



FORORD

Denne oppgaven er en del av et brukerstyrt prosjekt finansiert av Forskningsrådet (225170) med Lerum AS som prosjekteier, og ble utført ved Nofima, avd. Mat og Helse fra juni 2014 til mai 2015.

Jeg ønsker å takke mine flotte og flinke veiledere ved Nofima, Kjersti Aaby og Berit Karoline Martinsen, for å overta som veiledere da min opprinnelige veileder byttet jobb. Dere har vært til stor hjelp hele veien, og jeg har satt utrolig stor pris på tiden dere satte av til de ukentlige møtene våre. Takk for en fin prosjekttur til Sverige i september, og takk for god veiledning under skriveprosessen. Ekstra takk til Berit for bidrag med resultater for spesifikke polyfenoler ved bruk av HPLC.

En spesiell takk ønsker jeg å gi til min opprinnelige veileder ved Nofima, Stine Grimmer. Selv om du byttet jobb og ikke offisielt var veileder for meg lenger har du fortsatt vært engasjert i oppgaven min, og brukt tid av din fritid til å bidra med veiledning og tips hele veien. Din positive innstilling har betydd mye for meg.

Jeg ønsker også å gi en takk til Tor Lea som bidro som intern veileder ved NMBU.

Takk til alle som har hjulpet meg med opplæring, veiledning og for de hyggelige samtale på biokjemilabben og cellelabben (ingen nevnt, ingen glemt). Takk til Cereal-avdelingen som har lånt meg et kontor, og takk til Fatima som jeg har delt kontor med. Dette året hadde ikke blitt det samme uten deg, Fatima.

Takk til bær dyrkerne i Leikanger, Fresvik og Eiker for høsting og sending av svarthyllbær.

Takk til familien min for støtte gjennom hele studietiden, og sist, men ikke minst, takk til min kjære samboer Jonas for støtte, oppmuntring og tålmodighet hele veien, spesielt de siste ukene.

SAMMENDRAG

Bær av svarthyll (*Sambucus nigra*) er vist å ha en immunologisk effekt, og det er antatt at et høyt innhold av polyfenoler er årsaken til dette. Det er funnet stor variasjon i innhold av polyfenoler mellom ulike sorter svarthyll, men lite er gjort på immunologisk effekt av ulike sorter.

I denne oppgaven ble saft og metanolekstrakt fra bær av de norskdyrkede sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor undersøkt med hensyn på immunologisk effekt og innholdsstoffer. Effekt av prosessering på innholdsstoffer og evne til å modulere immunresponsen ble også testet, da svarthyllbær som oftest prosesseres før konsumering. Immunologisk effekt ble testet ved bruk av den humane monocytiske cellelinjen U937 3κB-LUC som er stabilt transfektert med et luciferase-gen med tre NF-κB-bindingsseter. Dette gjør det mulig å måle modulering av basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet. NF-κB er et genregulatorisk protein som styrer mange av de immunologiske responsene i en celle. Måling av endring i NF-κB-aktivitet i cellene etter stimulering med et stoff vil derfor si mye om stoffets immunologiske effekt.

Det ble funnet signifikant forskjell mellom både sort, år og dyrkested både for evne til å modulere NF-κB-aktivitet og for innhold av totale fenoler (TP) og totale monomere antocyaniner (TMA). Sampo og Sambu hadde best evne til å hemme LPS-indusert NF-κB-aktivitet både for saftene og ekstraktene, og saft fra Sambu hadde høyest innhold av TP og TMA. Det ble også funnet negativ korrelasjon mellom LPS-indusert NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA. Ekstraktene hadde en negativ korrelasjon mellom basal NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA, mens det ikke ble funnet korrelasjon mellom saftenes basale NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA.

Varmebehandling av bær før pressing til saft ga enten ingen eller en reduserende effekt på modulering av NF-κB-aktivitet sammenliknet med effekt av saft fra bær som ikke var varmebehandlet før pressing. I tillegg var det et høyere innhold av TP og TMA i saft av bær som ble varmebehandlet før pressing enn saft fra bær som ikke ble varmebehandlet før pressing. Innhold av lipopolysakkarider (LPS) i saftene kan ha påvirket resultatene for modulering av NF-κB-aktivitet.

Det usikkert i hvilken grad norskdyrket svarthyll kan stimulere basal NF-κB-aktivitet, men de har en potensiell hemmende effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet. Det er grunn til å tro at høyt innhold av polyfenoler, og antocyaniner spesielt, i bærene er årsaken til den hemmende effekten. Produkter av svarthyllbær dyrket i Norge kan derfor ha en dempende effekt ved sykdom og lidelser forårsaket av forhøyede nivåer av NF-κB-aktivitet, noe som er interessant å undersøke nærmere.

ABSTRACT

Black elderberries (*Sambucus nigra*) have been shown to have an immunological effect, and it is believed that the explanation for this is their high content of polyphenols. Different varieties of elderberries have been found to have a considerable variation in the content of polyphenols, but the effects of different varieties in an immunological perspective is less explored.

In this thesis juice and methanol extracts of elderberries from the Norwegian cultivated varieties Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu and Samnor were studied with respect to their immunological effects and chemical composition. The effects of processing on the constituents and ability to modulate the immune response were also investigated, as elderberries are usually processed prior to consumption. The humane monocytic cell line U937 3 \times κ B-LUC stably transfected with a luciferase gene with three NF- κ B binding sites was used to measure the immunological effect. This allows measuring of the modulation of basal and LPS-induced NF- κ B activity. NF- κ B is a gene regulatory protein, which controls many of the immunological responses in a cell. Measuring the changes in NF- κ B activity after stimulation of the cells with a substance would therefore tell a lot about the substance immunological effect.

A significant difference between varieties, growing season and cultivation location was found both for the ability to modulate NF- κ B activity and for the content of total phenols (TP) and total monomeric anthocyanins (TMA). Sampo and Sambu had the best ability to inhibit LPS-induced NF- κ B activity of both juices and extracts, and juice made from Sambu had the highest content of TP and TMA. A negative correlation was also found between LPS-induced NF- κ B activity and content of TP and TMA. The extracts had a negative correlation between basal NF- κ B activity and content of TP and TMA, and no correlation was found between the juices basal NF- κ B activity and content of TP and TMA.

Heat treatment of the berries before pressing of juice had either no or inhibiting effect on the modulation of NF- κ B activity compared to the effect of juice from berries that were not heat-treated prior to pressing. The juice of berries that were heat-treated prior to pressing had a higher content of TP and TMA than the berries that were not heat-treated prior to pressing. Lipopolysaccharides (LPS) contamination in the juices may have affected the results for the modulation of NF- κ B activity.

In general, elderberries cultivated in Norway had a questionable effect on the ability to induce basal NF- κ B activity, but a potential inhibiting effect of LPS-induced NF- κ B activity. There is a reason to believe that the high content of polyphenols, anthocyanins in particular, in berries is the cause of this inhibiting effect. Products of elderberries cultivated in Norway may therefore have a dampening effect on disease and disorders caused by elevated levels of NF- κ B activity, which can be of interest for further investigation.

FORKORTELSER

Forkortelse	Betydning
ARP	Antiradikal effekt (Antiradical power)
ATP	Adenosin trifosfat (Adenosine Tri-Phosphate)
BAFF	B-celle aktiverende faktor
CGE	Cyanidin-3-glukosidekivalent
CO ₂	Karbondioksid
COX-2	Cyklooksygenase-2
DAD	Diodestråle-detektor (Diode Array Detector)
DMSO	Dimetylsulfoksid
ELISA	Enzymkoblet immunosorbent assay (Enzyme linked immunosorbent assay)
EU	Endotoksinenhet (Endotoxin Unit)
FC-reagens	Folin-Ciocalteus Reagens
FBS	Føtalt bovint serum
FRAP	Antioksidantkapasitet (Ferric reducing ability of plasma)
GAE	Gallesyreekvivalenter (gallic acid equivalents)
HCl	Hydrogenklorid (Hydrogenchloride)
HPH	Hygromycin-B-fosfotransferase (Hygromycin-B-phosphotransferase)
IκB	Inhibitor av κB
IKK	IκB-kinase-kompleks
IL	Interleukin
LAL	Limulus Amøbelysat
LBP	LPS-bindende protein
LPS	Lipopolysakkarid
LTb	Lymfotoksin B
Mg ²⁺	Magnesium
NaOH	Natriumhydroksid (Lut)
NEMO	NF-κB Essensiell Modulator
NF-κB	Kjernefaktor kappa B (Nuclear Factor kappa B)
NIK	NF-κB-induserende kinase
PBS	Fosfatbufferet salin (Phosphate buffered Saline)

PTGS2	Prostagladin-endoperoksid syntase-2
rFC	Rekombinant faktor C
RI	Refraksjonsindeks
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute - 1640
RT-qPCR	Real-time revers transkriptase PCR
SPE	Fast-fase-ekstraksjon (Solid phase extraction)
SD	Standardavvik (Standard Deviation)
TLR-4	Toll-liknende reseptor 4
TMA	Totale monomere antocyaniner
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Totale fenoler (total phenols)

INNHold

1 Introduksjon	4
1.1. Svarthyll	4
1.1.1. Innholdsstoffer i svarthyllbær	5
1.2. Polyfenoler	6
1.2.1. Klassifisering	6
1.2.2. Biotilgjengelighet av flavonoider.....	9
1.2.3. Biologisk effekt av polyfenoler	9
1.3. Inflammasjon og NF-κB	11
1.3.1. Inflammasjon.....	11
1.3.2. Kjernefaktor kappa B (NF-κB).....	11
1.3.3. Regulering av NF-κB	13
1.3.4. Lipopolysakkarider (LPS).....	15
1.4. Helseeffekter av svarthyllbær	17
1.5. Effekt av prosessering	19
1.5.1. Optimalisering	19
2 Mål med oppgaven.....	20
3 Materialer	21
3.1. Kjemikalier og reagenser	21
3.2. Utstyr og instrumenter	22
3.3. Kit.....	23
3.4. Cellelinjer.....	23
3.5. Programvarer.....	24
3.6. Bær	24
4 Metoder.....	25
4.1. Tilberedning av prøver	25
4.1.1. Ekstrakt.....	25
4.1.2. Saft.....	25
4.1.3. Prosessering	26
4.1.4. Fraksjonering ved bruk av fast-fase-ekstraksjon (SPE).....	27
4.2. Celleforsøk.....	27
4.2.1. Fortynning av prøver	28
4.2.2. Måling av NF-κB-aktivitet.....	28
4.2.3. Måling av celleviabilitet.....	29

4.3. Kjemiske analyser	30
4.3.1. Bestemmelse av totale fenoliske forbindelser	30
4.3.2. Bestemmelse av totale monomere antocyaniner	31
4.3.3. Bestemmelse av LPS-innhold	32
4.3.4. Bestemmelse av sukker/syreinnhold og polyfenoler ved bruk av HPLC	33
4.3.5. Bestemmelse av °Brix.....	34
4.4. Statistiske beregninger	35
5 Resultater	36
5.1. Effekt av saft fremstilt ved sentrifugering på NF- κ B-aktivitet og analyse av innholdsstoffer ...	36
5.1.1. Effekt på NF- κ B-aktivitet	36
5.1.2. Innhold av TP, TMA, sukker og syrer	41
5.2. Effekt av metanolekstrakter på NF- κ B-aktivitet og analyse av innholdsstoffer	45
5.2.1. Effekt på NF- κ B-aktivitet	45
5.2.2. Innhold av TP, TMA og individuelle polyfenoler i ekstrakt.....	50
5.3. Effekt av prosessert saft på NF- κ B-aktivitet og analyse av innholdsstoffer	54
5.3.1. Effekt på NF- κ B-aktivitet	54
5.3.2. Innhold av TP, TMA, sukker, syrer og polyfenoler i prosesserte safter.....	56
5.4. Effekt av ulike innholdsstoffer i svarthyllbær på NF- κ B-aktivitet	59
5.4.1. Fraksjonering av fire prøver svarthyllsaft.....	59
5.4.2. Effekt på NF- κ B-aktivitet av ulike innholdsstoffer	63
5.5. Stimulering av basal NF- κ B-aktivitet på grunn av LPS-kontaminering	65
5.5.1. Effekt av LPS-kontaminering på basal NF- κ B-aktivitet.....	65
5.5.2. Effekt av sterilfiltrering av saft på basal NF- κ B-aktivitet, TP og TMA	68
5.6. Korrelasjon mellom innhold av polyfenoler og NF- κ B-aktivitet	71
5.6.1. Korrelasjon mellom saftens evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA	71
5.6.2. Korrelasjon mellom prosesserte safters evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA	72
5.6.3. Korrelasjon mellom ekstraktenes evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA	74
6 Diskusjon	76
6.1. Effekt av svarthyll på NF- κ B-aktivitet	76
6.2. Innholdsstoffer i svarthyll.....	77
6.3. Oppsummering av NF- κ B-aktivitet og innholdsstoffer i svarthyll.....	79
6.4. Effekt av prosessering på NF- κ B-aktivitet og innholdsstoffer.....	79
6.5. Innholdsstoffer som påvirker NF- κ B-aktivitet.....	81

6.5.1. Effekt av fraksjoner og utvalgte innholdsstoffer	81
6.5.2. Korrelasjon mellom innhold av TP og TMA og effekt på NF- κ B-aktivitet	82
6.5.3. Effekt av LPS-kontaminering på NF- κ B-aktivitet	83
6.6. Bruk av celler	84
6.7. Generelle bemerkninger	86
7 Konklusjon	87
8 Videre arbeid	88
9 Referanser	89

1 INTRODUKSJON

Sykdommer som hjerte- og karsykdommer, kreft, overvekt og diabetes bidro til 68 % av alle dødsfall på verdensbasis i 2012, hvor 40 % av disse var før fylte 70 år (World Health Organization (WHO) 2014). Forekomst av disse sykdommene er dels på grunn av arv, og dels på grunn av måten vi lever på (derfor ofte kalt livsstilssykdommer). Mange av livsstilssykdommene er et resultat av kronisk inflammasjon (Hotamisligil 2006; Mantovani et al. 2008). Det er i flere epidemiologiske studier sett en sammenheng mellom høyt inntak av frukt og grønnsaker og forebyggende effekt på utvikling av livsstilssykdommer, noe som diskuteres i (Boeing et al. 2012). Et kosthold med høyt inntak av frukt og grønnsaker er derfor en viktig del i forebygging og potensielt behandling av visse kroniske sykdommer.

