver av brønnene. Absorbansen ble lest av innen 30 minutter ved hjelp av en mikroplate avleser (*Spektramax*) ved 450 og 630nm hvor verdiene målt ved 630nm ble trukket fra 450nm verdiene.

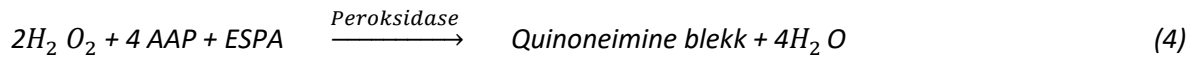
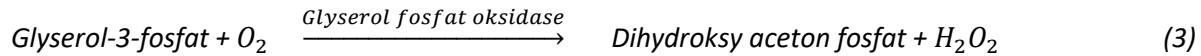
2.7 Kvantifisering av triglyserider i lever

Som et mål på hvor mye fett som var akkumulert i levervevet etter 14 uker høyfett diett benyttet vi et kit for kvantifisering av triglyserider (*TAG Assay kit fra Caymans*).

Etter terminering av musene ble prøver fra samme leverlapp høstet. Leverprøvene ble lagt i eppendorfrør med skrulokk og frosset i flytende nitrogen. Prøvene ble videre oppbevart ved -80°C. Før analyse ble levervevet tint skånsomt på is. Vevet ble veid ~250mg og tilsatt 2ml NP40 fortynner og homogenisert ved hjelp av Ultraturax (*Yellow line DI 18 basic*) i 10-15 sekunder ved hastighet 3. Prøvene ble sentrifugert (*Beckman modell J2- MC sentrifuge*) ved 10.000G /8520 rpm i 10 minutter ved 4°C. Supernatant ble overført til nye rør og fortynnet 3x med NP40 fortynner.

Prøvene ble oppbevart på is gjennom hele prøveopparbeidelsen. Reagenser til standard kurve ble bragt til romtemperatur før tillaging. Standard kurven ble laget med triglyserid standard fortynnet med NP40. 8 rør ble merket A – H. Rør A ble tilsatt 400µl NP40 og rør B – H 200µl NP40. 100µl triglyserid standard ble tilsatt rør A og blandet godt før 200µl overføres til rør B, blandes godt og prosessen repeteres til og med rør G. Rør H er blank med kun NP40 fortynner. Fortynningsrekken fikk en nedadgående konsentrasjon på 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 og 0mg/dl. 10µl fra standard kurve og prøvene ble tilsatt brønnene i duplikater. For å igangsette reaksjonen ble 150µl enzymblanding tilført hver av brønnene og inkubert i 15 minutter. Enzym blandingen ble laget i forveien ved først å lage en natrium-fosfat buffer (Na-PBS) av 4mL tørket natrium fosfat og 16mL milliQ-vann (250mM). Deretter ble flasken med TAG-enzym blandet med 1mL milliQ-vann og 14mL natrium fosfat buffer. Enzymblandingen var lysømføls og aluminiumsfolie ble benyttet for å beskytte. Etter inkubering ble absorbansen på platen avlest ved 530-550nm (*SpectraMax M2*). Figur 2.3 viser prinsippet i enzymreaksjonen og som til slutt avgir farge.

Metode og materialer



Figur 2.3. Trinnene i reaksjonen (1,2,3,4) som oppstår når TAG- prøvene kommer i kontakt med enzymblandingen. Første reaksjon i assayet benytter enzymet lipoprotein lipase som hydrolyserer triglyseridene til frie fettsyrer og glyserol. Glyserolet som frigis måles videre via en parat enzymatisk reaksjon. Glyserolet blir fosforlyert til glyserol-3-fosfat ved hjelp av enzymet glyserol kinase. Glyserol-3-fosfat blir videre oksidert ved hjelp av glyserol fosfat oksidase som gir dihydroksyacetofosfat og hydrogenperoksid. Peroksidase katalyserer til slutt redox -reaksjonen Hydrogenperoksid (H_2O_2) og 4-aminoantipyrine (4- AAP) og N – Ethyl- N-(3-sulfopropyl)-m- anisidine (ESPA) som gir fargen Brilliant purple.

Etter platen var avlest ved hjelp av *SpectraMax M2 plateavleseren* ble [TAG] oppgitt som mg / dl. Vi var interessert i å finne [TAG] i mg / levervev (g). Kun verdier innenfor standard kurven ble benyttet.

Prøveopparbeidelse og utregning ble utført som følger:

Som eksempel benyttet en prøve som viste at 10 μ l leverhomogenat ble avlest til 34mg/ dL.

Som nevnt tidligere ble leverhomogenatet opparbeidet ved at 250mg levervev ble homogenisert i 2mL buffer (NP40). Totalvolum ble 2.25mL. Antall gram lever / dL blir da 0,25g / 0,0225dL = 11,1g /dL. Videre fortykning x 3 ga en konsentrasjon av levervev lik 0,25 g / (3 x 0,0225 dL) = 3,7 g/dL.

1dL inneholder 3,7g lever. Konsentrasjonen av TAG i 1 dl = 34mg.

Mengde TAG /g lever vil da bli 34mg / 3,7g lever = 9,2mg / g lever.

2.8 Lipopolysakkarid-bindende protein (LBP)

Funn av LBP i blod er en indikator på lekkasje av endotoksiner (LPS) fra tarmen. Lekkasje kan komme av dysbiose i tarmens mikrobiota.

Musene ble bedøvet IP med ZRF (10 μ l / gram mus) og blod ble tappet ved hjertepunktur (25G 0,5 x 16mm kanyle og 1mL sprøyte). Blodet ble overført til eppendorfrør og satt til koagulering i romtemperatur (30 – 40min.) før det ble sentrifugert (4 °C, 10min., 6000g). Serum ble overført til nye rør og frosset ned til – 80°C. Før bruk ble serum tint forsiktig på is.

For å detektere LBP i serum ble det benyttet et ELISA kit fra *Biometec*. Brønnene var på forhånd dekket med antistoff spesifikt mot antigenene i LBP hos mus. Serumprøvene og referanse serum ble fortyknet 1 x 800. 100 μ l av serumprøvene, standard kurven og referanseserum ble tilført brønnene og inkubert i en orbital shaker (romtemperatur, 1 t., 300 rpm). De antigenene som ikke ble bundet til antistoff samt andre urenheter ble deretter vasket vekk (vaskebuffer x 3). Brønnene ble deretter tilsatt 100 μ l POD-merket antistoff som fremhever LBP hos mus, brønnene ble inkubert og vasket som nevnt over. TMB-chromogen substratet sørger for at enzymet gir farge til brønnene. 100 μ l Substrat ble tilsatt brønnene og inkubert ved romtemperatur uten orbital shaker i 12 -14 min. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å tilsette 100 μ l stoppblanding til hver brønn. Absorpsjonen ble målt ved 450nm ved bruk av en mikroplate

Metode og materialer

avleser (*Spectramax*). Standard kurven ble regnet ut ved å plote absorpsjonen mot de korresponderende konsentrasjonene i kjent standard. De ukjente serum LBP prøvene ble bestemt ut fra standard kurven. Korrekt konsentrasjonen av LBP ble funnet ved å multiplisere med fortynningsfaktor (800).

2.9 Terminering

2.9.1 Anestesi

Musene ble veid for å registrere dyrenes vekt før terminering. Vekten ble også benyttet for å kalkulere rett mengde anestesi til dyret før hjertepunktur. Som anestesi ble det benyttet 10 µl/g mus ZRF som til sammen gir en bedøvende og smertestillende effekt god nok for kirurgiske inngrep. Anestesidose ble gitt Intraperioentalt (IP). ZRF er en cocktail av Zoletil forte Vet (Virbac, Carros, France), Rompun Vet (Bayer, Oslo, Norway) og Fentadon (Eurovet Animal Health, Bladel, The Netherlands), se tabell 2.3. Det oppsto problemer som forsinket virketid av anestesen for de tyngste musene. Vi antok det som en følge av at anestesen ble injisert i bukfettet, som følge fikk musene større doser ZRF.

Tabell 2.3. ZRF- cocktail til anestesi for injeksjon

Virkestoff	Mengde per mL steril isotonisk NaCl (0,9%)	Dose/kg kroppsvekt
Fentanyl	2,6 µg	26 µg
Tiletamine	3,2 mg	32 µg
Xylazine	0,45 mg	45 µg
Zolazepam	3,2 mg	32 µg

2.9.2 Blodprøvetaking og disseksjon av vev

Hjertepunktur ble utført etter at full effekt av anestesi var inntruffet. Umiddelbart etter blodtapping ble musene avlivet ved nakkestrekk. Blod ble ivaretatt som beskrevet under metode for LBP. Av indre organer ble kun lever benyttet i denne oppgaven og ble høstet og ivaretatt som beskrevet under metoder for kvantifisering av triglyserider i levervev.

2.10 Statistiske analyse

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av programvaren GraphPad Prism 9. Valg av statistisk modell ble vurdert for hver enkelt analyse og beskrives i figurtekst i resultatdelen. Alle analysene ble satt til 5 prosent signifikanskriterium (p – verdi $< 0,05$). At et resultat er statistisk signifikant betyr at det er lite sannsynlig at resultatet har oppstått tilfeldig. For å kunne utføre ANOVA må datasettet være normalfordelt og bestå av mer enn to grupper. For å undersøke om datasettet var normalfordelt ble Shapiro-Wilk normalitetstest for normal distribusjon benyttet. Der normalfordeling ikke ble møtt ble data Logaritmisk transformert. Resultatene fremstilles som gjennomsnitt og standard avvik fra gjennomsnittet (SEM), der hvor data er Logaritmisk transformert ble testene kjørt som geometrisk gjennomsnitt og geometrisk standard avvik (SD) (men presentert i resultatene med originaldata for bedre presentasjon). Det ble benyttet en, to og tre-veis ANOVA ved analyse ved henholdsvis to og tre

Metode og materialer

variabler. For statistisk hypotesetesting ved sammenlikninger av flere ble Tukeys multippel sammenlikningstest benyttet. For sammenlikning mellom to grupper med lik varians og hvor normalfordeling ikke var oppnådd, ble tosidig student T- test benyttet. Eller Mann-Whitney test på ikke parametriske data.

2.11 Etikk

Dyreforsøket ble godkjent av mattilsynet (FOTS ID 21627). Utførelsen av forsøket overholdt lovverkets etiske retningslinjer gitt av forskrift om dyr bruk av dyr i forsøk. Forskriften omfatter de 3Rene. Erstatning (*Replacement*); det ble vurdert om andre metoder enn dyreforsøk kunne gi de samme svarene og erstatte dyrene i forsøket. Reduksjon (*Reduction*); det ble utført styrkeberegning for at så få dyr som mulig skulle bli benyttet i forsøket uten at det påvirket resultatenes statistiske styrke. Forbedring (*Refinement*); de metodene som direkte ble påført dyrene i dette forsøket ble nøye planlagt og vurdert som de minst belastende av sitt slag.