God helse er av interesse for hvert enkelt individ, men også for myndighetene da de ønsker lave kostnader i forbindelse med sykdom. Helsedirektoratet anbefaler et inntak på 500 gram frukt, bær og grønnsaker daglig, hvor ½ av dette bør være frukt og bær (Helsedirektoratet 2015). Økende antall studier viser at inntak av bær gir helsemessige fordeler ved å styrke immunforsvaret og hindre utvikling av livsstilssykdommer som blant annet hjerte-karsykdommer (Basu et al. 2010) og kreft (Seeram et al. 2006; Seeram 2008). Over en ti-års periode (2004 – 2013) har konsumet av friske bær i Norge økt fra gjennomsnittlig 1,8 kg til 4,0 kg bær per innbygger per år (Opplysningskontoret for frukt og grønt 2014), noe som viser økt interesse for bær hos den norske forbruker. For å dekke det økende salget øker importen fra utlandet. Norskprodusert mat blir stadig mer etterspurt av forbruker da dette blir sett på som et kvalitetsmerke.

Svarthyll er en av bærsortene det nå satses på å dyrke kommersielt i Norge for produksjon av saft og syltetøy. Svarthyllbær har høyt innhold av polyfenoler, spesielt antocyaniner, sammenliknet med andre bær (Skrede et al. 2012). Inntak av produkter med svarthyllbær er dermed antatt å gi en positiv effekt på helsen, noe som er vist i flere studier (Kong 2009; Sasaki et al. 2007; Sidor & Gramza-Michałowska 2014; Thole et al. 2006). Utvikling av kvalitetsprodukter av svarthyllbær med dokumenterte helseeffekter er av interesse, og i denne oppgaven ble ulike sorter av norskdyrket svarthyllbær testet for deres immunologiske effekt *in vitro*, og konsentrasjon av innholdsstoffer med mulige helseeffekter ble bestemt.

1.1. Svarthyll

Svarthyll (*Sambucus nigra*) er en stor, treaktig busk som får kremhvite blomster i sommermånedene. Blomstene utvikler seg til blåsvarte bær om høsten, for de fleste kjent som hyllebær (Figur 1.1.). Det finnes mange arter og sorter av svarthyllbær, og det er stort sett arten *Sambucus nigra* (også kalt europeisk svarthyll) som anvendes til matvarer. Svarthyll vokser vilt i store deler av de tempererte og tropiske delene av verden, og dyrkes også kommersielt blant annet i Oregon i USA, Danmark og Østerrike (Lee & Finn 2007). I Nord-Amerika finnes blant annet *Sambucus canadensis* (amerikansk svarthyll) og på Kanariøyene finnes *Sambucus palmensis*. I Norge finnes arten *Sambucus nigra* med

blant annet de danskutviklede sortene Sambu, Samidan, Samyl, Samidal, Sampo og Samnor, som er utviklet med tanke på optimal juiceproduksjon.

Blomstene kan benyttes til å lage ulike hylleblomst-drikker og for å sette smak til andre produkter (Christensen et al. 2008), og bærene brukes til saft, syltetøy eller som naturlig fargestoff i ulike matprodukter (Carlsen & Stapelfeldt 1997). Ekstrakter og konsentrater av bærene selges som helsekostprodukter på grunn av sine antatt positive helseeffekter (Kong 2009; Zakay-Rones et al. 2004). Busken benyttes nå også som prydblant i mange hager.

Før var svarthyll en viktig medisinplante. Hippokrates (400 f.Kr.) skal ha kalt svarthyll for «naturens medisinskrin», og både bær og blomster ble i flere hundre år benyttet som middel mot blant annet influensa, forkjølelse, reumatisme, fordøyelsesplager og for bedre tannhelse (Borchers et al. 2000; Thole et al. 2006). Nyere forskning viser også at svarthyll har immunmodulerende egenskaper, og det er antatt at bærenes høye innhold av polyfenoler kan være årsaken til dette (Knudsen & Kaack 2013; Sidor & Gramza-Michałowska 2014).



Figur 1.1.: Bær og blader av sorten *Sambucus nigra*. (Hentet fra <http://www.blackelderberry.info/>).

1.1.1. Innholdsstoffer i svarthyllbær

Svarthyll inneholder ca. 2,9 g proteiner/100 g bær (Akbulut et al. 2009), ca. 22,4 g lipider/100 g svarthyllfrø (Dulf et al. 2013) og ca. 18,4 g karbohydrat/100 g bær (Sidor & Gramza-Michałowska 2014). Av sukker i bærene (totalt mellom 4,5 – 11,5 g/100 g bær) er det omtrent like store mengder glukose og fruktose, og kun små mengder sukrose (Matejcek et al. 2014; Veberic et al. 2009). Av titrerbare syrer (0,83 – 1,7 g/100 g bær) er det sitronsyre og eplesyre det er mest av (Kaack et al. 2008b; Skrede et al. 2012; Veberic et al. 2009). I tillegg er det fiber, vitaminer og mineraler i bærene (Sidor & Gramza-Michałowska 2014). Svarthyll kan også inneholde giftstoffer som for eksempel alkaloidene coniin og sanguinarin, samt cyanogenet sambunigrin, som finnes hovedsakelig i umodne bær, frøene og andre plantedeler enn bærene (Ulltveit 1998). Disse stoffene finnes i svært lave konsentrasjoner i modne bær, og fjernes ved tørking eller varmebehandling.

Svarthyll får oppmerksomhet hovedsakelig på grunn av sitt høye innhold av polyfenoler. I en studie med 14 ulike bær ligger svarthyll blant de fire øverste sammen med aronia, ville blåbær og solbær for

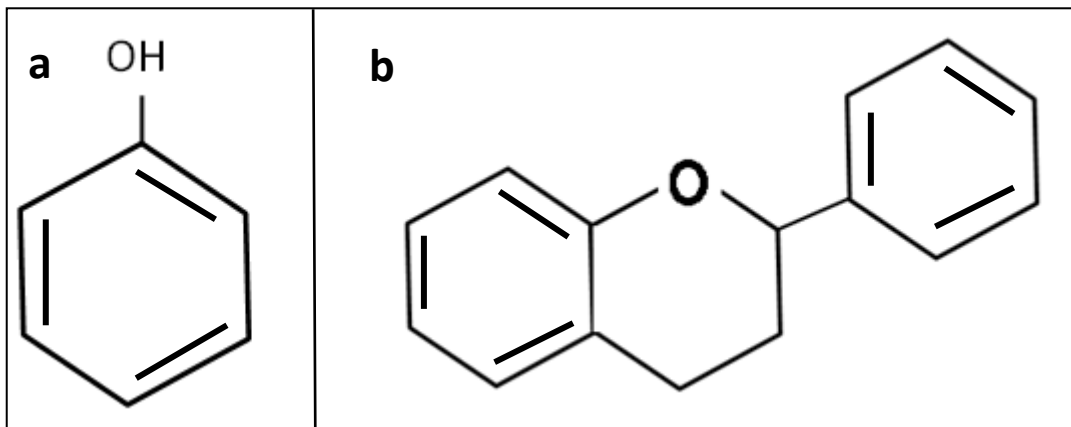
innhold av totale monomere antocyaniner (TMA), totale fenoler (TP), antiradikal effekt (ARP) og antioksidantkapasitet (FRAP) (Skrede et al. 2012). Svarthyll inneholder mye flavonoler (28,5 mg/100 g bær), fenoliske syrer (20,00 mg/100 g bær) og antocyaniner (465,1 mg/100 g bær). Av flavonolene er det quercetin (24,25 mg/100 g bær) og kaemferol (2,51 mg/100 g bær) som dominerer, hvor disse finnes som glykosider av for eksempel rutinose og glukose. Av de fenoliske syrene er det mest av klorogensyre (14,69 mg/100 g bær). Antocyaninene finnes som cyanidin-glykosider, hvor det er mest av cyanidin-3-sambubiosid (225,45 mg/100 g bær) og cyanidin-3-glukosid (225,26 mg/100 g bær). Innholdet av polyfenoler varierer en del mellom ulike sorter og miljøfaktorer. Tallene oppgitt her er tatt fra (Ochmian et al. 2012), hvor bærene (*Sambucus nigra*) var høstet fullmodne i Polen (sort ikke oppgitt). *Sambucus canadensis* har en annen sammensetning av antocyaniner, hvor innholdet av cyanidin-3-sambubiosid og cyanidin-3-glukosid er mye mindre enn i *Sambucus nigra* (Lee & Finn 2007). I stedet for inneholder de mye cyanidin-3-coumaroyl-sambubiosid-5-glukosid, som ikke finnes i *Sambucus nigra*.

1.2. Polyfenoler

1.2.1. Klassifisering

I tillegg til vitaminer og mineraler, fiber og sukkerarter inneholder bær fytokjemikalier. Fytokjemikalier er bioaktive mikronæringsstoffer som det finnes mye av i planter. De har flere viktige oppgaver i plantene, blant annet i forbindelse med reproduksjon og pollinering, samt å beskytte de mot planteetere og infeksjoner (Ross & Kasum 2002). Det er også fytokjemikalier som gir farge til plantene. Fytokjemikaliene kan deles inn i karotenoider, alkaloider, nitrogen-forbindelser, organosvovel-forbindelser og polyfenoler. Polyfenoler er den gruppen det er mest av i bær. Økning i innhold av polyfenoler er sett etter infeksjoner og skader på plantene da polyfenolene blant annet hjelper til med plantenes helingsprosess og har antimikrobielle egenskaper (Macheix & Fleuriet 1990). Sollys øker også innholdet av flavonoider (Macheix & Fleuriet 1990). Innholdet av polyfenoler i planter varierer derfor avhengig av vokseforhold, men er også avhengig av sort og høstetidspunkt (Macheix & Fleuriet 1990).

Polyfenolene har en (fenol) eller flere (polyfenol) hydroksybenzen-ringer (Figur 1.2.), hvor blant annet antall fenol-enheter og substituerende grupper avgjør hvilken av de fenoliske gruppene de tilhører: fenoliske syrer, stilbener, lignaner eller flavonoider (Manach et al. 2004).



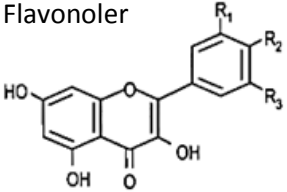
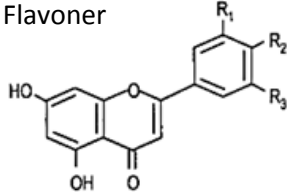
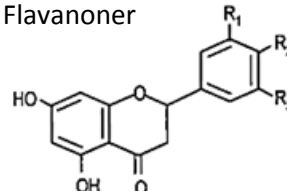
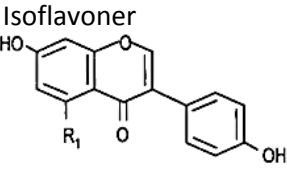
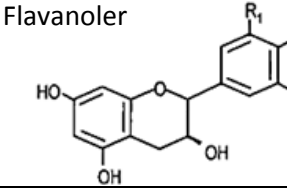
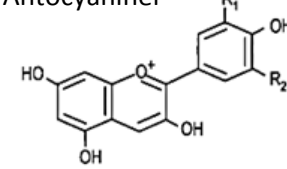
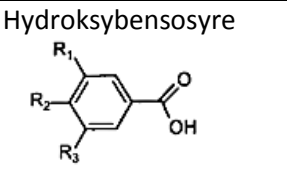
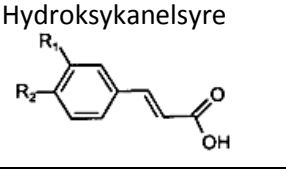
Figur 1.2.: Fenol (a) og aglykonet til flavonoidene (b). Antall fenol-enheter og substituerende grupper avgjør identiteten til (poly)fenolet.

Flavonoider kan deles inn i flavonoler, flavoner, isoflavoner, flavanoner, flavanoler og antocyaniner. Tabell 1.1. viser hovedgruppene av flavonoidene og de fenoliske syrene (som det er mest av i bær) med generell struktur, eksempler på forbindelser i gruppen og matvarer som inneholder høye nivåer av disse forbindelsene.

Antocyaniner

Antocyaniner er pigmenter som gir blå, lilla og rød farge til frukter, bær og blomster. Det er mye av dem i fargerike matvarer som rødløk, rødkål, røde druer, rødvin, og bær. Antocyaniner er den gruppen av flavonoider det er mest av i bær (Koponen et al. 2007; Manach et al. 2004). De skal virke forlokkende på dyr som skal hjelpe til med pollinering og spredning av frø. Antocyaniner beskytter også planten mot UV-stråling, og er derfor ofte å finne i de ytre delene av planter. Hos noen frukter og bær, deriblant svarthyll, finnes de også i fruktkjøttet. Antocyanidiner (aglykon-formene) er svært ustabile og kan lett degraderes ved endring i pH eller oksidering. I planter er de derimot glykosylert og esterifiset (da kalt antocyaniner), noe som beskytter de mot degradering (Manach et al. 2004). Flere *in vitro*- og *in vivo*-studier viser at antocyaniner har en antiinflammatorisk effekt (Karlsen et al. 2007; Youdim et al. 2002). På grunn av det høye innholdet av antocyaniner i bær er det grunn til å tro at disse stoffene bidrar til den immunologiske effekten observert hos bær (Joseph et al. 2014).

Tabell 1.1.: Undergruppene av flavonoider og fenoliske syrer. Viser generell struktur, samt eksempler på undergrupper og gode matkilder. Hentet fra (Ross & Kasum 2002) og (Manach et al. 2004).

Fenolisk gruppe	Eksempel	Matkilder
Flavonoider		
Flavonoler 	$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Quercetin $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Myricetin $R_2 = \text{OH}, R_1 = R_3 = \text{H}$: Kaemferol	Løk, grønnkål, bær
Flavoner 	$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$: Apigenin $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Lutein	Persille, paprika, selleri
Flavanoner 	$R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$: Naringenin $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OCH}_3$: Hesperetin	Sitrusfrukter, svsker
Isoflavoner 	$R_1 = \text{H}$: Daidzein $R_1 = \text{OH}$: Genistein	Soyabønner, belgfrukter
Flavanoler 	$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$: Catechin $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallocatechin	Te, bønner, kakaobønner
Antocyaniner 	$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$: Cyanidin $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Malvidin $R_1 = R_2 = \text{OH}$: Pelargonidin	Aubergine, bær, rabarbra, mørke druer
Fenoliske syrer		
Hydroksybensosyre 	$R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$: Gallesyre	Løk, te, bær
Hydroksykanelsyre 	$R_1 = R_2 = \text{OH}$: Kaffesyre $R_1 = R_2 = \text{OH}, \text{H} = \text{kininsyre}$: Klorogensyre	Kaffe, korn, blåbær

1.2.2 Biotilgjengelighet av flavonoider

Før flavonoidene kan tas opp i blodet må de absorberes av epitellaget i tarmen. Opptak av flavonoider avhenger av deres struktur, og kan både måles som antioksidantkapasitet og innhold av spesifikke metabolitter i blod eller urin etter inntak (Scalbert & Williamson 2000). Grad av hydrofobisitet avgjør om flavonoidet kan diffundere gjennom cellemembranen i tarmen eller om det må spaltes av ulike enzymer. Aglykonet i seg selv er hydrofobt, men ulike substitusjoner som glykosyleringer kan gjøre det mer hydrofilt og hindre mulighet for passiv diffusjon gjennom cellemembranen i tarmen. Som oftest må flavonoidglykosider hydrolyseres av glykosidaser i tynntarmen før de kan tas opp av tarmcellene (enterocytterne) og kan gå over i blodbanen. Flavonoider med rhamnose-substitusjon må hydrolyseres av rhamnosidaser produsert av mikroorganismer i tykktarmen før de blir absorbert (Scalbert & Williamson 2000). Antocyaniner (Cao et al. 2001) og enkelte quercetin-glukosider kan derimot absorberes uten å bli hydrolysert (Gee et al. 1998).

Etter absorpsjon blir flavonoidene metylert, sulfatisert og/eller glukuronisert. Metylering foregår hovedsakelig i lever og nyrer, sulfatisering hovedsakelig i leveren, og glukuroniseringen i enterocytterne (Piskula & Terao 1998; Spencer et al. 1999). Disse metabolittene kan ha andre funksjoner enn de fenoliske forbindelsene som finnes i maten. Biotilgjengeligheten varierer sterkt mellom de ulike fenolene. I en studie av Hollman *et al.* ble biotilgjengeligheten av quercetin- β -glukosid fra løk målt til 52 %, sammenliknet med 24 % for quercetin aglykonet og 17 % for quercetin rutinosid (Hollman et al. 1995).

Stort sett er det små mengder av de konsumerte polyfenolene som detekteres i blod og urin etter et måltid (Scalbert & Williamson 2000). Grunner til dette kan være at mikrobiotaen i tykktarmen metaboliserer mange av polyfenolene (Seeram 2008), i tillegg til metabolisering i leveren. Langt fra alle disse metabolittene av polyfenoler er identifisert, slik at de heller ikke blir detektert. I tillegg skilles metabolittene ut gjennom galle og urin, og metabolittene kan også bli raskt tatt opp i vevet, slik at de målte verdiene blir underestimert.

1.2.3. Biologisk effekt av polyfenoler

Polyfenoler har i flere studier vist å ha anti-inflammatorisk effekt som kan forebygge og dempe ulike lidelser og livsstilsykdommer, deriblant forkjølelse og influensa (Nantz et al. 2013), kreft (Lambert & Elias 2010; Spagnuolo et al. 2012) og hjerte-karsykdommer (Nicholson et al. 2008; Quiñones et al. 2013). I tillegg kan de og deres metabolitter fungere som signalmolekyler og påvirke immunsystemet, metabolske prosesser og genuttrykk i cellene (Joven et al. 2014; Kiss et al. 2011). Polyfenoler er vist å ha en indirekte antioksidativ effekt ved å stimulere til dannelsen av γ -glutamylcystein syntetase, noe som er det begrensede enzymet for syntese av den endogene antioksidanten glutation (Moskaug et al. 2005; Myhrstad et al. 2002).

Selv om mange *in vitro*-forsøk viser at polyfenolene har høy antioksidantkapasitet, er det i senere tid stilt spørsmål ved om denne effekten kan overføres til *in vivo* (Tomás-Barberán & Andrés-Lacueva 2012). På grunn av høy grad av metabolisering som kan føre til metabolitter uten antioksidantkapasitet kan disse *in vitro*-forsøkene i mindre grad sammenliknes med hva som skjer *in vivo*. I tillegg er det en relativ lav biotilgjengelighet av de fleste polyfenoler som også fører til en lav

konsentrasjon i blodet (Cerdá et al. 2004; Tomás-Barberán & Andrés-Lacueva 2012).

I fordøyelsen før absorpsjon er derimot konsentrasjonen av polyfenoler høy, og her kan polyfenolenes antioksidative evner ha betydning. En studie med både mus og mennesker av Kanner *et al.* viser at inntak av rødvin (som har høyt innhold av polyfenoler) sammen med rødt kjøtt hindrer oksidering av fettsyrer i kjøttet, som igjen hindrer degradering av vitaminer, proteiner, karotenoider og andre stoffer som følge av oksideringen (Kanner et al. 2012). Dermed beholder måltidet sine næringsnyttige innholdsstoffer. Polyfenoler fra bær er vist å inhibere flere fordøyelsesenzymmer *in vitro*, blant annet α -amylase, α -glukosidase og lipase (Boath et al. 2012; McDougall et al. 2009), noe som kan gi lavere opptak av karbohydrater og lipider i tynntarmen, hvis resultatene kan overføres til *in vivo*. Dette kan potensielt hindre hyperglykemia hos diabetikere, og også bidra til økt vektkontroll.

I tykktarmen er polyfenoler og metabolitter dannet av mikrobiotaen vist å ha en anti-inflammatorisk og anti-kreft effekt i tarmcellene ved å dempe kjernefaktor kappa-B (NF- κ B)-aktivitet og nedregulere prostaglandin-endoperoksidase-2 (PTGS2) (før kalt cyklooksigenase-2 (COX-2))-proteiner som stimulerer til dannelse av kreftceller (Giménez-Bastida et al. 2012; González-Sarrías et al. 2010).

Interaksjoner mellom innholdsstoffer

Studier viser at det er viktig å spise hele matvaren, og ikke bare enkelte innholdsstoffer, da mange mikronæringsstoffer er vist å gi en synergisk effekt på immunresponsen (Kolberg et al. 2013; Lila & Raskin 2005; Liu 2003; Paur et al. 2010). Dette gjelder både mellom stoffer i samme matkilde (endointeraksjoner), og også mellom ulike matvarer (exointeraksjoner). Kolberg *et al.* fant for eksempel at timian og oregano ga 13,4 % større nedgang i lipopolysakkarid (LPS)-indusert kjernefaktor κ B (NF- κ B)-aktivitet enn hva timian og oregano i halve konsentrasjoner gjorde alene (Kolberg et al. 2013).

Exointeraksjoner kan også gi negative effekter, spesielt i kombinasjon med legemidler. Et eksempel er polyfenolet furanocumarin i grapefrukt som øker opptaket av legemidler (Dahan & Altman 2004; Lila & Raskin 2005). Det er også stilt spørsmål ved om inntak av isolerte stoffer i form av kosttilskudd kan gi negativ helseeffekt på grunn av unaturlig høy dose og annen sammensetning av næringsstoffer enn det som finnes i et normalt kosthold. Unaturlig høyt inntak av noen polyfenoler, som kan skje ved bruk av kosttilskudd, kan være skadelig da noen flavonoider også fungerer som pro-oksidanter (Kessler et al. 2003; Miura et al. 1998). Flere tilfeller av forgiftning på grunn av for høyt inntak av polyfenoler funnet i te er omtalt i (Mazzanti et al. 2009). Et kosthold basert på variert inntak av frukt, bær og grønnsaker er derfor anbefalt.

1.3. Inflammasjon og NF-κB

1.3.1. Inflammasjon

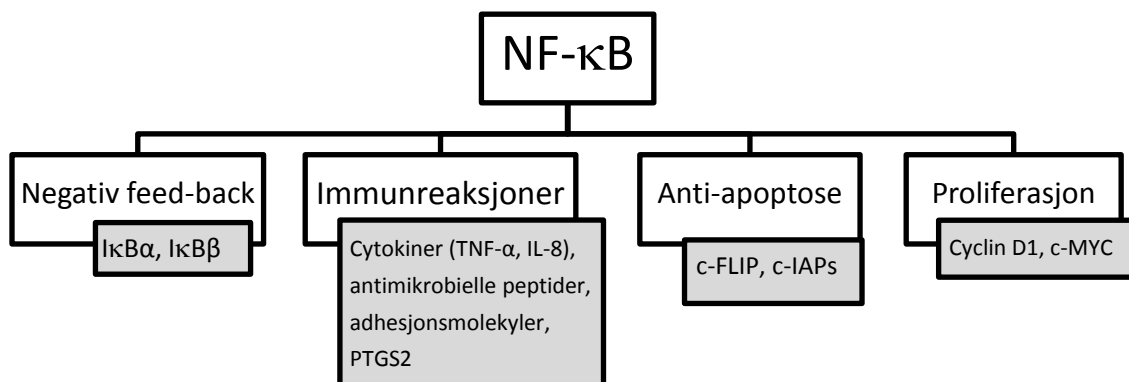
Ved inflammasjon reagerer immunceller på ulike faktorer som kroppen anser som en trussel for organismen. Det kan være patogener eller virus, som for eksempel ved halsbetennelse eller influensa (da kan også begrepet infeksjon benyttes) eller skadet og dødt cellevev, som for eksempel ved kutt- og støttskader, som er den utløsende faktoren til en inflammasjon.

En inflammasjon starter ved at makrofager i det skadede/infiserte vevet stimuleres av den utløsende faktoren til å skille ut effektormolekyler (pro-inflammatoriske cytokiner, kjemokiner og komplementærproteiner) som blant annet (1) tiltrekker seg immunceller (i første omgang monocytter og nøytrofiler), (2) får immuncellene til å feste seg til blodåreveggen ved skadestedet, og (3) øker gjennomtrengeligheten til blodårene slik at immunceller og effektormolekyler kan trenge ut i det aktuelle vevet (Murphy 2011). Dette fører til varme, smerte, rødhet og/ eller hevelse (ødem), avhengig av i hvilke vev inflammasjonen skjer. Monocytter differensierer til makrofager i det skadede vevet, og makrofager og nøytrofiler (kalt de inflammatoriske cellene) eliminerer inntrengere/skadet vev og rekrutterer flere immunceller til skadestedet ved å skille ut effektormolekyler. Lymfocytter (en type immunceller) kan aktiveres i lymfevev nær skadestedet hvis ikke reaksjonen blir kontrollert av de inflammatoriske cellene, og noen av lymfocytene vil gå ut i vevet og hjelpe til med å bekjempe infeksjonen. Når immuncellene har fått kontroll over situasjonen vil inflammasjonen avta og eventuelt skadet vev bli reparert. Normalt vil en inflammasjon avta etter et par dager.

Kronisk inflammasjon kan oppstå hvis det som forårsaker inflammasjonen ikke blir eliminert. Andre årsaker til kronisk inflammasjon kan være langvarig eksponering av lave konsentrasjoner av irriterende stoffer, eller tilstedeværelse av en av mange autoimmune sykdommer, for eksempel multippel sklerose (MS) og Crohns sykdom. På lang sikt kan kronisk inflammasjon føre til utvikling av blant annet kreft, diabetes type 2, samt hjerte- og karsykdommer (Hotamisligil 2006; Mantovani et al. 2008). Det er vist at vev med kronisk inflammasjon er mer utsatt for utvikling av kreft, for eksempel er det sett sammenheng mellom infeksjon med bakterien *Helicobacter pylori*, som forårsaker magesår, og magekreft (Roder 2002). Inflammasjon vil også øke dannelsen av reaktive molekyler, og for høye verdier av slike forbindelser (kalt oksidativt stress) kan føre til mutasjoner på grunn av DNA-skade og aktivere signalveier som igjen kan føre til ulike sykdommer, aktivering av NF-κB, aldring og celledød (Finkel & Holbrook 2000).