3.0 Resultater

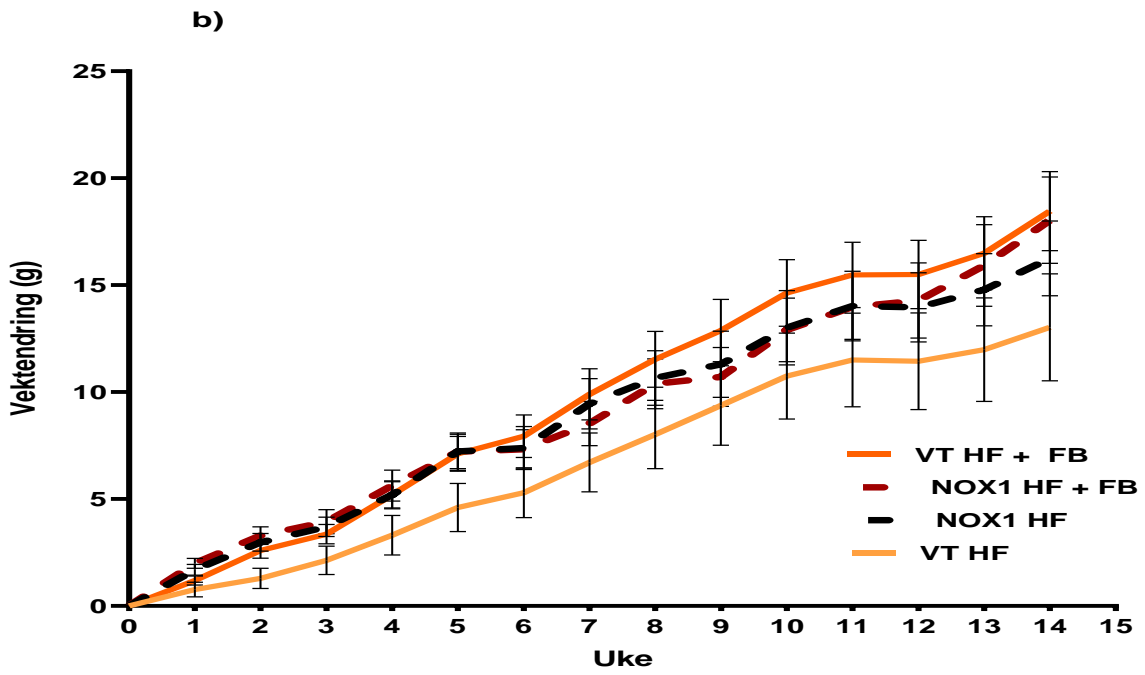
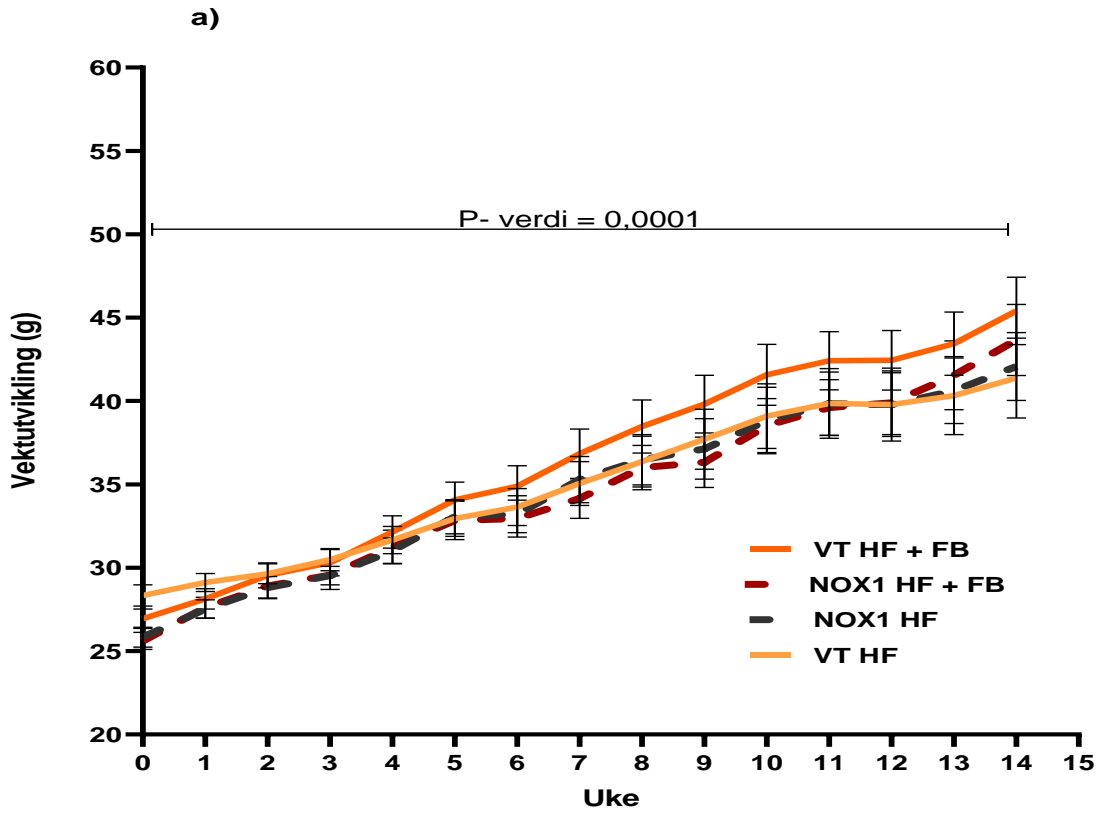
3.1 Sammenhengen mellom vekt og fôr-inntak

For å undersøke om fravær av NOX1 og om Favabønner spilte en rolle i vektutvikling når basisfôret var en høyfettdiet (60% Energi fra fett), ble forsøksdyrene veid jevnlig i løpet av forsøkets varighet (14 uker) og inntak av fôr registrert. Fôrene var designet slik at gruppene som fikk HF eller HF+FB hadde samme mengde av makro- og mikronæringsstoffer, men hadde ulik sammensetning av særlig karbohydrater, proteiner og kostfiber (tabell 2.1). For eksempel var proteininnholdet i gruppene som fikk rent HF-fôr protein av typen kasein, myse og kollagen, mens HF+FB i tillegg inneholdt proteiner fra favabønner (ca 20% av total mengde protein).

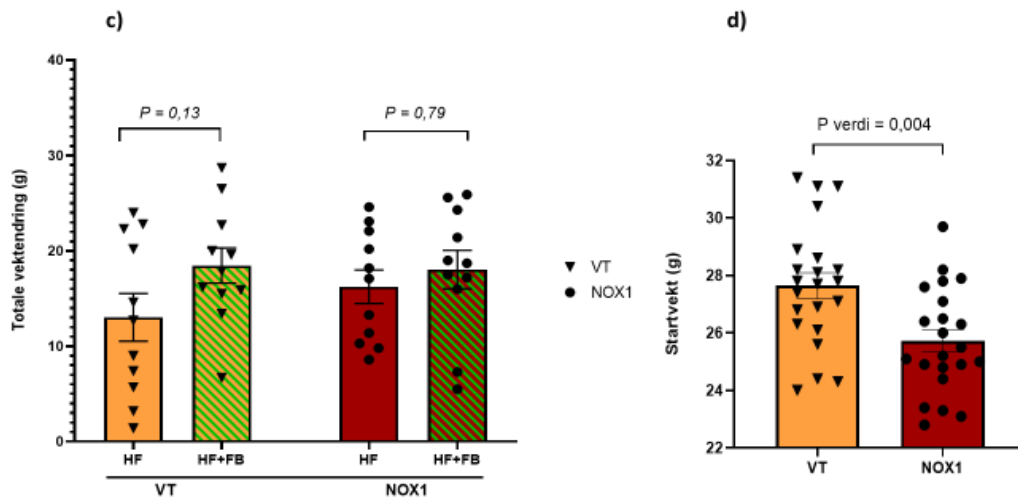
Hver enkelt mus i hver gruppe (VT HF, VT HF + FB, NOX1KO HF og NOX1KO HF + FB) ble først veid før oppstart og deretter hver uke frem til terminering i uke 14. Som forventet økte vekten i alle forsøksgruppene signifikant i løpet av forsøket. Utgangsvekten for musene lå mellom 25g og 28g og økte til mellom 40g og 44g i løpet av perioden (Fig. 3.1 a, $p = 0,0001$). Det kunne se ut som om det var en forskjell i startvekt mellom gruppene, og forskjellen syntes å være mest markert mellom VT HF og NOX1 HF. Det ble derfor utført en ikke- parametriske test (Mann-Whitney) mellom disse gruppene som viste en signifikant høyere startvekt i HF VT i forhold til NOX1 HF ($p = 0,004$). For å undersøke endringen i vekt fra startpunktet til sluttunktet ble den absolutte vektendringen (i gram) undersøkt (fig 3.1.b). Som vist i figuren var vektendringen minst i villtypemus som kun fikk HF-diet (VT HF) og størst i villtypemus på HF + favabønnedielt. Vektendringen hos NOX1 gruppene (NOX1 HF og NOX1 HF+ FB) lå mer likt plassert midt mellom VT gruppene. Selv om det ikke var signifikante forskjeller syntes det å være en svak trend til at de som fikk Favabønner i dietten la på seg litt mer enn de andre høyfettgruppene ($p = 0,08$).

Til tross for lik tilgang på fôr kunne det se ut som det var variasjoner i vektendring mellom musene. For å teste om denne variasjonen var signifikant forskjellig mellom gruppe ble det kjørt en to veis ANOVA. Det ble derimot ikke funnet noen interaksjon verken mellom diettene ($p = 0,20$) eller genotype ($p = 0,81$) (figur 3.1c).

Resultater



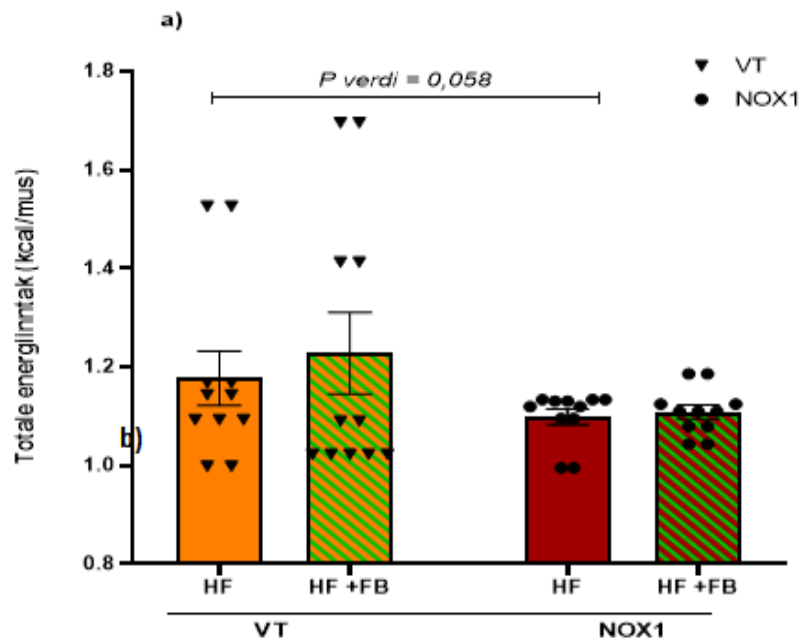
Resultater



Figur 3.1 **Vektutvikling og vektendring (g)**. Det ble sett på både vektutvikling (3.1a) og vektendring (3.1b) per gruppe samt totale vektendring per dyr i hver gruppe (3.1c). Gjennomsnitt og SEM ($n = 11$) ble regnet ut for alle gruppene (VT HF, NOX1 HF, VT HF + FB og NOX1 HF + FB). P-verdier ble kalkulert ved hjelp av treveis-ANOVA. Geisser greenhouse korrelasjon ble utført som post test For vektutvikling og vektendring og toveis ANOVA ved på vektendring per dyr i hver gruppe, og Mann Whitney test mellom startvekt for NOX1 og VT mus. Signifikanskriterium ble satt til $<0,5$.

For å undersøke hvor mye fôr som ble spist i hvert bur gjennom forsøket ble restmengde trukket fra den fôrmengden som ble gitt uken før. Fôr-inntaket ble registrert i 13 uker. Inntaket ble videre regnet om til totalt energiinntak per mus (kcal/mus) (figur 3.2 a). Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom gruppene, men det var en svak trend til ulikheter i energiinntaket mellom VT og NOX1KO mus ($p = 0,058$). For å undersøke hvor mye musene la på seg av den fôrmengden de fikk (energiomdannelse) ble vektendring (g) delt på det totale energiinntaket for hver av musene (figur 3.2 b). Jo høyere denne verdien er desto bedre er musene på å hente ut energi fra fôret. Enveis ANOVA viste at det ikke var noen signifikante forskjeller mellom gruppen når det kom til energiomdannelse ($p = 0,12$), men selv om det ikke var signifikante forskjeller så det ut til at VT HF gruppen var den som hadde lavest energiomdannelse. De hadde det høyeste fôr-inntaket og la på seg minst. Det kan også se ut som de som fikk Favabønner i fôret spiste litt mer enn de på ren høyfettdiett, og ut fra tall kalkulert for energiomdannelse var det en trend mot at NOX1KO mus på HF + FB diett gjorde seg litt bedre nytte av maten.

Resultater



b)

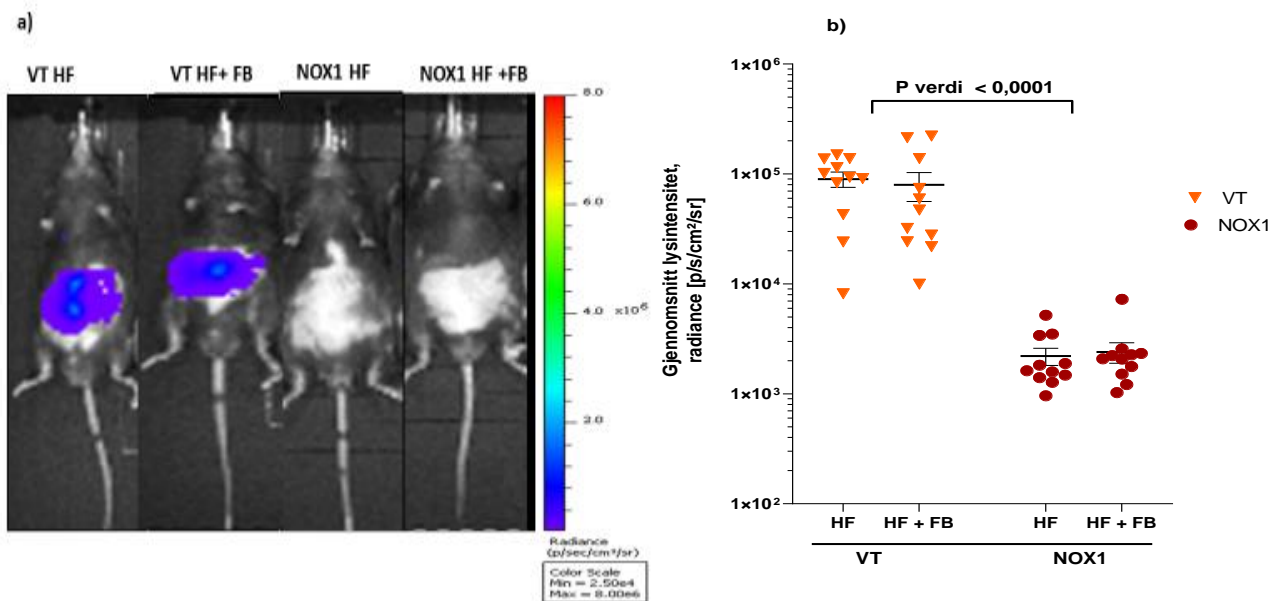
	Vektendring (g)	Totalt energiinntak (kcal)	Energiomdannelse (g / kcal)
VT HF	13,0	1,272	10,2
VT HF +FB	18,5	1,267	14,6
NOX1 HF	16,2	1,187	13,7
NOX1 HF +FB	18,0	1,131	15,9

Figur 3.2. **Fôr-inntak.** Totale fôr-inntak som kcal per mus (3.2a) og energiomdannelse (3.2b). P-verdier for totale energiinntak som kcal per mus ble utført ved hjelp av toveis ANOVA. Variasjonene innad i gruppene er uttrykt som SEM (n =11) og signifikans kriterium ble satt til 0,05. Energiomdannelse ble regnet ut fra vektendring og totale energiinntak som kcal per mus og presenteres som et gjennomsnitt i hver av de 4 gruppene. P-verdi for energiomdannelse ble kalkulert ved hjelp av enveis ANOVA.