1.3.2. Kjernefaktor kappa B (NF-κB)

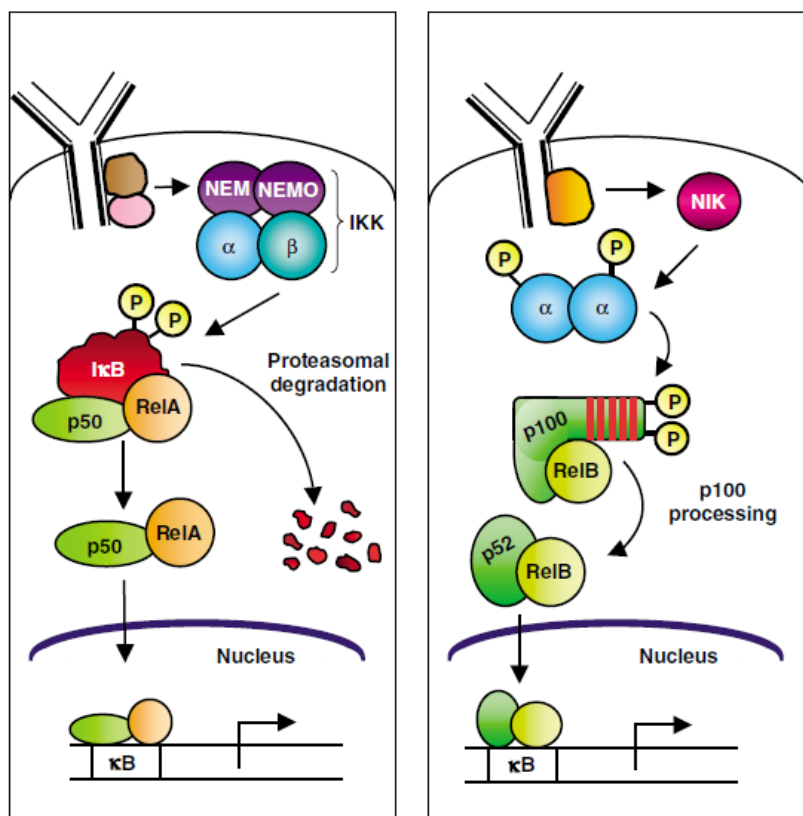
Kjernefaktor kappa B (NF-κB) er en transkripsjonsfaktor som kontrollerer mange gener i forbindelse med regulering av immunsystemet, blant annet cellulært stress, apoptose (kontrollert celledød), immunreaksjoner og inflammasjonsrespons (Pahl 1999) (Figur 1.3.).



Figur 1.3.: Gener som blir styrt av NF-κB delt inn i fire hovedgrupper: De som gir negativ feed-back og stopper aktiveringen, de som styrer immunreaksjoner, gener involvert i anti-apoptose og gener involvert i proliferasjon. Eksempler på gener som aktiveres er nevnt under hver gruppe. IκBα, inhibitor κBα; IκBβ, inhibitor κBβ; PTGS2, prostaglandin-endoperoksidase-2; c-FLIP, Cellulær FLICE (FADD-lik IL-1β-konverterende enzym)-inhibitorprotein; c-IAPs, cellulære apoptoseinhibitorer. Figuren er modifisert fra (Karin et al. 2002).

Hos virveldyr består Rel/NF-κB-familien av fem proteiner kalt p50, p52, Rel A (p65), c-Rel og Rel B som danner homo- eller heterodimere i cytosol. Den mest vanlige dimeren er p50/RelA. Når dimerene er bundet til et av inhibitor-proteinene inhibitor κB (IκB) i cytosol, hindres de i å forflytte seg inn i kjernen, da IκB blokkerer sekvensene med disse signalene (Gilmore 2006b). Aktivering av NF-κB skjer når ulike stimulerende forbindelser binder til reseptorer i cellemembranen. Hovedsakelig er det to ulike veier som kan aktiveres avhengig av hva slags stimuli cellen utsettes for; den klassiske og den alternative veien (Figur 1.4.). Den klassiske veien aktiveres av pro-inflammatoriske cytokiner (tumornekrosefaktor α (TNF-α), interleukin 1β (IL-1β)), LPS, virus og cellulært stress. Dette setter i gang en kaskadereaksjon som blant annet fører til aktivering av IκB-kinase-komplekset (IKK). IKK består av de to katalytiske subenhetene IKKα og IKKβ, samt den regulatoriske subenheten NF-κB Essensiell Modulator (NEMO). IKK fosforylerer deretter IκBα, som fører til degradering av IκB av proteosomer. Deretter er NF-κB-dimeren (p50/RelA) frigjort, og ledes inn i kjernen hvor den binder til gensekvenser med κB bindeseter som for eksempel gen for pro-inflammatoriske cytokiner (IL-1β, TNF-α med fler), anti-apoptotiske gen og andre målgen som er viktig for immunforsvaret (Figur 1.3.) (Bonizzi & Karin 2004; Pahl 1999). IκBα er også et av målgenene til p50/RelA, og vil gi en negativ feedback på aktiveringen av NF-κB-målgenene slik at aktiveringen begrenses til 30 – 60 minutter (Hoffmann et al. 2002). IκBα kan etter translasjon gå inn i kjernen og fjerne p50/RelA fra DNA, og transportere det ut i cytosol igjen, hvor det ligger latent til ny aktivering skjer.

Den alternative veien aktiveres blant annet av lymfotoksin B (LTb), B-celle aktiverende faktor (BAFF) og TNF-cytokiner, bortsett fra TNF-α. IKK-komplekset som aktiveres av NF-κB-induserende kinase (NIK) består av to IKKα-enheter som delvis fosforylerer p100 til p52, og frigjør dermed p52/RelA som forflytter seg inn til kjernen og aktiverer målgener. Målgenene til den alternative veien er viktige for den adaptive immune utviklingen i sekundære lymfoide organer og B-celler (Bonizzi & Karin 2004).



Figur 1.4.: Skjematisk oversikt over aktivering av den klassiske (til venstre) og den alternative (til høyre) veien av NF- κ B målgener. Den klassiske veien aktiverer I κ B-kinase – komplekset (IKK) som består subenhetene IKK α og IKK β , samt den regulatoriske subenheten NF- κ B Essential Modulator (NEMO). IKK fosforylerer og merker inhibitor κ B (I κ B) som fører til degradering av I κ B og frigjøring av p50/RelA som forflytter seg inn i kjernen og aktiverer NF- κ B-målgener. Den alternative veien (til høyre) aktiverer NF- κ B-induserende kinase (NIK) som fosforylerer en dimer av IKK α . Dimeren fosforylerer og degraderer deretter p100 til p52, og p52/RelB forflytter seg inn i kjernen og aktiverer NF- κ B-målgener. Figuren er hentet fra (Gilmore 2006b).

1.3.3. Regulering av NF- κ B

Matvarer som inneholder stoffer som kan modulere NF- κ B-aktiviteten er av spesiell interesse for både næringsmiddel- og legemiddelindustrien, da forbindelser i slike matvarer kan forebygge, og potensielt behandle ulike sykdommer forbundet med feilregulert NF- κ B-aktivitet og kronisk inflammasjon.

Aktivatører og basal NF- κ B-aktivitet

NF- κ B regulerer transkripsjonen til mange ulike gener, og blir dermed også aktivert av mange ulike faktorer. I 1999 var over 150 ulike aktivatører dokumentert, deriblant ulike bakterier, virus og parasitter, ulike cytokiner, psykologisk stress, fysisk stress (for eksempel UV-stråling), oksidativt stress, miljøfaktorer (for eksempel sigaretttrøyk og forurensning) og virkestoff i ulike legemidler (Pahl 1999). Enkelte flavonoider er vist å ha en aktiverende effekt, ved å danne pro-oksidanter (Lambert & Elias 2010), og kaemferol, som finnes i bær, er vist å stimulere NF- κ B-aktiviteten (Paur et al. 2008). Det er gjort lite arbeid på dette området, og mekanismene bak polyfenolenes aktivering av NF- κ B er

usikre.

Det er vist større interesse for de NF- κ B-dempende egenskapene matvarer kan ha. En kontrollert NF- κ B-aktivitet er viktig for en normal immunfunksjon og celleaktivitet. Immunsystemet må hele tiden holde kroppen fri for patogene bakterier og andre inntrengere, og en svak aktivering av NF- κ B (basal NF- κ B-aktivitet) er dermed nødvendig, spesielt i tarmsystemet hvor kontakt med mikroorganismer er ekstra stor. Den basale NF- κ B-aktiviteten kontrollerer også gener som har en anti-apoptotisk og proliferativ virkning, og feilregulering av NF- κ B er sett i forbindelse med utvikling av kreft (Karin et al. 2002).

Aktiviteten til den basale NF- κ B-aktiviteten varierer i ulike vev. Hos mus er det vist at brisselen og lymfekjertler i nakken og tynntarm har en målbar basal NF- κ B-aktivitet (Carlsen et al. 2002). Ved unormal høy basal NF- κ B-aktivitet vil stoffer som demper NF- κ B-aktivitet være av interesse ved at de kan dempe risikoen for utvikling av sykdommer som er sett i forbindelse med kronisk inflammasjon og annen feilregulert NF- κ B-aktivitet. Hos personer som har en normal basal NF- κ B-aktivitet kan det derimot være av større interesse å gi en svak stimulering av den basale NF- κ B-aktiviteten. I flere tilfeller er det sett at utslaget av en sykdom blir mindre omfattende hvis en økning av NF- κ B-aktivitet er gjort på forhånd (pre-kondisjonering), som for eksempel sett i mus ved blodforgiftning (Yang et al. 2000), ved hjerteinfarkt (Valen 2004) og ved hjerneslag og epilepsi (Blondeau et al. 2001). Flere av målgenene for NF- κ B er også viktige for opphøret av inflammasjoner og sårheling (Lawrence & Fong 2010), og i et forsøk med knock-out-mus med defekt aktivering av NF- κ B ble det vist at sårheling tok lenger tid enn normalt hos knock-out-mus enn hos kontroll-mus (Ruusalepp et al. 2006).

Regelmessig inntak av stoffer som gir en svak stimulering av NF- κ B-aktiviteten kan dermed være gunstig.

Supressorer og induisert NF- κ B-aktivitet

Høy NF- κ B-aktivitet ses i forbindelse med bakterie- og virusinfeksjoner, siden immunsystemet vil aktiveres for å fjerne infeksjonen. Etter induisert aktivering av κ B-gener i cellen blir aktiviteten til NF- κ B vanligvis naturlig nedregulert av proteinfamilien I κ B, som blant annet dannes ved negativ feedback av κ B-genene (se punkt 1.3.2.). Immunsystemet kan derimot gi en sterkere og lenger respons enn hva som er nødvendig for å bekjempe infeksjonen. Differansen mellom kroppens immunrespons og den immunresponsen kroppen trenger er ønsket å gjøres så liten som mulig. Ved kronisk inflammasjon er det også av interesse å dempe induert aktivering, for å hindre utvikling av blant annet kreft og hjerte-karsykdommer som følge av kronisk inflammasjon. Stoffer som har en dempende effekt på NF- κ B-aktivitet er i denne forbindelse interessante. Det er derimot viktig å ikke hemme reaksjonen for mye, da immunresponsen er en viktig del av bekjempelse av infeksjonen. Flere legemidler inneholder virkestoffer som inhiberer induert aktivering, blant annet aspirin og ibuprofen (Kopp & Ghosh 1994). Inhiberingen kan foregå ved de fleste stegene i NF- κ B-signalveien, men skjer hovedsakelig ved å hindre aktivering av IKK og ved å hindre binding av NF- κ B til DNA (Gilmore & Herscovitch 2006a). Stoffer som er vist å ha en dempende effekt på forhøyet NF- κ B-aktivitet er for eksempel antocyaniner og quercetin som det er mye av i bær (Karlsen et al. 2007; Ruiz et al. 2007), [6]-gingerol som finnes i ingefær (Kim et al. 2005) og kurkumin som finnes i roten til gurkemeie (Young-Joon 2003).

Ekstrakter av ulike matvarer har vist en dobbel effekt ved å både oppregulere basal NF- κ B-aktivitet, og å dempe en LPS-indusert NF- κ B-aktivitet (Paur et al. 2008). Blant befolkningen generelt er dette en interessant egenskap, da denne kombinasjonen vil virke forebyggende på sykdomsutvikling. Det er interessant å se om svarthyll har disse egenskapene, da det er gjort lite uavhengig forskning på dette området.

Måling av NF- κ B-aktivitet

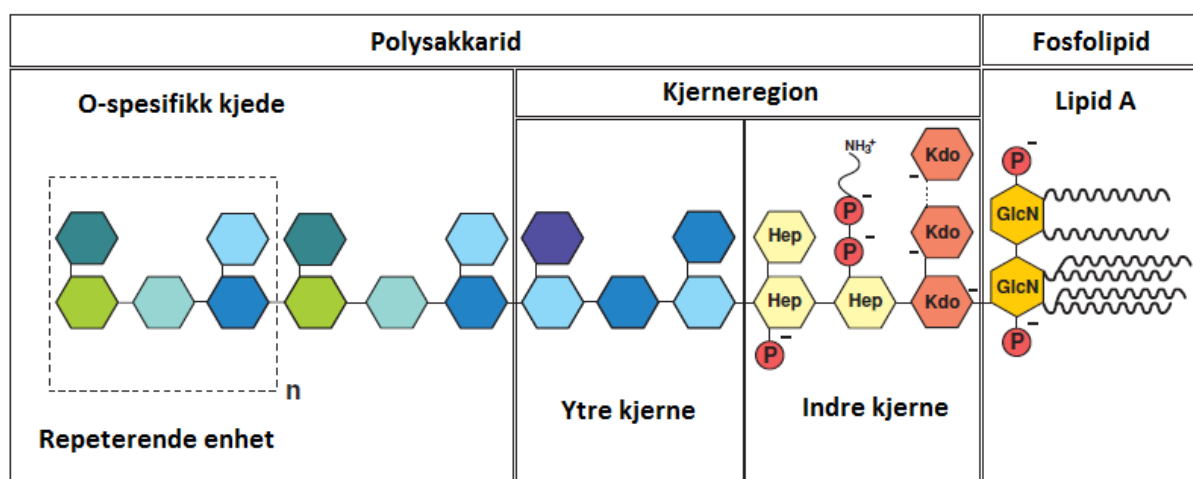
Siden NF- κ B styrer mange gener som har med immunsystemet å gjøre er måling av endring i NF- κ B-aktivitet godt egnet for å si noe om immunologisk effekt. Både *in vitro*- og *in vivo*- modeller finnes for måling av NF- κ B-aktivitet. Måling av binding av RelA (p65) til DNA kan gjøres ved bruk av enzymkoblet immunosorbent assay (ELISA)-baserte metoder som benytter dobbelltrådede oligonukleotider med bindeseter for NF- κ B, som igjen kan detekteres med antistoff mot aktivert RelA (Austena et al. 2004). Western blotting kan benyttes til å detektere konsentrasjon av aktivert RelA ved å bestemme konsentrasjon av RelA i kjernen i forhold til konsentrasjonen i cytoplasma (FIVEphoton Biochemicals 2015), og real-time revers transkriptase PCR (RT-qPCR) kan benyttes for å bestemme innholdet av I κ B- α mRNA (Bottero et al. 2003) eller mRNA til ulike målgener for NF- κ B, som for eksempel IL-1 β og TNF- α (Giulietti et al. 2001).