3.2 NOX1KO har betydelig lavere ROS produksjon enn villtypemus og Favabønner påvirker ikke ROS-produksjon i tarm etter 9 uker

Siden NOX1 potensielt har en fysiologisk rolle i tarmbarrieren ved å produsere ROS var det viktig å undersøke om fravær av NOX1 faktisk førte til en nedgang i ROS. Dette ble undersøkt ved *in vivo* avbildning ved å benytte L-012. L-012 er en kjemiluminescerende probe som reagerer med ulike typer ROS og sender ut lys som følge av reaksjonen. Ved å sammenlikne NOX1KO mus med villtype mus får man bekreftet den ROS produserende rollen NOX1 har, som tidligere er observert å stamme fra tynntarm (ileum) (Kielland et al., 2009, Matziouridou, 2018). Figur 3.3a og b viser at det ble detektert mye svakere lysignal fra NOX1KO mus. Forskjellen mellom VT og NOX1KO mus ble funnet signifikant forskjellig ($p < 0,0001$).

Det er tidligere funnet at mus fôret med høyfett diett tilsatt proteinfraksjon og eller fiber fra Favabønner ga svakere signal ved *in vivo* avbildning i villtype mus kort tid etter introduksjon av Favabønner i fôret. Dette skyldes trolig Favabønners innhold av fytokjemikalier med antioksidantegenskaper som direkte reagerer med ROS og dermed fører til svakere L-012 mediert lysproduksjon. Etter 9 ukers fôring med Favabønner ble ikke dette observert. Det ble funnet at lysintensitet varierte en del mellom VT musene og det er tendenser til at VT FB gruppen har flere lave målinger enn VT HF, men det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom de to diettene ($p = 0,83$)



Figur 3.3. *In vivo* avbildning etter 9 uker på diett. IP injeksjon med L-012 probe synliggjør ROS signalet i ileum hos villtypemus som vist i figur 3.5a. Lysintensiteten uttrykkes som fotoner/sec/cm²/sr. Fargeskalaen ble kalibrert til min = 2,50e4 og max = 8,00e6. Figur 3.5b viser variasjon innad gruppene uttrykt ved SEM (n = 11). P-verdi ble regnet ut ved toveis ANOVA og sidak sammenligningstest mellom diettene i hver gruppe. Signifikanskriterium < 0,05.

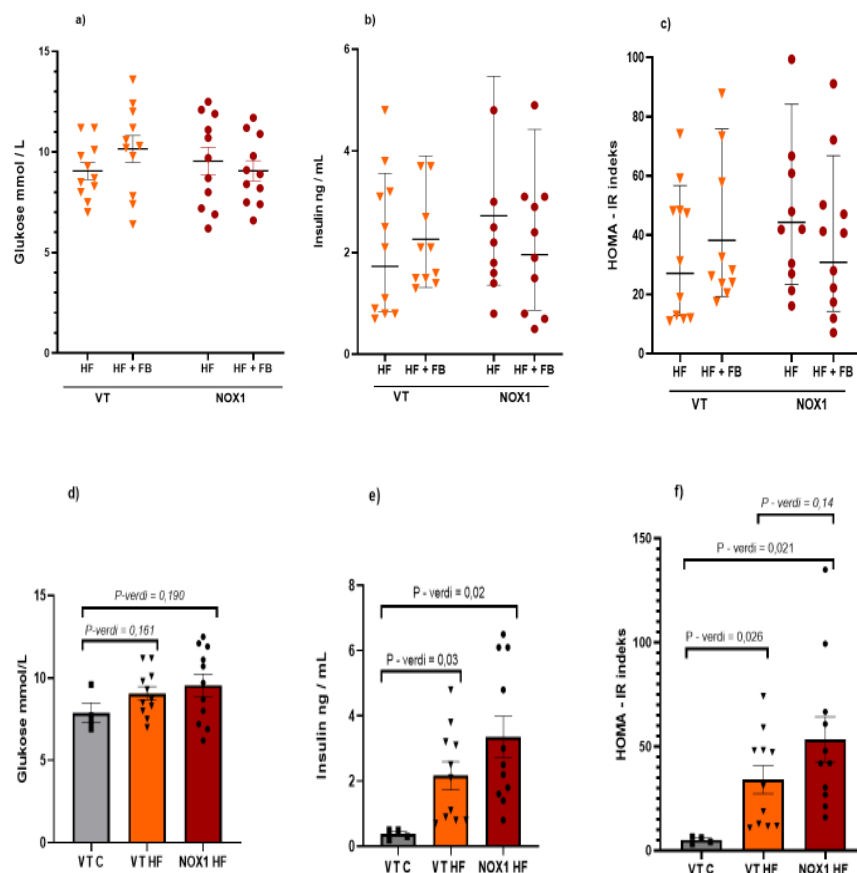
3.3 Insulinresistens ble funnet hos alle mus på høfett diett, men ingen effekt av Favabønner eller NOX1 ble observert

Siden alle de eksperimentelle gruppene hadde en betydelig vektøkt etter 10 ukers fôring ble det testet om dette førte til utslag på indikator for prediabetes, i første rekke insulinresistens. For dette formålet ble det tatt blodprøver fra leggvenen etter en fasteperiode på 5 timer. For å vurdere grad av insulinresistens ble HOMA-indeks benyttet. HOMA-indeks regnes ut ved å multiplisere glukosekonsentrasjonen (mM) med insulinkonsentrasjon (mU/L) og dividert med en faktor som er relevant for mus (14.1) (Van Dijk, T. et al. 2013).

Blodglukosen ble målt direkte ved å påføre den første bloddråpen på en strips som deretter ble avlest ved hjelp av en *Accucheck*-måler. Deretter ble ~50 µl blod samlet for videre prosessering og isolering av plasma for å måle insulin med et Insulin ELISA-kit. Som vist i figur 3.6 a og b ble det funnet mindre variasjoner mellom dyrene for blodglukose enn hva som ble funnet for insulinmålingene. Originaldata for insulinverdier oppnådde ikke normalfordeling og ble logaritmisk transformert før statistisk analyse (toveis ANOVA). Det ble ikke funnet noen statistisk forskjell mellom de 4 diettgruppene (VT HF, VT HF + FB, NOX1 HF og NOX1 HF + FB) verken for blodglukose, plasma insulin eller kalkulert HOMA-IR indeks.

Siden det ikke ble funnet noen forskjell mellom diettgruppene ble det vanskelig å si noe om grad av insulinresistens. Toveis ANOVA avdekket ingen interaksjon mellom diettene og det ble derfor valgt å sammenligne VT HF og NOX1 HF gruppene med en gruppe villtypemus som var blitt fôret på en standard lavkalori chow-diett (VT C; figur 3.6 d, e og f). De fastende glukoseverdiene var ikke forskjellig mellom VT C og de andre høfettgruppene, men plasma insulinivåene var signifikant lavere i VTC, noe som gav et signifikant utslag på HOMA-IR indeksen. Det ser derfor ut som musene på høfett diett ble mer insulinresistente enn VT C-mus. Selv om det ikke ble funnet signifikante forskjeller i HOMA-IR indeks mellom de ulike høfettfôrede musene, er det antydning til en trend med høyere HOMA-IR indeks verdier i NOX1KO mus enn i VT mus ($p = 0,144$), som kan antyde at NOX1KO-mus er mer utsatt enn VT mus for insulinresistens (figur 3.6 f). Denne trenden ble mer klar ved ekskludering av den høyeste verdien i NOX1 HF gruppen ($p = 0,28$).

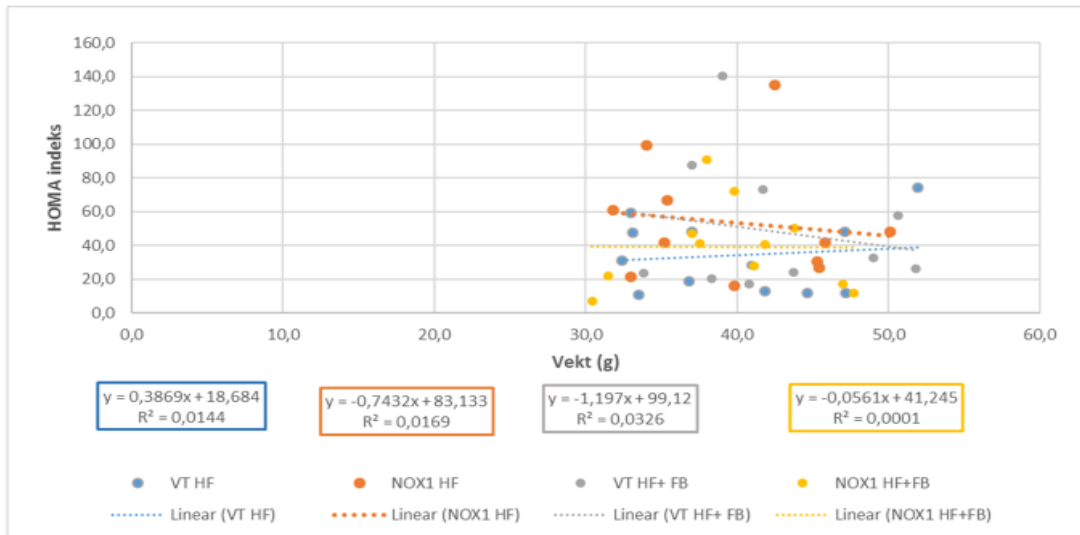
Resultater



Figur 3.6. Glukose og insulinverdier og HOMA-IR indeks. Blodglukose (mmol/L) **3.6a**, plasma insulin (ng/mL) **3.6b** og HOMA-IR indeks **3.6c** målt etter 10 uker på diett. Variasjonen innad gruppene for blodglukose er uttrykt ved gjennomsnitt og SEM ($n = 11$) variasjoner innad gruppene for plasma insulin og HOMA-IR indeks er uttrykt som geometrisk gjennomsnitt og geometrisk SD for log- transformerte verdier av insulin og HOMA-IR indeks ($n = 11$). Det ble valgt å presentere originaldata og ikke logaritmsk transformerte data for bedre å representere sanne verdier for plasma insulin og HOMA indeks. P-verdi ble regnet ut mellom de 4 gruppene ved To-veis ANOVA. P-verdi $< 0,05$ ble benyttet som signifikanskriterium. Tukeys multiplert sammenligningstest ble benyttet som post-test. Verdiene sammenliknes med en VT chow gruppe for å vurdere grad av insulinresistens (**3.6 d, e og f**). Variasjonene innad gruppene er uttrykt som SEM ($n = 4$ og 11), student t-test ble benyttet som statistisk analyse med signifikanskriterium på $0,05$.

Det er etablert kunnskap at inaktivitet og høychaloridiett fremmer insulinresistens. Høy vekt er også en kjent faktor. Det ble derfor undersøkt om insulinresistens (høy HOMA indeks) rammet de tyngste musene mer enn de som veide mindre. Figur 3.7 viser at HOMA indeks verdiene var helt tilfeldig fordelt mellom mus med høy, mindre høy eller normal vekt. HOMA indeks verdiene så derfor ikke ut til å være avhengig av vekt i dette eksperimentet.

Resultater



Figur 3.7. **HOMA-indeks og vekt** Verdier for HOMA indeks og vekt (g) etter 10 uker på HF og HF + FB. Korrelasjon regnet ut i excel.