Blomhoff sitt forskerteam ved Universitetet i Oslo (UiO) har utviklet en *in vitro* cellemodell med en monocytisk kreftcellelinje som er stabilt transfektert med et luciferase-gen med tre NF- κ B-bindingsseter (U937 3 κ B-LUC), i tillegg til en *in vivo* dyremodell med transgene mus med samme gen (Carlsen et al. 2002). I denne oppgaven er cellemodellen benyttet. *In vitro*-modellen er vist å ha god korrelasjon med resultater fra *in vivo*-modellen (Paur et al. 2010).

1.3.4. Lipopolysakkarider (LPS)

Immunsystemet reagerer på ulike strukturer som er spesifikke for bakterier. Dette er blant annet teichoinsyrer i yttermembranen til gram-positive bakterier, og lipopolysakkarider (LPS) i yttermembranen til gram-negative bakterier (med unntak av slekten *Sphingomonas*) (Lodish et al. 2000). *Escherichia coli* (*E.coli*) og *Vibrio cholera* er eksempler på bakterier med LPS i sin yttermembran. LPS utgjør over 75 % av bakteriens overflate, og beskytter bakterien mot eksternt stress, for eksempel antibiotika (Alexander & Rietschel 2001). Muterte bakterier som ikke kan syntetisere LPS er ikke levedyktige, noe som viser hvor viktig LPS er for bakteriene (Rietschel et al. 1994).

LPS består av et lipiddomene som ankrer molekylet i den ytre delen av den ytre membran til bakterien (Lipid A), og en polysakkarid-del som deles inn i indre kjerne, ytre kjerne og O-antigen (Figur 1.5.). O-antigenet varierer i lengde, og er spesifikt for hver bakterie. Det kan også variere innenfor samme stamme, og kan benyttes til å bestemme serotype av ulike stammer (Wang & Reeves 1998). Det er Lipid A som setter i gang den immunologiske reaksjonen. LPS sitter fast til bakterier, men mange av disse blir også revet løs, blant annet under celledelingen.



Figur 1.5.: Oppbygning av LPS. Fosfolipid-delen sitter ankret i bakteriens membran. Kdo, 3-deoksy- α -D-mannoctulosonisk syre; Hep, Heptulose (ketoheptose); GlcN, Glukosamin. Figuren er modifisert og hentet fra (Alexander & Rietschel 2001).

LPS-bindende protein (LBP) sirkulerer i blodbanen og den ekstracellulære væsken, og binder lipid A-delen til LPS og frakter det til immunceller, deriblant monocytter og fagocytter. Disse har CD14-proteiner på overflaten som binder til LPS, og dette komplekset binder deretter til toll-liknende reseptor-4 (TLR-4)/MD-2-komplekset, som initierer immunrespons i cellen (Murphy 2011). Et av proteinene som aktiveres er NF- κ B, og dermed NF- κ B sine målgener.

LPS i immunologiske tester

Siden LPS er bakteriefragmenter kan de finnes over alt der det ikke er sterilt. Monocytter, og spesielt makrofager, er svært sensitive for LPS. *In vitro*-forsøk viser at monocytter kan respondere på mengder ned mot 10 ng LPS /mL cellemedium (Hartmann & Krieg 1999). I monocytiske U937-3 \times κ B-LUC-celler benyttet i denne oppgaven er det vist at NF- κ B-aktiviteten 20-dobles ved stimulering med 100 ng LPS/mL cellemedium (Paur et al. 2008). Det er derfor viktig å ha kontroll på LPS-innholdet i prøver som testes i *in-vitro*-forsøk på slike cellelinjer for å ikke feiltolke resultatene.

LPS kan finnes naturlig i prøvene, eller de kan kontamineres fra omgivelsene. LPS fjernes ikke ved vanlig autoklaving (121°C i 20 minutter), da de er varmeresistente (Ryan 2008). For å hindre kontaminering kan glassmaterialer autoklaveres ved 200 °C i fire timer, og plastikkmaterialer kan ligge i 1 M løsning med lut (NaOH) i 6-12 timer før det skylles godt med endotoksinfritt vann (Hyglos GmbH 2013). Mange materialer kan også kjøpes endotoksinfritt fra leverandør. LPS kan hemmes direkte i prøven ved å tilsette antibiotikumet Polymyxin-B som blokkerer lipid A-delen slik at den ikke kan interagere med LBP (Cardoso et al. 2007), eller redusere innholdet av LPS i prøven ved at de sterilfiltreres (Swadner et al. 1977). Måling av innhold av LPS i prøven kan blant annet gjøres ved en metode som bygger på LAL-testen (Limulus Amebocyte Lysat). Den baserer seg på et protein som finnes i blodet til hesteko-krabber (*Limulus polyphemus*), kalt faktor C, som fører til koagulering når det kommer i kontakt med LPS (omtalt i punkt 3.3.3).

1.4. Helseeffekter av svarthyllbær

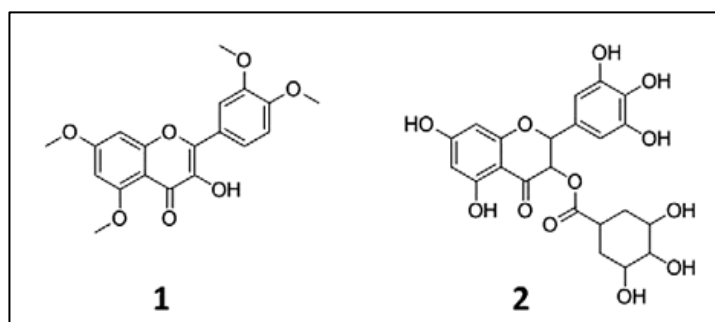
Nyere forskning viser at bær, deriblant svarthyll, gir en rekke positive helseeffekter, og det er hovedsakelig polyfenolene som bidrar til dette.

Antiviral og antibakterial effekt

Svarthyllbær har vist å ha en antiviral og antibakterial effekt. Krawitz *et al.* viste en hemmende effekt av svarthyllekstrakt på influensavirus A og B på agarskåler (Krawitz *et al.* 2011), og Roschek *et al.* identifiserte strukturen til de to mest potente anti-virus flavonoidene som finnes i svarthyllbær (Figur 1.6.), og viste at disse binder til selve virusene og hindrer dem i å entre cellene *in vitro* (Roschek *et al.* 2009).

Flere humane *in vivo*- studier viser også at inntak av svarthyllekstrakt kan forkorte sykdomsforløpet ved forkjølelse og influensa, og dempe symptomene underveis (Kong 2009; Zakay-Rones *et al.* 2004). Svarthyllekstrakt har også vist å være en potensiell hemmer av antibiotika-resistent *Staphylococcus aureus*, noe Hearst *et al.* har vist ved å inkubere ekstraktet sammen med bakterien på agarskåler (Hearst *et al.* 2010).

Helsekostproduktet Sambucol (består av 38 % svarthyllekstrakt, glukose, bringebærekstrakt, sitronsyre og honning) har vist å stimulere produksjonen til de pro-inflammatorisk cytokinene IL- 1 β , IL-6, IL-8 og TNF- α , i tillegg til det anti-inflammatoriske cytokinet IL-10 i friske monocytiske celler (Birkenfeld & Halperin 2002). En annen studie med sjimpanser i en dyrehage fant at i løpet av en influensasesonng hadde sjimpanser som hadde fått Sambucol jevnlig gjennom sesongen tre ganger mindre sannsynlighet for å bli syke (Burge *et al.* 1999). Sjimpanser som fikk økt dose Sambucol etter forkjølelsesliknende symptomer ble også raskere friske enn sjimpanser som ikke fikk dette.



Figur 1.6.: Strukturen til de to flavonoidene med mest potensiell anti-viruseffekt i svarthyllbær identifisert av Roschek *et al.*. (1) = 5,7,3',4'-tetra-O-metylquercetin. (2) = 5,7-dihydroksy-4-oxo-2-(3,4,5-trihydroksyfenyl)chroman-3-yl-3,4,5-tri-hydroksy-syklohexan-karboksylat. Figuren er hentet fra (Roschek *et al.* 2009).

Kreft

Et av de få forsøkene gjort på svarthylls effekt mot kreft viser at svarthyllekstrakt har en hemmende effekt på utvikling av kreft *in vitro* ved å hemme gener (PTGS2) som er essensielle i både start- og utviklingsfasen av kreft (Thole et al. 2006). Et annet forsøk viser en hemmende effekt av ulike svarthyllekstrakter på kreftsvulster ved bruk av «Potato disc tumor assay» (Karakas et al. 2012). Det er gjort flere studier på andre typer bær på ulike typer kreftcellerlinjer, med resultater som viser en anti-proliferativ og apoptosestimulerende effekt (Seeram et al. 2006; Yi et al. 2005).

Diabetes og overvekt

Svarthyll viser også å ha en positiv effekt mot diabetes. I et forsøk av Ciocoiu *et al.* ble det vist at svarthyllekstrakt nedregulerte IL-1 β i rotter med diabetes, i tillegg til å øke aktiviteten til enzymer med antioksidative egenskaper slik at det forhøyede oksidative stresset sett under diabetes ble redusert (Ciocoiu et al. 2012a). Samme forsøk viste også en nedgang i hyperglykemi hos rotter med diabetes. Et annet forsøk med mus viser at cyanidin-3-glukosid, som det er mye av i svarthyllbær, reduserer glukoseinnholdet i blodet og øker sensitiviteten for insulin, noe som har en beskyttende effekt på utviklingen av diabetes type 2 og overvekt (Sasaki et al. 2007). En annen studie har også vist at antocyaniner, deriblant cyanidin-3-glukosid, har en forebyggende effekt på overvekt både *in vitro* og *in vivo* (mus) (Tsuda 2008).

Hjerte- og karsykdommer

Svarthyllekstrakt har vist seg å ha en positiv effekt på hjerte- og karsykdommer, blant annet ved å senke høyt blodtrykk og å øke aktiviteten til antioksidanter i blodet til rotter (Ciocoiu et al. 2010; Ciocoiu et al. 2012b). Andre bær med høyt polyfenolinnhold har også blitt observert å øke det gode høy-tetthet lipoproteinet (HDL) i blodet, og senke både glukose- og kolesterolnivåene i blodet, noe som gir en forebyggende effekt på utvikling av hjerte-karsykdommer (Basu et al. 2010). En studie med frysetørkede jordbær viste en nedgang i konsentrasjon av det skadelige lav-tetthet lipoproteinet (LDL) i blodet, som er forbundet med høyere risiko for å utvikle hjerte-kar-sykdommer (Basu et al. 2009).

UV-stråling

Antocyaniner har en potensiell effekt på beskyttelse mot UV-stråling. Cimino *et al.* viste i sin studie at hudceller som ble pre-inkubert med små mengder cyanidin-3-glukosid beskyttet hudcellene mot skade av UVB-stråler (Cimino et al. 2006). Beskyttelsen oppnås hovedsakelig ved at antocyaninene hindrer aktivering av NF- κ B, demper overproduert IL-8 og hindrer igangsetting av apoptose. En annen studie har funnet at cyanidin-3-glukosid virker beskyttende mot UVA-stråler på hudceller ved å hindre oksidering og initiering av apoptose (Tarozzi et al. 2005).

1.5. Effekt av prosessering

Svarthyllbær brukes blant annet som saft, juice, syltetøy og konsentrater. Viktige parametere for produsentene ved produksjon av svarthyllsaft er blant annet høyt saftutbytte, lav turbiditet, samt lav oksideringsgrad og høyt utbytte av helsebringende stoffer som blant annet polyfenoler. Ulike sorter gir ulikt saftutbytte på grunn av forskjellig størrelse på bærenes frø og ulik sammensetning av innholdsstoffer (Lee & Finn 2007). I motsetning til *Sambucus nigra* inneholder *Sambucus canadensis* acylerte antocyaniner, og denne sorten gir produkter med sterkere farge (Lee & Finn 2007). Antocyaniner degraderes blant annet ved at klorogensyre blir oksidert til klorogenquinon av det endogene enzymet polyfenoloksidase, og klorogenquinon reagerer med antocyaninene (Patras et al. 2010). Oksidering gir produktet en brun farge. Siden prosessering kan endre kvaliteten til polyfenolene i bær kan bioaktiviteten, og dermed den immunologiske effekten, påvirkes. Prosesseringsmetoder som bevarer så mye som mulig av de opprinnelige komponentene i bærene er derfor av høy interesse.

1.5.1. Optimalisering

Lavt utbytte av polyfenoler i presset saft er vanlig, da mye av disse sitter igjen i pressresten (Brownmiller et al. 2008; Skrede et al. 2000). Ulike metoder for å optimalisere utbyttet er derfor under stadig utvikling. Bruk av pektinaser løser opp celleveggen til planteceller og øker frigjøring av polyfenoler, i tillegg til å øke saftutbyttet og gi lavere turbiditet (Landbo et al. 2007). Selv om antocyaniner påvirkes negativt av økende temperatur (Patras et al. 2010), har kortere oppvarming ved høy temperatur vist seg å ha positiv effekt på bevaring av antocyanininnholdet under pressing (Brownmiller et al. 2008; Rossi et al. 2003). Kort forvelling med damp («steam blanching») kan inaktivere polyfenoloksidase, og dermed redusere degradering av antocyaniner og andre polyfenoler. Pasteurisering har også vist å ha positiv innvirkning på utbyttet av polyfenoler (Skrede et al. 2000). Kort oppvarming før pressing løser i tillegg opp cellemembranen og vil gi liknende effekt som pektinaser.