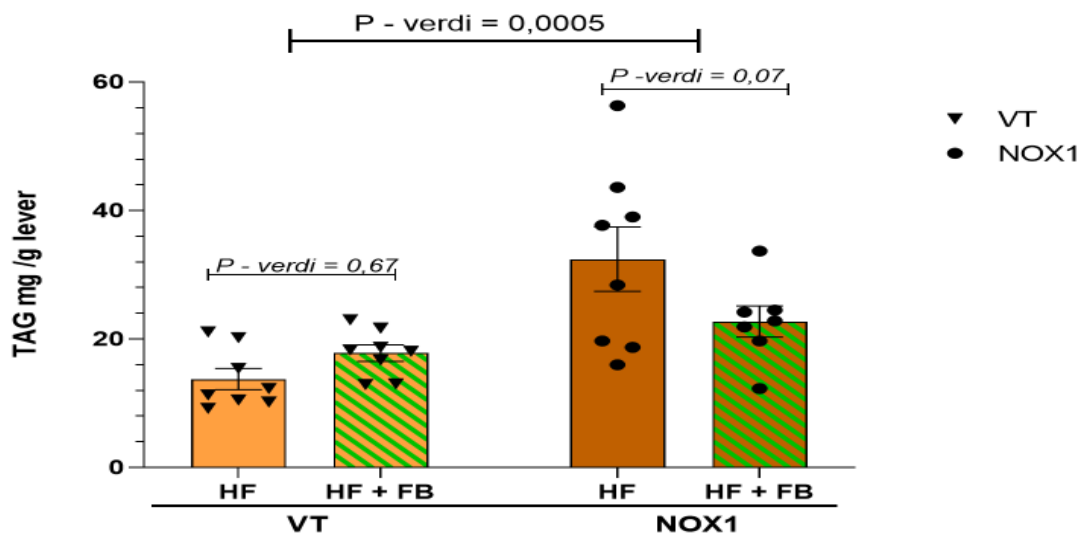
3.4 Villtype mus så ut til å være bedre beskyttet mot akkumulering av TAG i levervev enn NOX1KO mus

Ved høyfettdietter og utvikling av fedme er fettlever funnet som en av følgene (Parker 2018). Fettlagring i ektopisk vev er indikator for inflammasjon. For å anslå hvor mye fett som var akkumulert i lever etter 14 uker på diett, ble nivåene av triacylglycerol (TAG) i levervev kvantifisert ved hjelp av kolorimetrisk analyse av glyserol etter en forutgående lipase-behandling av prøvene (se metode 2.7).

Til dette eksperimentet ble noen prøver fra hver gruppe ekskludert fra analysen grunnet for høye verdier i forhold til standardkurven og som dermed skapte usikkerheter i tolkningen av resultatet. Dette bidro til at det ble brukt noen færre prøver fra hver gruppe. Fra gruppene VT HF, NOX1KO HF, VT HF +FB og NOX1KO HF + FB ble prøver fra henholdsvis 8, 8, 8 og 7 mus benyttet.

Det ble funnet at NOX1KO mus hadde signifikant høyere TAG nivå i lever enn VT mus ($p = 0,0005$). NOX1KO mus viste større spredning innad gruppen med flest høye verdier og fikk dermed et høyere gjennomsnitt enn VT mus. Det ble funnet en interaksjonseffekt med diett når toveis ANOVA test ble utført. Bonferroni multippel sammenligningstest viste derimot ingen signifikante forskjeller mellom HF og HF+FB for hverken NOX1KO mus ($p = 0,07$) eller VT mus ($p = 0,67$). Det synes også å være en svak trend til forskjell mellom diettene i NOX1KO gruppen. Men da det ble testet ved å utelate den høyeste verdien viste toveis ANOVA ingen interaksjon og Bonferroni-testen viste en p verdi = 0,20.

Resultater



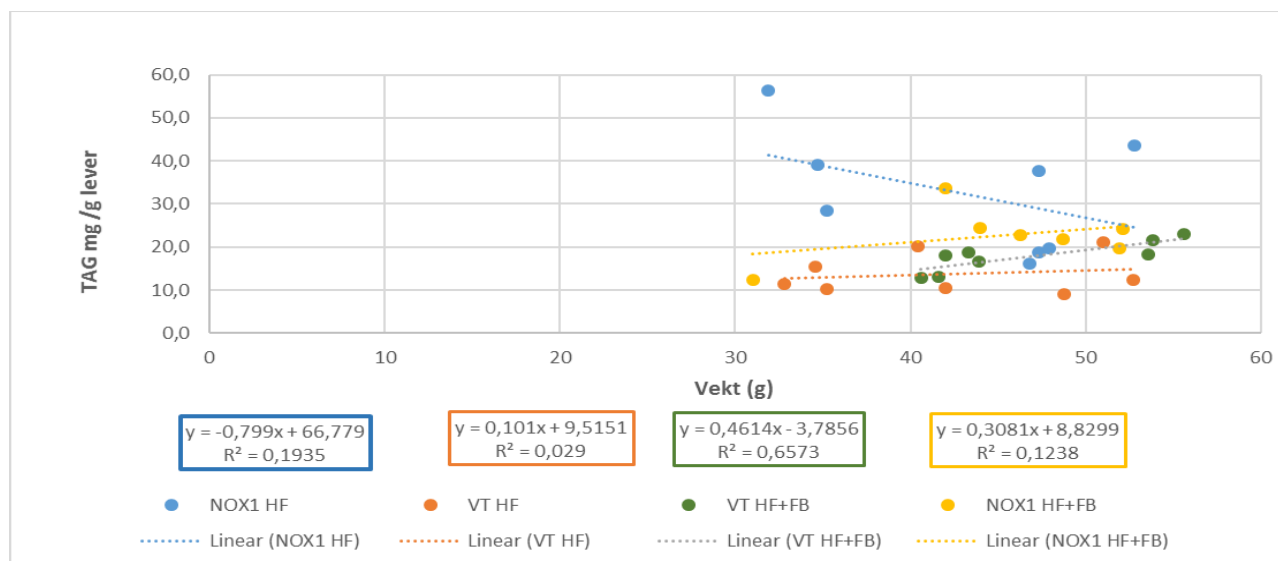
Figur 3.8. **Kvantifisering av triglyserid i levervev.** Grafen viser andel TAG i mg per gram levervev for hver av de 4 gruppene (VT HF, NOX1 HF VT HF +FB, NOX1 HF + FB). Variasjon innad gruppene er uttrykt ved SEM ($n = 8, 8, 8, 7$). P -verdi ble regnet ut ved To-veis ANOVA med Bonferroni multiplert sammenligning som post test. P -verdi $< 0,05$ ble benyttet som signifikanskriterium.

Ved terminering ble det observert at musene hadde ulikt utseende på levervevet (figur 3.9). Da dette ble undersøkt nærmere viste det seg at mus med lavere kroppsvekt hadde en friskere rødbrun farge på levervevet enn de med høy kroppsvekt. Det ble derfor spekulert i om det også var de mest overvektige musene med det blekeste levervevet som også hadde det høyeste TAG nivået. Resultatet vist i figur 3.10 viser korrelasjon mellom TAG og vekt i VT HF + FB gruppen ($R^2 = 0,6573$), men ikke for de andre gruppene. Store variasjoner uavhengig av vekt viser at det ikke kan trekkes noen konklusjon om at høy vekt også gir høye TAG i levervevet.



Figur 3.9. **Illustrasjon av levervev.** 2 mus fra gruppen WT HF + FB diett. Vekt ved terminering var 40,6(bilde1) og 55,6 g (bilde 2). Musene er fra samme bur. Man ser en tydelig forskjell i farge på levervevet.

Resultater



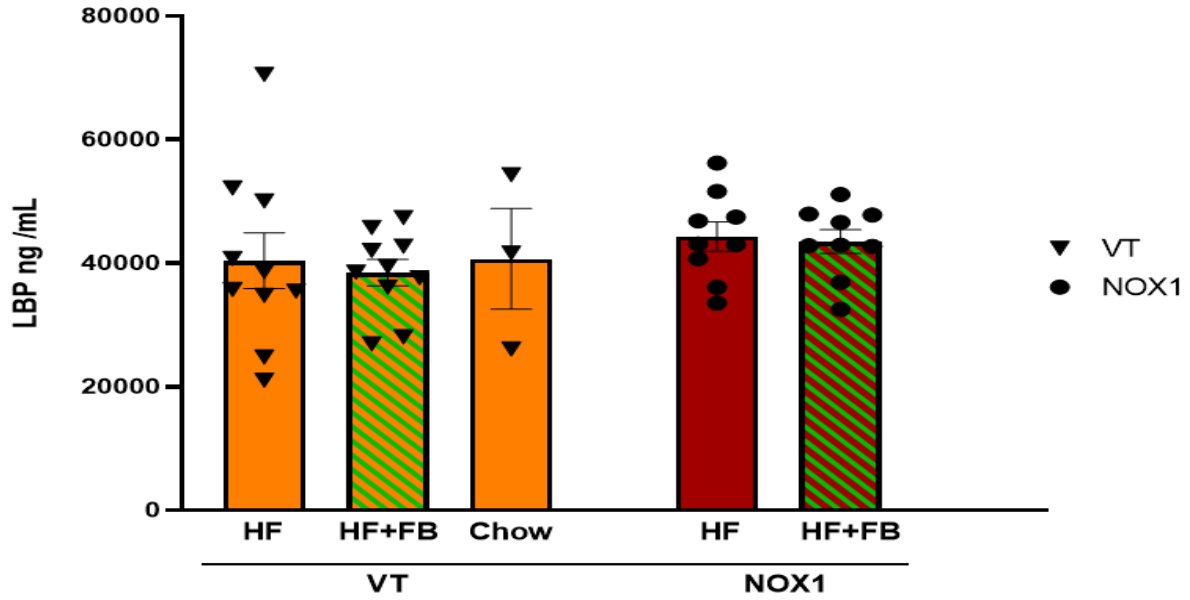
Figur 3.10. Sammenhengen mellom musenes vekt og mengde TAG (mg/g) i levervev. Korrelasjons regnet ut i excel

3.5 Det ble funnet høye verdier av LBP i serum hos alle forsøksdyrene, men ingen forskjeller ble observert mellom gruppene.

Høyfett dietter er funnet å fremme en tarmmikrobiota som består av større mengder gram-negative bakterier. De gram-negative bakteriene produserer endotoksiner i form av LPS. Dette gir økt grad av inflammasjon i tarmvevet, brist i barrierefunksjon og systemisk inflammasjon i perifere vev ved spredning via sirkulasjonen. LPS kan måles indirekte via LBP i både serum og plasma. Vi ønsket å undersøke om fravær av NOX1 og om tilsetning av Favabønner ville ha noen betydning for LBP nivå i serum som igjen potensielt har betydning for utvikling av insulinresistens.

Det ble funnet at alle dyrene som deltok i forsøket hadde svært høye LBP verdier i serum (figur 3.11). På grunnlag av dette ble det sammenliknet med en VT chow kontrollgruppe, men også disse dyrene viste høye verdier. LBP nivå varierte innad i alle gruppene (SEM) men synes å variere noe mer i VT HF og VT chow gruppene. Toveis ANOVA viste at det ikke var noen interaksjon mellom HF og HF + FB diett ($p = 0,65$) eller mellom NOX1 og VT gruppene ($p = 0,17$). VT chow ble ikke tatt med i toveis ANOVA da denne gruppen er for liten til å oppnå normalfordeling. T-test opp mot de andre gruppene viste fortsatt ingen statistisk forskjell. VT chow vs VT HF, VT chow vs VT HF+ FB, VT chow vs NOX1 HF og VT chow vs NOX1 HF+ FB viste P- verdier på henholdsvis; 0,98; 0,70; 0,56 og 0,62.

Resultater



Figur 3.11. LBP målt i blodserum (ng/mL). Variasjon innad gruppene er uttrykt ved SEM (n = 3,9, 10) statistisk analyse mellom NOX1 og VT på HF og HF+FB diett ble utført ved hjelp av toveis ANOVA. Student t- test mellom VT chow og NOX1 og VT på HF og HF+FB diett. <0,05 som signifikanskriterium.

4.0 Diskusjon

I denne oppgaven var fokus å undersøke om NOX1 og favabønner hadde en rolle i mus som ble føret på en høyfetttdiet. Det er tidligere vist at ROS-produksjon via NOX1 enzymet kan ha en beskyttende rolle i tarm ved å fremme en sunn tarmmikrobiota og styrke tarmbarrieren. Mye tyder på at høyfetttdietter slik som vestlig diett med lite fiber og mye raffinerte karbohydrater gir et skifte i tarmmikrobiota til å inneholde mer gramnegative bakterier som skiller ut endotoksin (LPS). Tilstedeværelse av endotoksiner i tarmlumen vil trigge inflammasjon via en intracellulær signalvei og frigi proinflammatoriske cytokiner. LPS kan lekke over i sirkulasjonen som en konsekvens av brist i barrierefunksjonen. Denne tilstanden beskrives som endotoksemi. Noen forskere har koblet endotoksemi opp mot systemisk inflammasjon og metabolske lidelser slik som metabolsk syndrom, T2D og CVD.

Med denne oppgaven var det ønskelig å finne ut om fravær av NOX1 i tynntarm kunne gi økte nivå av LPS, påvirke utvikling av fedme, insulinresistens og akkumulering av TAG i lever. Og om NOX1 på så måte kan benyttes som en biologisk markør på systemisk lav grads inflammasjon med metabolsk syndrom som følge.

Videre var det et ønskelig å undersøke om Favabønner tilsatt høyfetttdietten ville ha noen effekt i denne sammenheng.

Punktvis disposisjon for diskusjonen:

- Effekt av musefôr på vekt hos NOX1 og villtypemus
- Bekreftelse på ROS signal fra ileum hos villtypemus
- Det ble påvist insulinresistens hos alle grupper på eksperimentell diett
- NOX1KO mus viste høye verdier av TAGs i levervev
- Alle mus viste unormalt høye verdier LBP i serum
- Metodologiske betraktninger
- Videre arbeid
- Konklusjon

4.1 Effekt av musefôr på vekt hos NOX1 og villtypemus

For at dyrene i de fire forsøksgruppene skulle oppnå rask vektøkning ble det gitt et høyfettfôr bestående av 60% fett med eller uten Favabønner. Diettene ble næringsberegnet slik at de ga tilnærmet like mye energi, henholdsvis 5,5 (HF) og 5,2 (HF + FB) kcal per gram. Sammensetning av makronæringsstoffene var likevel noe forskjellig. Bidraget av proteiner fra Favabønner var for eksempel ca. 20% og fiberinnholdet var helt forskjellig. Musene hadde fri tilgang til fôr og kunne spise så mye de ønsket (*ad libitum*). For videre å stimulere til vektoppgang ble treningshjul fjernet fra burene. Delahaye et al. (2018) og Hicks et al. (2016) har tidligere vist at HFD og fjerning av treningshjul ga rask vektoppgang hos C57BL/6 mus.

Det ble som forventet en vektoppgang og alle gruppene gikk signifikant opp i vekt fra forsøkets start til terminering i uke 14. Startvekten mellom VT og NOX1KO dyrene ble funnet signifikant forskjellig. En mulig årsak til dette kan være ulikheter i mikrobiotasammensetning som en følge av ulikt opprinnelsessted. NOX1 mus ble avlet frem lokalt i NMBUs dyrestall mens villtypemus ble bestilt fra

Diskusjon

Jackson labs. Selv om dyrene var matchet i alder og stamme, akklimatisert for å kompensere for stress og bunnstrø blandet for å prøve å korrigere for ulikheter i mikrobiota kan man nok ikke endre det faktum at de har en etablert medfødt mikrobiota som var annerledes enn hos mus avlet frem lokalt på NMBU. Det kan derfor ikke utelukkes at dette kan ha vært en medvirkende årsak til ulik vekt ved oppstart av eksperimentet. Når det ble sett på vektendring uavhengig av startvekt ble det funnet noe større forskjeller mellom gruppene enn når man bare så på den absolutte vektutvikling. Forskjellene var likevel ikke signifikante. Hvordan vektutviklingen hadde blitt om forsøket hadde fortsatt ut over de 14 ukene er usikkert.

Det ble sett en trend til at VT HF gruppen gikk mindre opp i vekt enn de andre gruppene. Videre var det antydning til at de gruppene som fikk HFD tilsatt Favabønner la på seg mest, hvor VT i gjennomsnitt gikk mer opp enn NOX1KO mus. Ingen har tidligere sett på effekt av Favabønner tilsatt HFD. En tidligere studie av Monk, Jennifer M. et al. (2017) har derimot funnet at kikerter ga høyere vekt hos C57BL/6 hannmus. Det skal dog bemerkes at dette ikke var høyfettdiett men lavfettdiett, at forsøkets varighet kun var 3 uker og at forskjellene mellom gruppene heller ikke var signifikante. Derimot fant Nakatani et al. (2018) en signifikant vekt nedgang i C57BL/6 hannmus som ble gitt tilskudd av proteinpulver fra mungbønner i et 4 ukers forsøk. De benyttet også en HF-diett med tilnærmet lik energimengde som ble gitt våre mus. Dette kan tyde på at ulike belgvekster eller fraksjoner av belgvekster i en HF diett kan ha betydning for vekt oppgang. At det for Favabønner og muligens kikerter gir økt appetitt med vektøkning som følge hos C57BL/6 hannmus er en mulig forklaring. I vårt forsøk ble det observert en trend til økt fôr-inntak i gruppene som fikk favabønner. Særlig var denne forskjellen noe mer uttalt i VT-mus, men VT-musene på HF hadde store individuelle forskjeller slik at en entydig konklusjon er vanskelig å trekke.

En alternativ forklaring på at mus fôret med favabønner hadde en trend til høyere vekt kan også være at sammensetningen av proteiner er noe forskjellig mellom de som fikk favabønner versus de som ikke fikk det. I HF-fôret er en stor andel av proteinkilden fra kasein. Det er tidligere vist at høyfettfôrede C57BL/6 mus med kasein som proteinkilde har en markant lavere vekt oppgang enn høyfettfôrede mus på andre proteinkilder til tross for et tilnærmet likt energiinntak mellom fôrgruppene (Liisberg et al. 2016). Siden våre mus hadde et relativt stort innslag av proteiner fra favabønner (ca. 20%) som igjen reduserte andelen kasein i fôret, kan det derfor ikke utelukkes at dette kan forklare trenden til at favabønnegruppen hadde en noe høyere vektutvikling.

Det ble også funnet en trend til at VT-mus hadde et noe høyere fôr-inntak enn NOX1KO mus selv om vektendringen i løpet av forsøket var tilnærmet likt de andre gruppene. Dette kunne tyde på at NOX1 kan ha betydning for energiomdanning. Ved å kalkulere hvor mye vekt som legges på dyrene i forhold til hvor mye energi som ble inntatt (g/kcal) ble det sett en tendens til at begge NOX1 KO-gruppene hadde høyere effektivitet enn VT HF, men ikke HF-FB gruppen. Dog er tendensen størst til at denne effekten er mest uttalt i HF+FB gruppene som igjen antyder at favabønnene har en tendens til å øke vekten på dyrene trolig som en kombinasjon av høyere fôr-inntak og mer effektiv energiomdanning. Genotype synes å ha mindre effekt.

Det ble også funnet individuelle forskjeller i vekt blant dyrene i alle gruppene, men så lenge det forholder seg slik gjennom hele forsøket og det uansett er gjennomsnittet i hver gruppe som blir vurdert er ikke dette fullt så relevant. Årsaken til vekt forskjeller mellom dyr i samme bur kan blant annet komme av at mus er svært dominerende og vil krangle om retten til fôret.

4.2 Bekreftelse på ROS-signal fra ileum hos villtypemus

I dette eksperimentet ble det etter 9 uker på høyfettdiett med og uten Favabønner utført *in vivo* avbildning av musenes mageregion etter injeksjon med L-012. Andre har funnet at ROS som detekteres via L-012 probe sannsynligvis er peroksinitritt dannet av iNOS og NOX1 enzymene fra NO og superoksid (Asghar et al. 2014; Kielland, Anders et al. 2009; Matziouridou et al. 2018).

Som forventet var lyssignal fra ROS kraftig redusert i NOX1KO musene sammenlignet med villtypemus. Manglende lyssignal fra ileum hos NOX1KO musene ble en bekreftelse på at lokal avl av NOX1KO-mus ved NMBUs dyrestall var vellykket.

Matziouridou et al. (2018) har demonstrert at ROS produsert av NOX1 og iNOS har en antimikrobiell effekt og reduserer dermed bakteriemengden i tarm. Andre har også funnet tilsvarende ved hjelp av bakteriefrie mus og antibiotikabehandling (Larsson et al. 2012) og ved faste og introduksjon til fast føde (Laukens et al. 2016; Sonoyama et al. 2009). NOX1 er ikke bare funnet å ha en antimikrobiell rolle i tarmen. Det er flere som har observert endringer i fyla (Matziouridou et al. 2018; Pircalabioru et al. 2016).

Flere studier har sett på antioksidanteffekter ved å måle oksygenradikal absorbansekapasitet (ORAC) hos mus som ble gitt ulike belgvekster tilsatt standard lavfett diett (chow) (Hou et al. 2019; Monk, Jennifer M. et al. 2017; Monk, Jennifer M et al. 2017). Ved å tilsette Favabønner i høyfettdietten ble det derfor forventet å finne en antioksidanteffekt da Favabønner er funnet å inneholde en del polyfenoler (Turco et al. 2016). Man kan heller ikke utelukke at Favabønner inneholder andre anti næringsstoffer med biologiske effekter slik som saponiner, lektiner og fytinsyre men disse er mindre undersøkt (Multari et al. 2015). For våre mus ble det ikke funnet noen signifikante forskjeller i ROS signal mellom høyfett og høyfett med Favabønner for verken VT eller NOX1KO mus. Likevel ble det sett en svak trend til at VT mus med Favabønner i dietten hadde flere mus med lavere ROS signal enn det som ble sett hos VT på ren HF diett. Det kan derfor se ut som at favabønnene har en svak effekt som demper ROS signalet fra mageregion hos VT mus. Spørsmålet videre er hva som er positivt her, høy eller lav ROS. Hvis Favabønner gir lavere ROS produksjon i tarm vil det da være gunstig for tarmhelsen?

At det finnes en grense for hvor høy ROS produksjon kan være før den endres fra å være gunstig til sykdomsfremkallende er tenkelig og det er nærliggende å tro at 60% høyfettdietter gir en lavgradsinflammasjon i tarmepitelet. Det ble ikke inkludert kontrolldyr på lavfett chow med Favabønner i dette eksperimentet slik at virkningen av Favabønner hos mus under normale forhold er usikkert. Flere forskere (Graf et al. 2019; Monk et al. 2015; Zhang et al. 2014) som så på antioksidant-effekt av belgvekster ved en fremprovosert tarmirritasjon hos mus viste at antioksidant effekten ble redusert. Dette kan til en viss grad sammenliknes med den lavgradsinflammasjon en 60% høyfettdiett potensielt kan påføre musene i vårt forsøk og som kan forklare hvorfor det ikke ble vist signifikante forskjeller mellom våre to grupper av villtypemus.

4.3 Det ble påvist insulinresistens hos alle grupper på eksperimentell diett

Insulinresistens er et av kriteriene for metabolsk syndrom og en kjent konsekvens av fedme som følge av et for høyt kaloriinntak eller lav fysisk aktivitet (Huang 2009). Flere studier har også koplet insulinresistens opp mot metabolsk endotoksemi ved at bakterier og høyfett dietter sammen fremmer en pro-inflammatorisk tilstand i tynntarmsepitetet (Cani et al. 2008; Cani et al. 2012; Ding et al. 2010; Everard et al. 2012; Kim et al. 2012). I tillegg til at det ble gitt et høyfettfôr ble også treningshjul fjernet fra burene for å fremprovosere fedmerelatert insulinresistens. Det ble valgt å evaluere Insulinresistens hos våre mus ved HOMA IR indeks kalkulert fra fastende blodglukose og plasma insulin verdier (Wallace et al. 2004). I dette eksperimentet var det ønskelig å se om NOX1 ville påvirke grad av insulinresistens hos mus på høyfett diett med eller uten Favabønner.

Vår hypotese var at NOX1 sin antimikrobielle effekt i tynntarmen (Matziouridou et al. 2018) skulle redusere gramnegative bakterier som følge av en fremprovosert dysbiose av høyfett dietten, og videre føre til at mindre mengde endotoksiner slik som LPS ville passere tarmepitetet og gi lavere grad av systemisk inflammasjon med påfølgende insulinresistens.

Det ble funnet at alle våre eksperimentelle grupper viste høye verdier ved kalkulert HOMA IR indeks, det ble heller ikke funnet signifikante forskjeller mellom dem. Det ble likevel funnet en svak trend til høyere HOMA IR verdier i NOX1KO gruppen enn i VT gruppene, det er noe usikkert hvor mye man skal vektlegge denne trenden da det var store individuelle forskjeller i gruppen og en ekskludering av den høyeste verdien gjorde trenden mindre synlig.

For å kontrollere for grad av insulinresistens ble det valgt å inkludere en kontrollgruppe med mus føret standard lavfett (chow) og med treningshjul i buret. Kontrollgruppen viste lavere HOMA IR indeks enn de andre gruppene og man kunne stadfeste høyere grad av insulinresistens hos dyrene på eksperimentell diett.

Det er gammelt nytt at belgvekster er gunstig for regulering av blodglukosen grunnet sitt høye innhold av protein, resistent stivelse og fiber (Alizadeh et al. 2014). Mindre undersøkt er det at antioksidantkomponenter slik som isoflavonoider og anthocyaniner uavhengig av sin antioksidanteffekt har biologiske funksjoner som er funnet å påvirke insulinsensitiviteten positivt (Clark et al. 2018). Noen av disse bioaktive stoffene er også funnet i Favabønner (Turco et al. 2016).

Det ble derfor undersøkt om Favabønner tilsatt i høyfett dietten kunne påvirke grad av insulinresistens hos våre mus. Toveis ANOVA viste ingen interaksjon mellom diettene som betyr at det ikke var noen Favabønne effekt. En mulig årsak kan være at høyfett dietten overskygget den eventuelle positive effekten av Favabønnene eller at andelen Favabønner var for liten til å ha noen betydning i forhold til insulinresistens.

For å finne ut om dyrenes vekt kunne ses i sammenheng med HOMA IR indeks ble dette vurdert ved korrelasjonsplott. Det ble derimot ikke funnet noen sammenheng. Det kan derfor se ut som insulinresistens er mer påvirket av en generell diettindusert vekt oppgang enn av individuelle vektforandringer hos våre mus. Det kan også tenkes at fravær av fysisk aktivitet som en konsekvens av mangel på treningshjul i buret bidro til økt insulinresistens (Huang 2009).