Mange svarthyllprodukter selges som helsekostprodukter i form av konsentrater. Konsentrering ved så lav temperatur som mulig er viktig for å redusere nedbrytning av innholdsstoffer. For å oppnå effektiv konsentrering ved lav temperatur kan avdampning ved redusert trykk benyttes.

2 MÅL MED OPPGAVEN

Denne oppgaven er med i et brukerstyrt prosjekt finansiert av Forskningsrådet (225170) med Lerum AS som prosjekteier. Hovedmålet med prosjektet er å utvikle innovative bærprodukter fra norskdyrket svarthyll. I denne oppgaven var det av interesse å teste bærenes immunologiske effekt *in vitro* og bestemme innhold av stoffer med mulig helseeffekt for å utvikle kvalitetsprodukter med helseprofil til forbruker. I tillegg var det interessant å se om det var forskjell mellom ulike svarthyllsorter, med tanke på valg av sorter for prosessering. Det finnes noe forskning på svarthylls immunologiske effekt og innholdsstoffer, men svært lite er gjort på de nordiske sortene som er med i dette prosjektet. For å få bedre forståelse av hvilke stoffer i svarthyllbær som påvirker NF- κ B-aktiviteten ble ulike fraksjoner av saft og isolerte stoffer også testet.

Hovedmål:

- Bestemme effekt på NF- κ B-aktivitet av saft og ekstrakt av seks ulike sorter svarthyllbær
- Bestemme effekt på NF- κ B-aktivitet av ulikt prosesserte safter
- Få bedre forståelse for hvilke stoffer i svarthyll som modulerer NF- κ B-aktivitet, med hovedfokus på polyfenoler

3 MATERIALER

3.1. Kjemikalier og reagenser

Kjemikalie/reagens	Produsent
Acetonitril	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Cyanidin-3-glukosid	Polyphenols Laboratories. Sandnes, Norge
DMSO	Sigma Aldrich. MO, USA
Eplesyre	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Etylacetat	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Folin-Ciocalteaus Reagens (FC-reagens)	Sigma-Aldrich. MO, USA
Fosfatbufferet salin (PBS)	Life Technologies. NY, USA
Fruktose	Chem Service. PA, USA
Føtalt bovint serum (FBS)	Life Technologies. NY, USA
Gallesyre	Sigma-Aldrich. MO, USA
Glukose	Chem Service. PA, USA
Hydrogenklorid	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Hygromycin-B	Sigma-Aldrich. MO, USA
Klorogensyre	Sigma-Aldrich. MO, USA
L-glutamin	Life Technologies. NY, USA
Lipopolysakkarid (LPS) O55:B5 (fra <i>Escherichia coli</i>)	Sigma-Aldrich. MO, USA
Maursyre	Sigma-Aldrich. MO, USA
Metanol	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Natriumkarbonat	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland
Nitrogengass	AGA AS. Leirdal, Norge
Penicillin	Life Technologies. NY, USA
RPMI-1640	Life Technologies. NY, USA
Rutin	Sigma-Aldrich. MO, USA
Sitronsyre	Merck KGAA. Darmstadt, Tyskland

Streptomycin	Life Technologies. NY, USA
Svovelsyre (H ₂ SO ₄)	Merck KGaA, Dramstadt, Tyskland
Trypanblått	Invitrogen. Oregon, USA.

3.2 Utstyr og instrumenter

Utstyr/instrument	Produsent
96-brønnersplater, hvite, med lokk	Thermo Scientific. Roskilde, Danmark
C-18 SepPak-kolonne	Waters Corporation. MA, USA
Cellekulturflasker 25 cm ³ , 75 cm ³ , 225 cm ³	Thermo Scientific. Roskilde, Danmark
Celletellerchip (Countess™)	Invitrogen. Oregon, USA.
Celleteller (Countess® Automated Cell Counter)	Invitrogen. Oregon, USA.
Diode Array Detector (DAD), Agilent 1100	Agilent Technologies. Waldbronn, Tyskland
Eppendorfrør, 1,5 mL	VWR. USA
Foodprosessor (CombiMax 700)	Braun GmbH. Kronberg, Tyskland.
Forkolonne, SecurityGuard Cartridge Carbo-H ⁺	Phenomenex. CA, USA
Fluorometer, FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH. Offenberg, Tyskland
Luminometer, Glomax96 Microplate	Promega. WI, USA
Homogenisator, Polytron PT310	Kinematica. Lucerne, Sveits
HPLC-system, Agilent 1100 series	Agilent Technologies. Waldbronn, Tyskland
HPLC-kolonne, Rezex ROA-Organic Acid H ⁺ (8 %)	Phenomenex. CA, USA
HPLC-kolonne, Synergi MAX RP C12	Phenomenex. CA, USA
Hydropresse	Vigo LTD. England
Kombidamper	Electrolux. Sverige
Membranfilter, Millex HA 0,45 µm	Millipore Corp. MA, USA
Refraktometer (RE40)	Mettler Toledo. Greifensee, Sveits
RI-detektor (RI 132)	Gilson Inc. Villiers-Le-Bel, Frankrike
Rotavapor	BÜCHI. Sveits

Sentrifuge, stor (Heraus Multifuge 4KR)	Kendro Laboratory Products GmbH. Hanau, Tyskland
Sentrifuge, liten (Herarus Biofuge Fresco)	Kendro Laboratory Products GmbH. Hanau, Tyskland
Sentrifugerør, 15 mL, 50 mL	VWR. USA
Spektrofotometer, Aligent 8453	Aligent Technologies. Waldbronn, Tyskland
Sterilfilter (Amicon [®] Ultra 0,5 mL 10K)	Millipore. Cork, Irland
Varmeblokk (Techne Dri-Block [®] (DB-3D))	Barloworld scientific, Staffordshire, UK
Vekt (finvekt)	Mettler Toledo. Greifensee, Sveits
Vekt (grovvekt)	Sartorius BMBH. Tyskland

3.3 Kit

Kit	Produsent
EndoZyme [®]	Hyglos GmbH. Tyskland
Bright-Glo [™] Luciferase Assay	Promega. WI, USA
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega. WI, USA

3.4. Cellelinjer

Cellelinje	Produsent
U937 3xkB-LUC (monocytt)	ATCC, Manassas, VA, USA. Transfektet av Rune Blomhoff, UiO.

3.5. Programvarer

Programvare	Produsent
Aligent ChemStation Chromatography	Aligent Technologies. Waldbronn, Tyskland
Bright-Glo	Promega. WI, USA
FLUOstar OPTIMA Software V.1.32	BGM Labtech. Offenberg, Tyskland
General purpose Aligent ChemStation UV-spectroscopy	Aligent Technologies. Waldbronn, Tyskland

3.6. Bær

Seks ulike sorter av svarthyll (*Sambucus nigra*) (Samidan, Samyl, Samidal, Sambu, Samnor og Sampo) var dyrket ved Njøs Næringsutvikling i Leikanger i Sogn og Fjordane (Tabell 2.1.). Sambu, Samnor og Sampo var også dyrket ved Skott Gård i Buskerud, mens sorten Sampo i tillegg var dyrket på Hatleli Gård i Fresvik i Sogn og Fjordane. Bærene var fra 2014, i tillegg til 2013 fra Leikanger. Dette utvalget ga grunnlag for sammenlikning mellom ulike sorter, ulike år samt forskjellige dyrkningssteder. Prøver fra Eiker er merket med E., og prøver fra Fresvik er merket med F. Prøver uten merking er fra Leikanger.

Tabell 2.1.: Oversikt over de ulike sortene svarthyllbær som er analysert i denne oppgaven, og hvor de er høstet.

	Njøs Næringsutvikling, Leikanger, Sogn og Fjordane	Njøs Næringsutvikling, Leikanger, Sogn og Fjordane	Skott Gård, Eiker i Buskerud	Hatleli Gård, Fresvik, Sogn og Fjordane
Høsteår	2013	2014	2014	2014
Samidan	X	X		
Samyl	X	X		
Samidal	X	X		
Sampo	X	X	X	X
Sambu	X	X	X	
Samnor	X	X	X	
Frøy				X

Modne bær ble høstet i september ved å klippe av klasene. De ble fraktet til Nofima i frysetransport, og oppbevart ved -20°C frem til preparering.

4 METODER

4.1. Tilberedning av prøver

En prøve defineres i denne oppgaven som det opparbeidede produktet (eksempel saft, ekstrakt og fraksjoner er ulike prøver).

4.1.1. Ekstrakt

Metanolekstrakter ble laget for å ekstrahere ut en større andel av de antatte virkestoffene. Ved å benytte ekstraksjonsmidler med ulik polaritet eller løselighet kan et større utbytte av enkelte stoffer i en matriks trekkes ut. Som en hovedregel løser polare løsningsmidler polare stoffer, mens upolare løsningsmidler løser upolare stoffer. Metanol er svakt amfipatisk, og vil dermed løse polyfenoler bedre enn vann (Boeing et al. 2014; Sineiro et al. 2008).

Praktisk utførelse

Frosne bær ble rensed og homogenisert i foodprosessor i ca. 5 sekunder. Bærmasse (10 gram) ble overført til sentrifugerør, tilsatt 20 mL kald metanol og homogenisert i 30 sekunder ved bruk av Polytron PT310 homogenisator. Blandingen ble deretter sentrifugert ved 39.000 x g og 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble overført til 50 mL målekolbe. Pelleten ble resuspendert i 20 mL 70 % (v/v) metanol i vann, før den igjen ble sentrifugert under samme betingelser som tidligere. Supernatanten ble overført til målekolben, og det ble etterfylt med 70 % (v/v) metanol i vann opp til 50 mL. For ekstraktene som skulle testes på celler ble metanolen dampet av under nitrogen-gass på 37°C varmeblokk til en tyktflytende væske, før den ble resuspendert i 2 mL fosfatbufferet salin (PBS). Prøvene ble oppbevart i eppendorfrør ved -20°C. Konsentrasjonen av ekstraktene var dermed 0,2 g bær/mL ekstrakt.

4.1.2. Saft

I denne oppgaven omtales råsaft som saft. Saft ble laget som et mer reelt produkt for forbruker. Modellsaften i denne oppgaven ble laget ved sentrifugering i laboratoriet. Saft er et vanlig produkt av svarthyllbær. På grunn av små kvantum ble saften laget ved sentrifugering.

Praktisk utførelse

Frosne bær ble rensed og homogenisert i foodprosessor ca. 5 sekunder. Bærmassen (10 eller 20 gram) ble sentrifugert ved 39.000 x g og 9 °C i ti minutter. Prøvene ble oppbevart på is hele tiden for å hindre degradering av innholdsstoffer. Supernatanten ble alikvotert i eppendorfrør, og oppbevart ved -20°C. Det ble antatt at 1 mL saft tilsvarer 1 gram saft.

Sterilfiltrering av saft

Sterilfiltrering av prøver kan utføres når immunologisk effekt på basalnivå skal måles, da kun små mengder LPS kan gi signifikant utslag fra kontroll (Paur et al. 2008; Rieder et al. 2013). Utvalgte safter ble filtrert i et forsøk på å fjerne LPS.

Praktisk utførelse

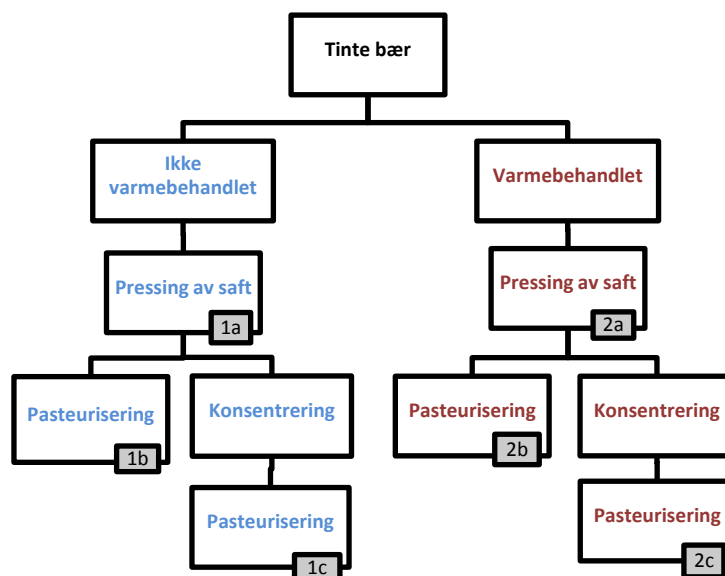
Saft ble tilsatt et 2 mL eppendorfrør med et 10.000 Da filterinnsats, og sentrifugert i 3 minutter ved 13.000 rpm. Supernatanten ble fryst ned i eppendorfrør ved -20°C.

4.1.3. Prosessering

For å etterlikne industriell produksjon av saft ble et prosesseringsforsøk utført. Bearbeidelse av bær kan føre til tap av innholdsstoffer, spesielt antocyaniner og andre polyfenoler (Skrede et al. 2000). Varmebehandling, pasteurisering og konsentrering ble utført for å måle effekten av dette, både med tanke på NF-κB-aktivitet og innhold av polyfenoler og antocyaniner.

Praktisk utførelse

Figur 5.1. viser en skjematisk oversikt over utførelsen, samt hvor prøvene ble tatt ut. Bær (8,6 kg) ble tint på kjølerom i 22 timer og deretter ved romtemperatur i ca. 18 timer. Halvparten av bærene ble varmebehandlet i en Electrolux kombidamper i 90 minutter opp til 80°C, og avkjølt til 40°C i et kjølerom før de ble presset i en hydropresse. Den andre halvparten ble presset direkte etter tining. Saftene ble deretter filtrert gjennom et dørslag før den ene halvparten ble konsentrert ved 40°C i rotavapor til °Brix-verdi på ca. 25 (ca. dobbel styrke), og deretter pasteurisert ved oppvarming opp til 85°C. Den andre halvparten ble pasteurisert direkte etter pressing. Prøvene ble overført til eppendorfrør og fryst ned ved -20°C like etter pressing.



Figur 5.1: Oversikt over prosesseringsgangen. De ulike uttakene som ble benyttet videre er merket nederst i høyre hjørnet. Uttaket ble tatt etter nevnt aktivitet. Merkingen er lik den som vises i resultatene.

Det kommersielle helsekostproduktet Frøy som ble fremstilt på gården Hatleli i Fresvik i Sogn ble også analysert. Frøy er fremstilt fra økologisk dyrkede svarthyllbær, kaldpresset og vakuuminndampet til ¼ volum.

4.1.4. Fraksjonering ved bruk av fast-fase-ekstraksjon (SPE)

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) er en metode for å skille ulike stoffer i en matriks. Siden det var av interesse å undersøke hvilke stoffer i svarthyll som gir en immunologisk effekt var det ønskelig å skille antocyaniner fra de andre polyfenolene, samt sukkere og organiske syrer. Dermed kunne de ulike fraksjonene bli testet hver for seg.

For fraksjoneringen ble det benyttet en C18 – SepPak-kolonne og ulike løsningsmidler. C18-kolonnen er sterkt hydrofob, og polyfenolene vil adsorbere til kolonnen frem til et løsningsmiddel med sterkere affinitet til polyfenolene eluerer de ut. Prekondisjonering av kolonnen gjøres for å aktivere adsorbenten slik at interaksjonen mellom adsorbent og prøve optimaliseres. pH holdes lav ved å tilsette hydrogenklorid (HCl) i løsningene, slik at likevekten mellom antocyaninene holder seg mot det fargede flavylium-kationet (ved pH under 3).

Praktisk utførelse

Metoden er basert på en prosedyre beskrevet av Skrede *et al.* (Skrede et al. 2000). Polyfenoler, antocyaniner, sukkere og syrer ble i fire utvalgte safter isolert ved fraksjonering ved bruk av SPE. Kolonnen ble prekondisjonert med 5 mL etylacetat, 5 mL sur metanol (0,01N HCl) og 5 mL surt vann (0,01 N HCl). Elueringshastigheten var ca. 5 mL/minutt for alle elueringer. 2 mL saft ble tilsatt kolonnen. Først ble vannløselige innholdsstoffer, som sukkere og syrer, eluert ut med 5 mL surt vann (0,01N HCl). Kolonnen ble tørket med nitrogengass i ca. 10 minutter, før 5 mL etylacetat ble tilsatt for å eluere de mindre vannløselige polyfenolene. 10 mL sur metanol ble deretter tilsatt for å eluere de mer vannløselige polyfenolene, hovedsakelig antocyaniner. Polyfenol- og antocyaninfraksjonene ble dampet inn til en viskøs væske, før de ble løst i 2 mL PBS. 1 mL fraksjon tilsvarer ca. 1 mL saft.

4.2. Celleforsøk

Celleforsøkene ble utført på den monocytiske cellelinjen U937 3xκB-LUC (generøs gave fra Rune Blomhoff, UiO). Dette er U937-celler (opphav fra American Type Culture Collection) som er stabilt transfektert med et luciferase-gen med tre NF-κB-bindingssteder (Carlsen et al. 2002). Luciferase-genet transkriberes samtidig som NF-κB-genet, og mengde luciferase produsert er dermed proporsjonal til NF-κB-aktiviteten. Det er i tillegg satt inn et plasmid med genet *hygromycin-B-phosphotransferase (HPH)*, som er resistent mot hygromycin (Carlsen et al. 2002). Cellemediet tilsettes antibiotikumet Hygromycin-B, og dermed blir celler som er transfektert med *HPH* (og *3xκB-LUC*-genet) selektert i forhold til celler uten *HPH*.

Cellene ble dyrket i cellekulturflasker med RPMI-1640-medium som inneholdt 10 % føtalt bovint serum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 50 U/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin og 75 µg/mL hygromycin-B. De ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO₂, og splittet tre ganger i uken da konsentrasjonen var mellom 6×10⁵ og 8×10⁵ celler/mL.

4.2.1. Fortynning av prøver

Saftprøvene, fraksjonene og prosesseringsprøvene ble fortynnet til ulike konsentrasjoner som tilsvarte mellom 2,5 og 20 g saft / mL cellemedium.

Ekstraktene ble fortynnet til ulike konsentrasjoner tilsvarende mellom 2,5 og 10 g bær/mL cellemedium.

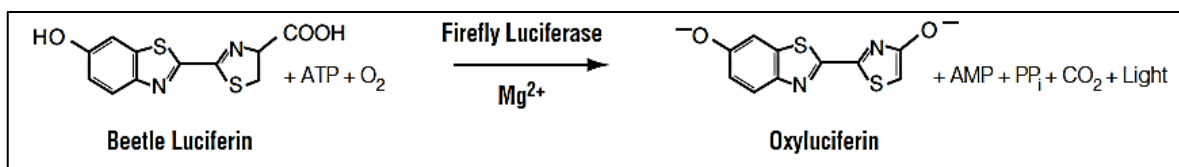
Ved tillaging av løsninger for å teste isolerte innholdsstoffers effekt på NF-κB-aktivitet ble det tatt utgangspunkt i hvor mye som var forventet å finne av det respektive stoffet i saft, ved å se på analyseresultater fra HPLC. Stoffene ble løst i PBS, bortsett fra den mindre polare rutin som ble løst i dimetylsulfoksid (DMSO). En kontroll med høyeste konsentrasjon av DMSO (0,1 %) ble tilsatt cellene parallelt med forsøket, da DMSO kan være toksisk for cellene. Løsningene ble oppbevart ved -20 °C.

4.2.2. Måling av NF-κB-aktivitet

NF-κB har en sentral rolle i aktivering av gener som styrer immunresponsen i cellene. Endring i NF-κB-aktivitet er derfor et godt mål på hvorvidt et stoff har immunologisk effekt eller ikke.

Bioluminescense er lys som produseres av blant annet ildfluer (*Lampyridae*) og biller av arten Smellere (*Elateridae*). Lyset produseres ved at enzymet luciferase katalyserer omdannelsen av D-Luciferin til oxyluciferin. Prinsippet er mye brukt i biokjemiske analyser, blant annet til studering av genekspresjon.

Bright-Glo™ Luciferase Assay System ble benyttet for å måle mengde luciferase som ble produsert. Reagenset som tilsettes cellene inneholder blant annet D-Luciferin fra bille (Beetle Luciferin). D-Luciferin fungerer som et substrat for enzymet luciferase som produseres ved aktivering av NF-κB. Reaksjonen benytter luciferase, magnesium (Mg²⁺), adenosin trifosfat (ATP) og O₂ til å konvertere D-Luciferin til oksyluciferin, via en ustabil dioksetan-struktur (Figur 4.2., dioksetan-strukturen er ikke vist). Dette fører til emisjon av lys ved 560 nm, som kan måles ved bruk av et luminometer.



Figur 4.2.: Reaksjonen benytter Firefly Luciferase, Mg²⁺, ATP og O₂ til å konvertere D-Luciferin (Beetle Luciferin) til oksyluciferin (Promega Corporation 2011).

Praktisk utførelse

Dagen før et celleforsøk ble cellene splittet til en konsentrasjon på 3×10^5 celler/mL, slik at cellene var i en eksponentiell vekstfase under forsøket. Rett før forsøket ble startet ble cellemedium byttet til RPMI-1640 med 2 % føtalt bovint serum, 2 mM L-Glutamin, 50 U/mL penicillin og 50 µg/mL streptomycin (kalt 2 % RPMI). Det ble sådd ut 100 µL cellemedium/brønn i hvite 96-brønnersplater. Prøvene ble fortynnet i 2 % RPMI, hvor siste fortynning ble gjort direkte i brønnen. PBS ble brukt som fortynningskontroll. Kontroll for basal NF-κB-aktivitet var medium med celler, mens kontroll for LPS-indusert NF-κB-aktivitet var medium med celler tilsatt 1 µg LPS/mL cellemedium. Ved måling av basal NF-κB-aktivitet ble prøven inkubert i cellemediumet i 6,5 timer ved 37°C og 5 % CO₂ før avlesning. Ved måling av LPS-indusert NF-κB-aktivitet ble prøvene inkubert i cellemedium i 30 minutter før tilsetning av LPS. Deretter ble de inkubert videre i 6 timer. Etter endt inkubering ble platen ekvilibret til romtemperatur, før det ble tilsatt 100 µL/brønn Bright-Glo™ Reagens (fra Bright-Glo™ Luciferase Assay kit). Reagenset lyserer cellene, slik at luciferase-enzymet blir frigjort. Beregning av NF-κB-aktivitet ble gjort ved å måle luciferase-aktivitet i brønnene ved bruk av Glomax96 Microplate Luminometer etter produsentens protokoll (Promega Corporation 2011).

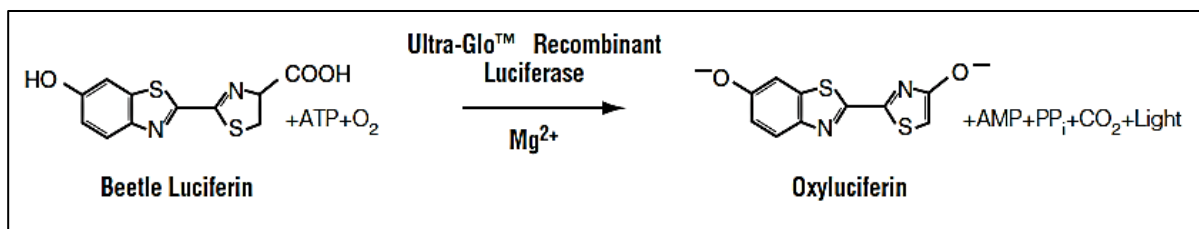
Resultatene ble oppgitt som prosent av kontroll for både basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet. Grunnen til dette er at cellene responderer forskjellig på stimuli avhengig av hvor mange passasjer de er gått. Dermed ble NF-κB-aktivitet i kontroll satt til 100 %, og effekten av prøvene som prosent av dette.

4.2.3. Måling av celleviabilitet

Nedgang i målt NF-κB-aktivitet kan også skyldes at cellene dør på grunn av toksiske nivåer i prøvene som tilsettes. For å være sikker på at nedgang i NF-κB-aktivitet ikke skyldes celledød ble celleviabilitet målt parallelt med NF-κB-aktivitet av høyeste konsentrasjon prøve tilsatt.

CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay

Ved de første eksperimentene ble CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay benyttet. Assayet måler ATP-konsentrasjonen i cellene, som sier noe om antallet metabolsk aktive celler. Assayet baserer seg på samme prinsipp om luminescense-dannelse som Bright-Glo™ Luciferase Assay System. Luciferasen utviklet av Promega® er basert på genet til ildfluen *Photuris pennsylvanica*. Cellulært ATP i reaksjonen er den begrensende faktoren for dannelse av luminescense. Dette gir en lineær sammenheng mellom innhold av ATP og signalet av luminescense. Reaksjonen vises i Figur 4.3.



Figur 4.3.: Reaksjonen benytter Ultra-Glo™ Recombinant Luciferase, Mg²⁺, O₂ og cellulært ATP og til å konvertere D-Luciferin til oksyluciferin (Promega Corporation 2012).

Praktisk utførelse

Behandling av cellene og tilsetning av prøver ble utført likt som ved punkt 4.2.1 frem til endt inkubering. Deretter ble platen ekvibrert til romtemperatur, før det ble tilsatt 100 µL CellTiter-Glo[®] Reagens (fra CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay kit). Reagentet lyserer cellene slik at intracellulært ATP blir frigjort. Platen ble plassert på platerister i 2 minutter, før den ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur. Beregning av celleviabilitet ble gjort ved å måle luciferase-aktivitet i brønnene ved bruk av Glomax96 Microplate Luminometer etter produsentens protokoll (Promega Corporation 2012). Prøvene ble analysert i duplikater.

CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay så ut til å interagere med prøvene. Derfor ble måling av celleviabilitet byttet til bruk av trypanblå og Countess Automated Cell Counter.

Trypanblå celleeksklusjon

Døde celler har en permeabel cellemembran og kan ta opp trypanblå, i motsetning til levende celler som har intakt cellemembran og dermed ikke vil ta opp trypanblå. Ved å se på cellene gjennom et mikroskop eller en celledeller laget for å kunne måle celleviabilitet kan prosent celleviabilitet bestemmes ved å dele antall døde celler (blå celler) på antall levende celler (ufargede celler). Minimum tre replikater ble utført per prøve.

Praktisk utførelse

Behandling av cellene og tilsetning av prøver ble utført likt som ved punkt 4.2.1 frem til endt inkubering. Etter endt inkubering ble 10 µL cellesuspensjon (kontroller og med tilsatt prøve) blandet med 10 µL trypanblå. Deretter ble 10 µL av blandingen tilsatt en celledellerchip, og målt innen tre minutter ved bruk av den automatiske celledelleren Countess[®] Automated Cell Counter, som også måler celleviabilitet.

Alle prøver ble målt minimum tre ganger. Grensen for grad av celledød før prøven måtte ekskluderes fra resultatene ble satt til 10 %. Ingen prøver overskred denne grensen.