4.4 NOX1KO mus viste høye nivåer av TAGs i levervev

Akkumulering av triglyserider i levervev er indikator på at fettlagringskapasiteten til fettcellene er overskredet og TAGs blir tvunget til å lagres i ektopisk vev slik som lever (Bril et al. 2017; Parker 2018). Fettlever eller NAFLD er funnet at fører til metabolsk sykdom slik som T2D (Cusi 2012).

Fettkilden i diettene som ble laget til dette eksperimentet besto i all hovedsak av grisespekk, som kjent består av større mengder mettet fett. Flere forskere har funnet at mettet fett er mer tilbøyelig for lagring i levervev enn flerumettet fett (Puri et al. 2007; Rosqvist et al. 2014). Det var derfor forventet høy grad av TAGs i levervev hos våre mus som følge av 14 uker på 60% høyfettdiett.

Det ble funnet at NOX1KO mus hadde signifikant høyere triglyseridverdier enn hva som ble funnet hos villtype mus. En hypotese er at det høyere TAGs nivået sett hos NOX1KO mus kan komme av en lavgradsinflammasjon, som kan ha oppstått på grunn av en svekket tarmbarriere og lekkasje av bakterielle produkter slik som LPS via TLR4 over i blod. Det er tidligere vist at akkumulering av fett i lever også kan påvirkes av lavgradsinflammasjon (Caesar et al. 2015; Cani et al. 2008). Det ble derimot ikke påvist noen forskjeller i LBP nivå for våre mus (se del 4.5), mulig var dette grunnet tekniske årsaker. Et funn av vår forskergruppe viste derimot forhøyede nivåer av TNF- α i vevsprøver fra ileum hos NOX1KO mus (resultater ikke vist), men med usikkerhet rundt våre LBP resultater er det mindre bevis som støtter hypotesen.

Da NOX1 også er uttrykt i levervevets sinusoider (endotel) kan det også tenkes at ROS produksjon her øker som respons på influks av triglyserider i lever og på en måte påvirker eller hemmer videre lagring av TAGs i levervevet. Matsumoto et al. (2018) fant derimot ingen forskjell mellom NOX1KO og villtype mus når de så på akkumulering av TAGs i levervev. De fant derimot at ROS produksjon via NOX1 i levervevets sinusoider så ut til gi økt skade på levervevet. I denne oppgaven ble ikke dette undersøkt, og det er uklart om fravær av NOX1 i dette forsøket hadde tilsvarende effekt som vist av Matsumoto og medarbeidere.

Nakatani et al. (2018) er en av få studier som rapporterer målte triglyserider ved tilskudd av belgvekster i dietten. De fant at Mung-bønne protein ga lavere TAG nivå i lever enn en diett uten denne belgveksten. Flere forsker har derimot sett på effekt av belgvekster på inflammasjon (Graf et al. 2019; Monk et al. 2015; Monk et al. 2018b; Zhang et al. 2014) som igjen kan støtte opp vår inflammasjonshypotese da alle disse studiene viser beskyttende effekter av belgvekster på inflammasjon i tarmvevet.

Det funnet en svak trend til lavere TAGs hos NOX1KO-gruppen med favabønner, men dette ble ikke funnet hos villtype mus. Det er derfor svært usikkert om favabønnene har en effekt på akkumulerte triglyserider i lever hos våre mus, men resultatet kan likevel antyde at favabønner i noen grad bremser akkumulering av fett i lever.

Videre ble det observert at levervevet så ut til å ha en blekere farge hos de mest overvektige musene. det ble derfor undersøkt om det kunne være en sammenheng med mengden TAG målt i levervevet. Det ble funnet at TAG og vekt kun korrelerte hos villtype høyfett med Favabønner, men ikke for de andre gruppene. Det ser derfor ikke ut som fargen på fettvevet, vekt og TAG konsentrasjon i levervev kan relateres til hverandre.

4.5 Alle mus viste unormalt høye verdier LBP i serum

LBP er et akutfaseprotein som syntetiseres i leveren som respons på LPS-signalering. Tatt i betraktning at LPS har en kort halveringstid og at LBP representerer den medfødte immunresponsen trigget av LPS, er serum LBP en indirekte måte å måle LPS på i sirkulasjonen og anses som en god markør for metabolsk endotoksemi (Guerville et al. 2017). For å evaluere om fravær av NOX1 bidro til svekket barrierefunksjon og økt gjennomtrengelighet av LPS i tarm, ble nivåer av LBP målt i serum.

I dette eksperimentet ble det funnet svært høye nivåer av LBP i serum hos alle gruppene, men det ble ikke funnet noen forskjeller mellom gruppene. Dette kan muligens være i kontrast til det mange andre har funnet. Cani et al. (2007) var de første som fant at høyfett dietter førte til forhøyede verdier av LPS. De viste videre at injeksjoner av lave doser LPS førte til metabolske forstyrrelser slik som vekt oppgang og fettlever som tydelig viste en sammenheng mellom endotoksemi og metabolske forstyrrelser. Flere har i ettertid bekreftet denne sammenheng (Benoit et al. 2015; Brun et al. 2007; Creely et al. 2007). Videre har Graf et al. (2019); Monk et al. (2018b) sett at belgvekster, slik som kikerter og røde linser, reduserer LBP under påført tarmirritasjon med DSS. Dette kan til en viss grad relateres til lavgrasdsinflammasjon, en effekt som delvis kan fremkomme i tarm etter langtidsføring med 60% høyfett diett i mus.

Imidlertid viser noen studier at høyfettføring i rotter faktisk førte til en lavere mengde LBP i serum sammenliknet med rotter som ble føret med en lavfett chow-diett (Guerville et al. 2017; Zhang et al. 2012). Dette kan tyde på at LBP målinger ikke alltid reflekteres i et fettriikt måltid. Alternativt kan det heller utelukkes at våre funn er beheftet med metodologiske utfordringer. Det ble for eksempel ikke funnet noen publikasjoner som rapporterte så høye verdier som hos våre mus. Ingen forskjell mellom høyfettgruppene og kontrolldyr ga videre indikasjoner om at de svært høye verdiene ikke kunne være sanne.

Resultatene kan derfor ikke gi oss noe svar på om LBP nivå påvirkes av fravær av NOX1 eller tilskudd av Favabønner i høyfett dietten i dette tilfelle.

4.6 Metodologiske betraktninger

4.6.1 Valg av mus som forsøksdyr

Mus som ble valgt til dette forsøket var av stammen C57BL/6 mus. Disse musene er svært mottakelig for diett induisert overvekt (DIO) og utvikling av T2D og hjerte og karsykdom og var derfor godt egnet for til våre undersøkelser. Det er mange fordeler ved å benytte mus i ernæringsforskning fremfor mennesker. Det er først og fremst lettere å kontrollere matinntak og derfor vite hvilke komponenter i maten som påvirker ulike kliniske parametere. Mus er også lik mennesket fysiologisk sett og likheten i genmaterialet er ~ 92%. I tillegg er mus lette å håndtere, de tar liten plass, har høy reproduksjonsrate og forhold som aktivitet, mat og drikke er lette å kontrollere. Mus har også raskere vekstrate og deres metabolisme er derfor 7 x raskere enn hos menneskene (Terpstra 2001), hvilket betyr at vi også kan studere effekten av intervensjoner slik som høfett dietter raskere.

Det ble ved termineringsdagen noen utfordringer i forhold til injisering av anestesi hos musene.

Det ble oppdaget at de mest overvektige musene hadde lavere virkning av anestesi. Dette kommer ikke av at større mus trenger høyere doser da dosen settes i forhold til fysiologisk vekt, det vil si overvektige mus trenger ikke mer enn slanke mus. Gis dosen etter totalvekt vil musene lett få overdose siden størrelsen på vev og organer som sørger for metabolisme og eliminering av disse stoffene fortsatt er den samme. IP administrasjon foretrekkes da ZRF tas raskere opp der på grunn av sitt innhold av opiater. Vår hypotese var at injeksjonen ble injisert i fettvevet i bukhulen slik at effekten av dosen avtok. Det ble derfor nødvendig å injisere noe større doser (0.05- 0.1ml til 10 g/mus) hos de dyrene dette gjaldt før operativt inngrep (hjerterpunktur) kunne utføres.

4.6.2 In vivo avbildning

På tross av at den luminiserende L- 012 proben som ble injisert i musenes bukhule rett før *in vivo* avbildning ble utført av en erfaren person, kan likevel ulikheter i lyssignal ha oppstått som en konsekvens av unøyaktig injisering. Det ble blant annet observert hos enkelte mus at noe av væsken hadde lekket ut på papiret i ventetiden mens musene lå i isoflourankammeret før de skulle avbildes.

4.6.3 Insulinresistens

Metode for påvising av insulinresistens ble valgt med tanke på at den skulle være minst mulig belastende for dyrene. Dagen prosedyren skulle utføres ble dyrene derfor fastet i 5 timer før det ble tatt en enkel blodprøve til både blodglukose og plasma insulin. Når prøvene var analysert ble det funnet at fastende blodglukose var lik hos våre høfettfôrede og lavfettfôrede mus. Cani et al. (2008); Cani et al. (2012); Ding et al. (2010); Everard et al. (2012); Kim et al. (2012) fant derimot at fastende blodglukose var høyere hos høfett enn kontrollgruppene på lavfett diett. De ovennevnte studiene benyttet seg av ulike metoder for å ekstrahere blod hvor det mest vanlige var risp i halen. Ingen av dem rapporterer å ha utført prosedyren ved punktur av leggveven. Mulig vår metode var mindre belastende for musene som kan forklare mindre behov for glukose til vevet som følge av stress. Eller rett og slett fordi våre mus ikke var blitt sondeforet glukose, som utføres ved oral glukose toleranse test, og som er den mest brukte prosedyren for å estimere blodglukose i forskermiljøet. Det ble derimot funnet økt insulinutskillelse hos våre mus seinere i prosedyren som kan forklares med vår begrensede erfaring som førte til at vi brukte mer tid og stresset musene mer enn ønsket. Om insulinutskillelsen ble forhøyet som en konsekvens av stress vil dette påvirke utfallet av HOMA IR indeks som mål på insulinresistens.

Diskusjon

4.6.4 Triglyserider i levervev

For å kompensere for eventuell ulik fordeling av fettlagring i leverlappene ble samme leverlapp hentet ut hos alle våre mus. Vår første analyse av Triglyserider i levervev skulle vise seg å bli mislykket. Det ble bestemt at homogenisering av levervev skulle benyttes i prøveoppbeidelsen slik det ble anbefalt i instruksjonen som fulgte triglyserid kolometri assay kittet fra leverandøren. Da det ikke var instruert hvordan homogeniseringen skulle utføres ble det ut fra erfaring med tarmvev først benyttet en sprøyte med kanyle til dette. Levervevet ble med denne metoden ikke tilstrekkelig homogenisert og vi feilet å ekstrahere TAGs fra levervevet. Ny metode for homogenisering av levervev ble klekket ut og resterende leverprøver ble vellykket homogenisert som beskrevet i metodedel 2.4. Det ble i forkant kjørt en test for å estimere fortynningsfaktor. Men da musene åpenbart hadde ulike mengder TAGs i levervevet ble likevel fortynningsfaktor for lav og det ble svært mange prøvesvar over standard kurve ved siste analyse. Verdiene ble derfor ekskludert og det ble færre prøver som kunne inkluderes enn først antatt og som svekket våre data.

4.6.5 LBP i serum

Det ble funnet unormalt høye verdier av LBP i vårt eksperiment sammenlignet hva som kan forventes etter en intervensjon med høyfettdiett (Guerville et al. 2017; Zhang et al. 2012). Det er nærliggende å tro at prøvene ikke ble fortynnet nok, til tross for at anbefalingene gitt i instruksjonen som fulgte LBP-kittet ble fulgt. Det var uansett forventet at kontrolldyr skulle ha lavere konsentrasjoner LBP sammenliknet med høyfett. Dette var ikke tilfelle i vårt eksperiment. Derfor er det mer nærliggende å tenke at det var en feil på kittet (feil i «coating» av brønnene) eller på plateavleseren i dette tilfellet.

4.6 Videre arbeid

Dette forsøket bidro med en del analyseresultater med litt svake antydninger i de fleste av delforsøkene som ble utført. Tidsbegrensninger ga lite rom for repetisjon av analyser som kunne vært nyttig særlig for LBP analysen i vårt tilfelle.

For å styrke troverdigheten til eksisterende data for vektendring, ROS måling, Insulinresistens, triglyserid kvantifisering og LBP analyse kunne det også vært hensiktsmessig å inkludere en tilsvarende stor gruppe VT mus og NOX1KO mus på lavfett diett med Favabønner i tillegg til de andre gruppene, slik kunne man også vurdert effekt av Favabønner og NOX1 uavhengig av høfett.

Vår hypotese om metabolsk endotoksemi kunne blitt grundigere evaluert hvis det hadde blitt tid til flere av de planlagte analysene slik som 16sRNA sekvensering av bakterier i ileum, bakteriell translokasjon i lever og cytokiner i blod.

5.0 Konklusjon

Alle gruppene på eksperimentelt høyfettfôr viste en signifikant vektøkning i løpet av de 14 ukene forsøket pågikk. HF og HF+FB gruppene viste også en svak trend til ulik vektøkning som kan skyldes fôrets sammensetning. I denne sammenheng, dog ikke signifikant ble det videre sett en tendens til høyere energiomdannelse hos de gruppene som fikk favabønner i fôret og at NOX1 KO mus hadde mer effektiv energiutnyttelse.

In vivo avbildning bekreftet lavere detektert lyssignal fra mageregionen (indikativt for lavere ROS produksjon i ileum) hos NOX1KO mus og bekreftet den ROS genererende effekten av NOX1 enzymet. På tross av ikke signifikante funn ble det likevel sett en trend til at VT-mus med Favabønner i dietten hadde flere mus med svakere ROS signal enn mus på ren HFD, som kan antyde at forbindelser med antioksidantegenskaper i favabønner kan bidra her.

Sammenlignet med kontrollgruppen av villtypemus på standard chow-diett viste alle de eksperimentelle gruppene høyere grad av insulinresistens. Det ble funnet en trend til økt insulinresistens hos NOX1KO mus men denne var relativt svak. Det ble ikke funnet noen favabønne-effekt på insulinresistens.

Triglyseridnivå i lever ble funnet signifikant forhøyet hos NOX1KO mus som indikerer at ROS produksjon har en betydning for grad av akkumulering av TAGs i levervev, men årsak til dette er uklart. Antydning til lavere TAG-verdier med favabønner NOX1 KO mus kan tyde på at favabønner har en gunstig effekt på dette i denne gruppen.

Svært høye nivå av LBP i serum ble funnet i alle våre mus inkludert kontrolldyr. Det er derfor mulig at disse verdiene ikke reflekterer den fulle sannhet og kan ikke inkluderes i evalueringen med de øvrige resultatene

På tross av få signifikante forskjeller mellom VT og NOX1KO mus både med og uten favabønner ble det likevel funnet svake tendenser som kan antyde at NOX1KO mus er mer utsatt for vektøkning, insulinresistens og akkumulering av triglyserider i lever enn mus med intakt ROS produksjon. Selv om resultatene fra LBP i serum ikke kunne bidra med å oppklare grad av endotoksemi i dette studiet kan vi likevel med forsiktighet si at ROS produsert av NOX1 kan se ut til å ha en positiv betydning i forhold til utvikling av metabolsk syndrom.

Kilder

- Abrahamsen, U., Waalen, W. & Uhlen, A. K. (2018). Sortsforsøk i erter og åkerbønne. *Jord-og Plantekultur 2018. Forsøk i korn, olje-og proteinvekster, engfrøavl og potet 2017*.
- Agiastotelli, D., Alexopoulou, A., Vasilieva, L., Hadziyannis, E., Goukos, D., Daikos, G. L. & Dourakis, S. P. (2017). High serum lipopolysaccharide binding protein is associated with increased mortality in patients with decompensated cirrhosis. *Liver International*, 37 (4): 576-582.
- Akira, S. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Advances in immunology*, 78: 1-56.
- Alizadeh, M., Gharaaghaji, R. & Gargari, B. P. (2014). The effects of legumes on metabolic features, insulin resistance and hepatic function tests in women with central obesity: a randomized controlled trial. *International Journal of Preventive Medicine*, 5 (6): 710.
- Asghar, M. N., Emani, R., Alam, C., Helenius, T. O., Grönroos, T. J., Sareila, O., Din, M. U., Holmdahl, R., Hänninen, A. & Toivola, D. M. (2014). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in murine colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 20 (8): 1435-1447.
- Asheim, L. J., Bakken, A. K., Mittenzwei, K., Pettersen, I. & Prestegard, S. S. (2019). Konsekvenser av redusert kjøttforbruk: Scenarioanalyser med vekt på endringer i selvforsyning, arealbruk og struktur i jordbruk og kjøttindustri. *NIBIO rapport*.
- Assimakopoulos, S. F., Papageorgiou, I. & Charonis, A. (2011). Enterocytes' tight junctions: from molecules to diseases. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2 (6): 123.
- Aviello, G. & Knaus, U. (2017). ROS in gastrointestinal inflammation: rescue or sabotage? *British Journal of Pharmacology*, 174 (12): 1704-1718.
- Aviello, G. & Knaus, U. G. (2018). NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunology*, 11 (4): 1011-1023.
- Barrett, K. E. (2014). *Gastrointestinal physiology: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta*.
- Beckman, J. S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical research in toxicology*, 9 (5): 836-844.
- Bedard, K. & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87 (1): 245-313.
- Bednar, G. E., Patil, A. R., Murray, S. M., Grieshop, C. M., Merchen, N. R. & Fahey, G. C., Jr. (2001). Starch and Fiber Fractions in Selected Food and Feed Ingredients Affect Their Small Intestinal Digestibility and Fermentability and Their Large Bowel Fermentability In Vitro in a Canine Mode. *The Journal of Nutrition*, 131 (2): 276-286.
- Belwal, T., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M. & Habtemariam, S. (2017). Dietary anthocyanins and insulin resistance: When food becomes a medicine. *Nutrients*, 9 (10): 1111.
- Benoit, B., Laugerette, F., Plaisancié, P., Géoën, A., Bodenec, J., Estienne, M., Pineau, G., Bernalier-Donadille, A., Vidal, H. & Michalski, M.-C. (2015). Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. *Nutrition Research*, 35 (4): 346-356.
- Bevilacqua, S., Bonadonna, R., Buzzigoli, G., Boni, C., Ciociaro, D., Maccari, F., Giorico, M. A. & Ferrannini, E. (1987). Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism*, 36 (5): 502-506.
- Boden, G., She, P., Mozzoli, M., Cheung, P., Gumireddy, K., Reddy, P., Xiang, X., Luo, Z. & Ruderman, N. (2005). Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ B pathway in rat liver. *Diabetes*, 54 (12): 3458-3465.

- Bril, F., Barb, D., Portillo - Sanchez, P., Biernacki, D., Lomonaco, R., Suman, A., Weber, M. H., Budd, J. T., Lupi, M. E. & Cusi, K. (2017). Metabolic and histological implications of intrahepatic triglyceride content in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 65 (4): 1132-1144.
- Brown, D. I. & Griendling, K. K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 47 (9): 1239-1253.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Leo, V. D., Buda, A., Pinzani, M., Palù, G. & Martines, D. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292 (2): G518-G525.
- Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity*, 15 (4): 798-808.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the national academy of sciences*, 101 (44): 15718-15723.
- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (3): 979-984.
- Caesar, R., Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., Cani, P. D. & Bäckhed, F. (2015). Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell metabolism*, 22 (4): 658-668.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M. & Chabo, C. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56 (7): 1761-1772.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M. & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57 (6): 1470-1481.
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L. & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*, 3 (4): 279-288.
- Carvalho, B., Guadagnini, D., Tsukumo, D., Schenka, A., Latuf-Filho, P., Vassallo, J., Dias, J., Kubota, L., Carvalheira, J. & Saad, M. (2012). Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice. *Diabetologia*, 55 (10): 2823-2834.
- Chen, S. x. & Schopfer, P. (1999). Hydroxyl - radical production in physiological reactions: A novel function of peroxidase. *European journal of biochemistry*, 260 (3): 726-735.
- Christ, A., Lauterbach, M. & Latz, E. (2019). Western diet and the immune system: an inflammatory connection. *Immunity*, 51 (5): 794-811.
- Clark, J. L., Taylor, C. G. & Zahrada, P. (2018). Rebelling against the (Insulin) Resistance: A Review of the Proposed Insulin-Sensitizing Actions of Soybeans, Chickpeas, and Their Bioactive Compounds. *Nutrients*, 10 (4).
- Creely, S. J., McTernan, P. G., Kusminski, C. M., Fisher, f. M., Da Silva, N., Khanolkar, M., Evans, M., Harte, A. & Kumar, S. (2007). Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292 (3): E740-E747.
- Cusi, K. (2012). Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology*, 142 (4): 711-725. e6.
- De Wit, N. J., Bosch-Vermeulen, H., de Groot, P. J., Hooiveld, G. J., Bromhaar, M. M. G., Jansen, J., Müller, M. & van der Meer, R. (2008). The role of the small intestine in the development of

- dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC medical genomics*, 1 (1): 14.
- Delahaye, L. B., Bloomer, R. J., Butawan, M. B., Wyman, J. M., Hill, J. L., Lee, H. W., Liu, A. C., McAllan, L., Han, J. C. & van der Merwe, M. (2018). Time-restricted feeding of a high-fat diet in male C57BL/6 mice reduces adiposity but does not protect against increased systemic inflammation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43 (10): 1033-1042.
- Ding, S., Chi, M. M., Scull, B. P., Rigby, R., Schwerbrock, N. M., Magness, S., Jobin, C. & Lund, P. K. (2010). High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS one*, 5 (8): e12191.
- Donaldson, G. P., Lee, S. M. & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (1): 20-32.
- Duncan, S. H., Lobley, G., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A., Louis, P. & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, 32 (11): 1720-1724.
- Dyke, K. V., Ghareeb, E., Dyke, M. V. & Thiel, D. H. V. (2007). Ultrasensitive peroxynitrite - based luminescence with L - 012 as a screening system for antioxidative/antinitrating substances, eg Tylenol®(acetaminophen), 4 - OH tempol, quercetin and carboxy - PTIO. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence*, 22 (4): 267-274.
- El-Shemy, H., Abdel-Rahim, E., Shaban, O., Ragab, A., Carnovale, E. & Fujita, K. (2000). Comparison of nutritional and antinutritional factors in soybean and fababean seeds with or without cortex. *Soil science and plant nutrition*, 46 (2): 515-524.
- Everard, A., Geurts, L., Van Roye, M., Delzenne, N. M. & Cani, P. D. (2012). Tetrahydro iso-alpha acids from hops improve glucose homeostasis and reduce body weight gain and metabolic endotoxemia in high-fat diet-fed mice. *PLoS one*, 7 (3): e33858.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M. & Narala, K. K. (1994). Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (9): 1905-1913.
- Förstermann, U. & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, 33 (7): 829-837.
- Geissler, C. & Powers, H. J. (2017). *Human nutrition*: Oxford University Press.
- Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., De Villiers, W. & Eckhardt, E. (2009). Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *Journal of lipid research*, 50 (1): 90-97.
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M. & Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312 (5778): 1355-1359.
- Graf, D., Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., McGillis, L., Robertson, K., Brummer, Y., Tosh, S. M. & Power, K. A. (2019). Cooked Red Lentils Dose-Dependently Modulate the Colonic Microenvironment in Healthy C57Bl/6 Male Mice. *Nutrients*, 11 (8): 1853.
- Guerville, M., Leroy, A., Siquin, A., Laugerette, F., Michalski, M.-C. & Boudry, G. (2017). Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 313 (2): E107-E120.
- Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y. S. & Lee, W.-J. (2005). A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. *Science*, 310 (5749): 847-850.
- Hamilton, M. K., Boudry, G., Lemay, D. G. & Raybould, H. E. (2015). Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308 (10): G840-G851.

- Harford, K. A., Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C. & Roche, H. M. (2011). Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70 (4): 408-417.
- Hicks, J. A., Hatzidis, A., Arruda, N. L., Gelineau, R. R., De Pina, I. M., Adams, K. W. & Seggio, J. A. (2016). Voluntary wheel-running attenuates insulin and weight gain and affects anxiety-like behaviors in C57BL6/J mice exposed to a high-fat diet. *Behavioural brain research*, 310: 1-10.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444 (7121): 860-867.
- Hou, D., Yousaf, L., Xue, Y., Hu, J., Wu, J., Hu, X., Feng, N. & Shen, Q. (2019). Mung bean (*Vigna radiata* L.): Bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits. *Nutrients*, 11 (6): 1238.
- Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2 (5-6): 231-237.
- Jernås, M., Palming, J., Sjöholm, K., Jennische, E., Svensson, P.-A., Gabrielsson, B. G., Levin, M., Sjögren, A., Rudemo, M. & Lystig, T. C. (2006). Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *The FASEB Journal*, 20 (9): 1540-1542.
- Jiao, P., Ma, J., Feng, B., Zhang, H., Alan - Diehl, J., Eugene - Chin, Y., Yan, W. & Xu, H. (2011). FFA - induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways. *Obesity*, 19 (3): 483-491.
- Johansson, M. E., Jakobsson, H. E., Holmén-Larsson, J., Schütte, A., Ermund, A., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Arike, L., Wising, C., Svensson, F. & Bäckhed, F. (2015). Normalization of host intestinal mucus layers requires long-term microbial colonization. *Cell host & microbe*, 18 (5): 582-592.
- Kantar, F., PILBEAM, C. J. & Hebblethwaite, P. D. (1996). Effect of tannin content of faba bean (*Vicia faba*) seed on seed vigour, germination and field emergence. *Annals of Applied Biology*, 128 (1): 85-93.
- Kato, M., Marumo, M., Nakayama, J., Matsumoto, M., Yabe-Nishimura, C. & Kamata, T. (2016). The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Experimental animals*: 15-0127.
- Kielland, A., Blom, T., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Blomhoff, R. & Carlsen, H. (2009). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radic Biol Med*, 47 (6): 760-6.
- Kielland, A., Blom, T., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Blomhoff, R. & Carlsen, H. (2009). In vivo imaging of reactive oxygen and nitrogen species in inflammation using the luminescent probe L-012. *Free Radical Biology and Medicine*, 47 (6): 760-766.
- Kim, K.-A., Gu, W., Lee, I.-A., Joh, E.-H. & Kim, D.-H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PloS one*, 7 (10): e47713.
- Kless, C., Müller, V. M., Schüppel, V. L., Lichtenegger, M., Rychlik, M., Daniel, H., Klingenspor, M. & Haller, D. (2015). Diet - induced obesity causes metabolic impairment independent of alterations in gut barrier integrity. *Molecular nutrition & food research*, 59 (5): 968-978.
- Kolios, G., Valatas, V. & Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, 113 (4): 427-437.
- Lam, Y. Y., Ha, C. W., Campbell, C. R., Mitchell, A. J., Dinudom, A., Oscarsson, J., Cook, D. I., Hunt, N. H., Caterson, I. D. & Holmes, A. J. (2012). Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PloS one*, 7 (3): e34233.
- Lam, Y. Y., Ha, C. W., Hoffmann, J. M., Oscarsson, J., Dinudom, A., Mather, T. J., Cook, D. I., Hunt, N. H., Caterson, I. D. & Holmes, A. J. (2015). Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. *Obesity*, 23 (7): 1429-1439.