4.3. Kjemiske analyser

4.3.1. Bestemmelse av totale fenoliske forbindelser

Analyse av totale fenoliske forbindelser (TP) ble utført ved bruk av den kolorimetrisk metode Folin-Ciocalteaus metode (Kähkönen et al. 1999; Singleton & Rossi 1965; Waterhouse 2001). Folin-Ciocalteaus reagens (FC-reagens) inneholder polymerer av fosfomolybden- og fosfotungstat-ioner som reduseres til molybdenum-tungsten av reduserende forbindelser i prøven (Singleton & Rossi 1965). Redusert molybdenum-tungsten absorberer lys ved 765 nm (blått lys), som kan leses av med et spektrofotometer. For å øke hastigheten til reaksjonen trengs et basisk miljø, noe som oppnås ved å tilsette natriumkarbonat (Na₂CO₃). Standardkurve med gallesyre ble kjørt ved hver analyse, og resultatene oppgis som gallesyreekvivalenter. Metoden er ikke fenolspesifikk, men heller et mål på prøvens totale reduserende evne (antioksidantkapasitet). Prøvene ble analysert i paralleller.

Praktisk utførelse

200 µL av standardløsningene og fortynnete prøver ble tilsatt kyvetter. Deretter ble det tilsatt 1000 µL FC-reagens (10 % v/v), og inkubert i tre minutter. 800 µL Na₂CO₃ ble deretter tilsatt kyvetten, og blandingen ble mikset godt. Etter 30 minutter inkubering ved romtemperatur beskyttet mot lys ble prøvene avlest ved bruk av Aligent 8453 spektrofotometer ved 765 nm og tilhørende programvare General purpose Aligent ChemStation for UV-spektroskopi. Prøvene ble analysert i paralleller, og dH₂O ble benyttet som blank prøve. Resultatene ble uttrykt som mg gallesyre-ekvivalenter (gallic acid equivalents, GAE) per 100 mL saft eller 100 g bær.

4.3.2. Bestemmelse av totale monomere antocyaniner

For å måle innhold av totale monomere antocyaniner (TMA) ble pH-differensial-metoden benyttet, som er beskrevet i AOAC Official Method 2005.02 (Lee 2005).

TMA kan måles ved å utnytte de monomere antocyaninenes strukturendring ved ulik pH. I sure løsninger (pH < 3) vil monomere antocyaniner være i den fargede oksonium-formen, mens de er fargeløse hemiketalen ved høyere pH (pH 4,5) (Figur 4.4.). Dermed vil de absorbere lys ved samme bølgelengde forskjellig (Figur 4.5.). Mengde TMA i prøvene beregnes ved:

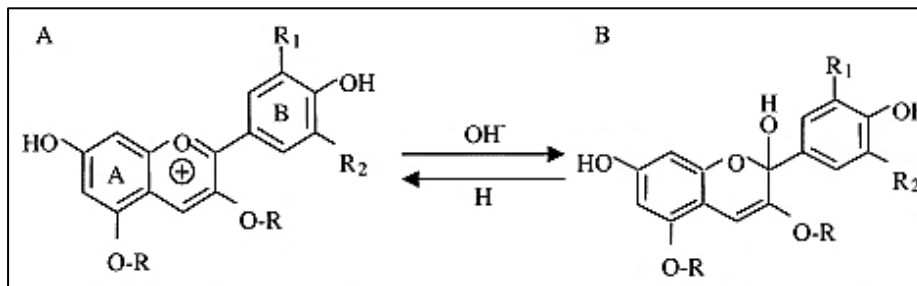
$$\frac{A \cdot MV \cdot FF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l}$$

hvor **A (absorbans)** = (A_{520nm} – A_{700nm}) pH 1,0 – (A_{520nm} – A_{700nm}) pH 4,5; **MV** (molekylvekt) = 449,2 g/mol for cyanidin-3-glukosid; **FF** = fortynningsfaktor; **10³** = konverteringsfaktor fra g til mg; **ε** = 26900 L · mol⁻¹ · cm⁻¹ (den molare ekstinksjonskoeffisienten for cyanidin-3-glukosid); **l** = lysets veilengde (cm).

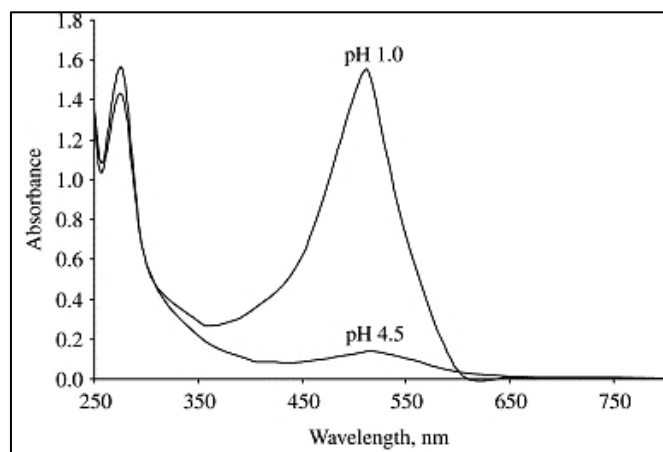
Resultatene beregnes i cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter da metoden er standardisert med dette cyanidinet. Målingen ved 700 nm korrigerer for turbiditet. Prøvene ble analysert i paralleller.

Praktisk utførelse

Prøvene ble fortynnet i buffer med pH 1 (0,025 M kaliumklorid) og buffer med pH 4,5 (0,4 M natriumacetat). Passende fortynning ble bestemt ved å måle prøve fortynnet i buffer med pH 1 ved 520 nm, slik at absorbansen befant seg i det lineære område av spektrofotometeret (mellom 0,2 og 1,0 A). Etter 30 minutter ble prøvene målt ved 520 nm og 700 nm ved bruk av Aligent 8453 spektrofotometer og tilhørende programvare General purpose Aligent ChemStation for UV-spektroskopi. Resultatene ble uttrykt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter (CGE) per 100 g saft eller bær.



Figur 4.4.: Antocyaniner går fra den fargede oksonium-formen (A) ved pH 1 til den fargeløse hemiketal-formen (B) ved pH 4,5. Figuren er hentet fra (Wrolstad et al. 2005).



Figur 4.5.: UV-spekteret til antocyaniner viser at de absorberer lys forskjellig ved pH 1 og pH 4,5. Absorbans er oppgitt på y-aksen og bølglengde (nm) på x-aksen. Figuren er hentet fra (Wrolstad et al. 2005).

4.3.3. Bestemmelse av LPS-innhold

Som nevnt i punkt 1.3.4. fører LPS til aktivering av NF- κ B, og kan dermed påvirke resultatene i immunologiske forsøk. Screening av prøvenes innhold av LPS ble derfor utført.

EndoZyme® recombinant Factor C (rFC) Assay Kit ble benyttet for kvantitativ måling av LPS i prøvene. Metoden bygger på LAL-testen (Limulus Amebocyte Lysate) hvor serin-proteaser i blodet til hestekokrabben (*Limulus polyphemus*) aktiveres av LPS og setter i gang en kaskadereaksjon, som fører til koagulering. Dette hindrer infeksjon hos organismen. Serin-proteasene aktiveres av zymogenet Faktor C, som er nøkkelproteinet i LAL-testen. EndoZyme® bruker syntetisk fremstilt Faktor C (rFC), i kombinasjon med fluorescence-substrat til deteksjon av LPS.

Standardkurve med LPS fra *E.coli* O55:B5 ble målt for kvantifisering av LPS i prøvene. «Spiking» med LPS av de fortynnede prøvene ble utført for å kontrollere om prøvematerialet interfererte med testen, og at fortynningen var korrekt. Prøver med «spike recovery» under 50 % eller over 200 % av tilsatt mengde LPS ble utelatt fra resultatene. Både prøve og «spiket» prøve ble analysert i duplikater.

LPS beregnes ofte i endotoksine enheter (EU), hvor 1 EU tilsvarer mellom 0,1 og 0,2 ng LPS/mL løsning, avhengig av hva slags standard som benyttes (Ryan 2008). Variasjonen i hvor mye 1 EU tilsvarer er fordi LPS varierer i størrelse mellom ulike bakteriestammer. I denne oppgaven ble det satt at 1 EU = 0,15 ng LPS/mL løsning.

Praktisk utførelse

Fullstendig beskrivelse finnes i produsentens protokoll (Hyglos GmbH 2013). Alle kjemikalier og reagenser, samt svart 96-brønners mikrotiterplate fulgte med kittet. Pyrogenfrie materialer ble benyttet under måling av LPS for å minske risikoen for LPS-kontaminering av prøvene. Standarder og prøver ble fortynnet med endotoksinfritt vann. 100 µL ble tilsatt per brønn; paralleller av standardene og fire replikater av de fortynnete prøvene. To av brønnene med de fortynnete prøvene ble «spiket» med 0,5 EU/mL LPS (EU = endotoksin unit). Test-reagens ble laget ved å blande testbuffer, substrat og enzym vedlagt i kittet. 100 µL testreagens ble tilsatt brønnene, og platen ble inkubert ved 37°C. Fluorescense ble målt ved tid 0 og etter 90 minutter ved bruk av FLUOstar OPTIMA Fluorescense-måler etter produsentens protokoll (Hyglos GmbH 2013). Programvaren FLUOstar OPTIMA Software V.1.32 registrerte målingene, og beregningene ble gjort i Microsoft Excel 2010. LPS-innholdet ble uttrykt i ng/mL prøve.

4.3.4. Bestemmelse av sukker/syreinnhold og polyfenoler ved bruk av HPLC

HPLC er en metode for å separere og kvantifisere utvalgte enkeltforbindelser i en matriks. Både saft, ekstrakter, prosesseringsprøver og fraksjoner ble screenet for deres innhold av enkelte sukkerer, syrer og polyfenoler. HPLC-systemet benyttet var et Agilent 1100 serie HPLC-system med kvarternærpumpe, inline degasser, automatisk prøvetaker og kolonneovn. Programvaren ChemStation chromatography ble brukt for å styre systemet og analysere data. Systemet var koblet opp mot en Agilent 1100 DAD (diode array detector) og en Gilson refraksjonsindeks (RI 132) – detektor. Ulike kolonner, elueringsmidler og betingelser ble benyttet avhengig om det var sukkerer og syrer eller polyfenoler som ble analysert. Prøvene ble fortynnet og filtrert gjennom et Millex HA 0,45 µm membranfilter før begge analysene.

Sukker/syreinnhold

Det ble benyttet en Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (8 %) kolonne (300 mm · 7,8 mm i.d., partikkelstørrelse 8 µm) med SecurityGuard Cartridge Carbo-H⁺ forkolonne (4,0 mm · 3,0 mm i.d., partikkelstørrelse µm). Injeksjonsvolum var 20 µL. Det ble kjørt en isokratisk eluering med 7,2 mM svovlsyre (H₂SO₄) ved 45°C og elueringshastighet 0,5 mL/min. Sukkerne ble detektert med RI-detektor, mens syrene ble detektert med DAD-detektor ved 210 nm bølgelengder. Eksterne standarder av glukose, fruktose, sitronsyre og epletsyre ble benyttet for kvantifisering av stoffene.

Polyfenolinnhold

Analyse av innholdet av polyfenoler ble utført som beskrevet av Aaby et al. (Aaby et al. 2012) med noen endringer.

Det ble benyttet en Synergi MAX RP C12 kolonne (250 mm · 2,0 mm i.d., partikkelstørrelse 4 µm) med forkolonne (4,0 mm · 2,0 mm i.d.), begge fra Phenomenex. Injeksjonsvolum var 5 µL. Det ble kjørt en gradienteluering med A: 2 % maursyre i vann (v/v) og B: acetonitril i følgende gradient: 0–10

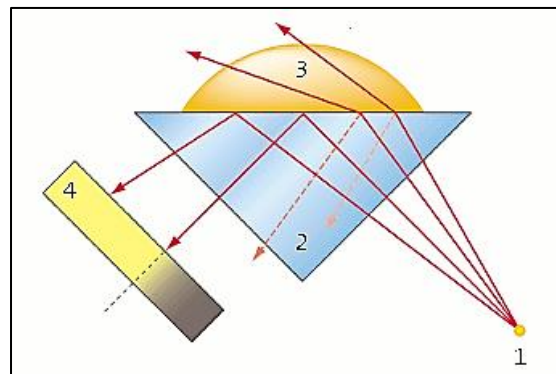
min. 5–10 % B, 10–22 min 10–12,4 % B, 22–42 min 12,4–28 % B, 42–50 min 28–60 % B, 50–55 min 60 % B og 55–58 min 60–5 % B. Kolonnetemperaturen var satt til 40°C og elueringshastighet 0,25 mL/min. Polyfenolene ble detektert med DAD.

Eksterne standarder av cyanidin-3-glukosid (520 nm), rutin (360 nm) og klorogensyre (320 nm) ble benyttet for kvantifisering av stoffene. Cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid og cyanidin-3,5-diglykosid var tidligere detektert med hjelp av MS og litteratur.

4.3.5. Bestemmelse av °Brix

°Brix er et mål for prosent løselig tørrstoff i en flytende prøve, og beregnes blant annet i forbindelse med høstetidspunkt på frukt og bær, og ved prosessering av drikker. Selv om bestemmelse av °Brix tar utgangspunkt i at alt tørrstoff i prøven er sukrose, er det andre løselige tørrstoffer, som glukose, fruktose og syrer, som bidrar til °Brix-verdien. En 11,0 % (w/w) D-glukose i vann fikk en °Brix-verdi på 10,9 (Walter 2014).

°Brix måles ved bruk av et refraktometer. Et refraktometer bygger på prinsippet om at lys beveger seg i ulik hastighet gjennom stoff med forskjellig tetthet. I digitale refraktometre sendes en lysstråle gjennom et prisme før den treffer prøven (Figur 4.6.). Avhengig av prøvens tetthet vil lyset reflekteres forskjellig, og instrumentet beregner prøvens brytningsindeks (refraktiv indeks, RI-verdi) på bakgrunn av vinkelen lyset blir reflektert med. Instrumentet konverterer deretter RI-verdi til °Brix-verdi. Instrumentet kalibreres med vann, da rent vann har en °Brix-verdi på 1,0. Siden temperatur påvirker tettheten til stoffene er det viktig at prøvene analyseres ved samme temperatur (20°C er normalt).



Figur 4.