- Lamping, N., Dettmer, R., Schröder, N., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R. & Schumann, R. R. (1998). LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria. *The Journal of clinical investigation*, 101 (10): 2065-2071.
- Lapthorne, S., MacSharry, J., Scully, P., Nally, K. & Shanahan, F. (2012). Differential intestinal M - cell gene expression response to gut commensals. *Immunology*, 136 (3): 312-324.
- Larsson, E., Tremaroli, V., Lee, Y. S., Koren, O., Nookaew, I., Fricker, A., Nielsen, J., Ley, R. E. & Bäckhed, F. (2012). Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. *gut*, 61 (8): 1124-1131.
- Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M. & Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS microbiology reviews*, 40 (1): 117-132.
- Ley, R. E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D. & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the national academy of sciences*, 102 (31): 11070-11075.
- Liisberg, U., Myrnel, L. S., Fjære, E., Rønnevik, A. K., Bjelland, S., Fauske, K. R., Holm, J. B., Basse, A. L., Hansen, J. B. & Liaset, B. (2016). The protein source determines the potential of high protein diets to attenuate obesity development in C57BL/6J mice. *Adipocyte*, 5 (2): 196-211.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation*, 117 (1): 175-184.
- Mahan, L. K. & Raymond, J. L. (2016). *Krause's Food & the Nutrition Care Process, Mea Edition E-Book*: Elsevier.
- Martín-Cabrejas, M. Á. (2019). *Legumes: Nutritional Quality, Processing and Potential Health Benefits*, b. 8: Royal Society of Chemistry.
- Massamiri, T., Tobias, P. S. & Curtiss, L. K. (1997). Structural determinants for the interaction of lipopolysaccharide binding protein with purified high density lipoproteins: role of apolipoprotein AI. *Journal of lipid research*, 38 (3): 516-525.
- Matsumoto, M., Zhang, J., Zhang, X., Liu, J., Jiang, J. X., Yamaguchi, K., Taruno, A., Katsuyama, M., Iwata, K. & Ibi, M. (2018). The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 115: 412-420.
- Matziouridou, C., Rocha, S. D. C., Haabeth, O. A., Rudi, K., Carlsen, H. & Kielland, A. (2018). iNOS- and NOX1-dependent ROS production maintains bacterial homeostasis in the ileum of mice. *Mucosal Immunol*, 11 (3): 774-784.
- Monk, J. M., Zhang, C. P., Wu, W., Zarepoor, L., Lu, J. T., Liu, R., Pauls, K. P., Wood, G. A., Tsao, R. & Robinson, L. E. (2015). White and dark kidney beans reduce colonic mucosal damage and inflammation in response to dextran sodium sulfate. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26 (7): 752-760.
- Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., Graf, D., McGillis, L. H., Hussain, A., Carey, C., Robinson, L. E., Liu, R., Tsao, R., et al. (2017). Chickpea-supplemented diet alters the gut microbiome and enhances gut barrier integrity in C57Bl/6 male mice. *Journal of Functional Foods*, 38: 663-674.
- Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., Pauls, K. P., Robinson, L. E. & Power, K. A. (2017). Navy and black bean supplementation primes the colonic mucosal microenvironment to improve gut health. *The Journal of nutritional biochemistry*, 49: 89-100.
- Monk, J. M., Wu, W., Hutchinson, A. L., Pauls, P., Robinson, L. E. & Power, K. A. (2018a). Navy and black bean supplementation attenuates colitis-associated inflammation and colonic epithelial damage. *The Journal of nutritional biochemistry*, 56: 215-223.
- Monk, J. M., Wu, W., McGillis, L. H., Wellings, H. R., Hutchinson, A. L., Liddle, D. M., Graf, D., Robinson, L. E. & Power, K. A. (2018b). Chickpea supplementation prior to colitis onset reduces inflammation in dextran sodium sulfate-treated C57Bl/6 male mice. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 43 (9): 893-901.

- Mowat, A. M. & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology*, 14 (10): 667-685.
- Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E. B., Willett, W. C. & Hu, F. B. (2011). Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *New England Journal of Medicine*, 364 (25): 2392-2404.
- Mudryj, A. N., Yu, N., Hartman, T. J., Mitchell, D. C., Lawrence, F. R. & Aukema, H. M. (2012). Pulse consumption in Canadian adults influences nutrient intakes. *British Journal of Nutrition*, 108 (S1): S27-S36.
- Multari, S., Stewart, D. & Russell, W. R. (2015). Potential of fava bean as future protein supply to partially replace meat intake in the human diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14 (5): 511-522.
- Murakami, Y., Tanabe, S. & Suzuki, T. (2016). High - fat diet - induced intestinal hyperpermeability is associated with increased bile acids in the large intestine of mice. *Journal of food science*, 81 (1): H216-H222.
- Müller, V. M., Zietek, T., Rohm, F., Fiamoncini, J., Lagkouvardos, I., Haller, D., Clavel, T. & Daniel, H. (2016). Gut barrier impairment by high - fat diet in mice depends on housing conditions. *Molecular nutrition & food research*, 60 (4): 897-908.
- Nagpal, R. & Yadav, H. (2017). Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Ann Nutr Metab*, 71 Suppl 1: 11-16.
- Nakatani, A., Li, X., Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, H., Sutou, A., Watanabe, K., Motoyama, T., Tachibana, N. & Kohno, M. (2018). Dietary mung bean protein reduces high-fat diet-induced weight gain by modulating host bile acid metabolism in a gut microbiota-dependent manner. *Biochemical and biophysical research communications*, 501 (4): 955-961.
- Nikolopoulou, A. & Kadoglou, N. P. E. (2012). Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 10 (7): 933-939.
- Panday, A., Sahoo, M. K., Osorio, D. & Batra, S. (2015). NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cellular & molecular immunology*, 12 (1): 5-23.
- Parham, P. (2014). *The immune system*: Garland Science.
- Parker, R. (2018). The role of adipose tissue in fatty liver diseases. *Liver Research*, 2 (1): 35-42.
- Pircalabioru, G., Aviello, G., Kubica, M., Zhdanov, A., Paclat, M.-H., Brennan, L., Hertzberger, R., Papkovsky, D., Bourke, B. & Knaus, U. G. (2016). Defensive mutualism rescues NADPH oxidase inactivation in gut infection. *Cell host & microbe*, 19 (5): 651-663.
- Puri, P., Baillie, R. A., Wiest, M. M., Mirshahi, F., Choudhury, J., Cheung, O., Sargeant, C., Contos, M. J. & Sanyal, A. J. (2007). A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 46 (4): 1081-1090.
- Romani, L., Fallarino, F., De Luca, A., Montagnoli, C., D'Angelo, C., Zelante, T., Vacca, C., Bistoni, F., Fioretti, M. C. & Grohmann, U. (2008). Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature*, 451 (7175): 211-215.
- Rosqvist, F., Iggman, D., Kullberg, J., Cedernaes, J., Johansson, H.-E., Larsson, A., Johansson, L., Ahlström, H., Arner, P. & Dahlman, I. (2014). Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes*, 63 (7): 2356-2368.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C. & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18 (1): 190-195.
- Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*, 14 (8): e1002533.
- Singer, I. I., Kawka, D. W., Scott, S., Weidner, J. R., Mumford, R. A., Riehl, T. E. & Stenson, W. F. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 111 (4): 871-885.

- Snelgrove, R., Williams, A., Thorpe, C. & Hussell, T. (2004). Manipulation of immunity to and pathology of respiratory infections. *Expert review of anti-infective therapy*, 2 (3): 413-426.
- Sonoyama, K., Fujiwara, R., Takemura, N., Ogasawara, T., Watanabe, J., Ito, H. & Morita, T. (2009). Response of gut microbiota to fasting and hibernation in Syrian hamsters. *Applied and environmental microbiology*, 75 (20): 6451-6456.
- Strissel, K. J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J. W., DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A. S. & Obin, M. S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*, 56 (12): 2910-2918.
- Sun, K., Kusminski, C. M. & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*, 121 (6): 2094-2101.
- Suzuki, T. & Hara, H. (2010). Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutrition & metabolism*, 7 (1): 19.
- Tanaka, M. & Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International*, 66 (4): 515-522.
- Tanoue, T. & Honda, K. (2012). *Induction of Treg cells in the mouse colonic mucosa: a central mechanism to maintain host-microbiota homeostasis*. Seminars in immunology: Elsevier. 50-57 s.
- Terpstra, A. H. M. (2001). Differences between Humans and Mice in Efficacy of the Body Fat Lowering Effect of Conjugated Linoleic Acid: Role of Metabolic Rate. *The Journal of Nutrition*, 131 (7): 2067-2068.
- Tomas, J., Mulet, C., Saffarian, A., Cavin, J.-B., Ducroc, R., Regnault, B., Tan, C. K., Duszka, K., Burcelin, R. & Wahli, W. (2016). High-fat diet modifies the PPAR- γ pathway leading to disruption of microbial and physiological ecosystem in murine small intestine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (40): E5934-E5943.
- Turco, I., Ferretti, G. & Bacchetti, T. (2016). Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *Journal of Food & Nutrition Research*, 55 (4).
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *nature*, 444 (7122): 1027.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R. & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1 (6): 6ra14-6ra14.
- Van Dijk, T., Laskewitz, A., Grefhorst, A., Boer, T., Bloks, V., Kuipers, F., Groen, A. & Reijngoud, D. (2013). A novel approach to monitor glucose metabolism using stable isotopically labelled glucose in longitudinal studies in mice. *Laboratory Animals*, 47 (2): 79-88.
- van Dijk, T. H., Laskewitz, A. J., Grefhorst, A., Boer, T. S., Bloks, V. W., Kuipers, F., Groen, A. K. & Reijngoud, D. J. (2013). A novel approach to monitor glucose metabolism using stable isotopically labelled glucose in longitudinal studies in mice. *Lab Anim*, 47 (2): 79-88.
- Wallace, T. M., Levy, J. C. & Matthews, D. R. (2004). Use and Abuse of HOMA Modeling. 27 (6): 1487-1495.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, 112 (12): 1796-1808.
- Wurfel, M. M. & Wright, S. D. (1997). Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *The Journal of Immunology*, 158 (8): 3925-3934.
- Xiao, X., Yang, L., Pang, X., Zhang, R., Zhu, Y., Wang, P., Gao, G. & Cheng, G. (2017). A Mesh-Duox pathway regulates homeostasis in the insect gut. *Nature microbiology*, 2 (5): 17020.

- Ye, J. (2009). Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *International journal of obesity*, 33 (1): 54-66.
- Yin, J., Gao, Z., He, Q., Zhou, D., Guo, Z. & Ye, J. (2009). Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296 (2): E333-E342.
- Zhang, C., Monk, J. M., Lu, J. T., Zarepoor, L., Wu, W., Liu, R., Pauls, K. P., Wood, G. A., Robinson, L. & Tsao, R. (2014). Cooked navy and black bean diets improve biomarkers of colon health and reduce inflammation during colitis. *British Journal of Nutrition*, 111 (9): 1549-1563.
- Zhang, X., Zhao, Y., Zhang, M., Pang, X., Xu, J., Kang, C., Li, M., Zhang, C., Zhang, Z. & Zhang, Y. (2012). Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PloS one*, 7 (8): e42529.
- Zielonka, J., Lambeth, J. D. & Kalyanaraman, B. (2013). On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic Biol Med*, 65: 1310-1314.

Vedlegg

Vedlegg 1. Analysebevis for favabønnemel.

2019	Analysebevis						
Rekvirent:	Harald Carlsen			Prosjekt:	1205027514		
Prøvetype:	Faba Bønnemel			Utført av:	LabTek		
Reg.dato:	13.09.2019						
Antall prøver:	1						
Rekvisisjonsnr:	197-2019						
		Tørrstoff	N	C	S	Kjeldahl-N	Stivelse
LabTek ID	Rekvirent ID	g/kg	%	%	%	g/kg	%
184-1	1	925,2	5,5	42,6	0,17	54,3	32,1
<i>kontroll</i>			<i>ok</i>			<i>ok</i>	<i>ok</i>



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway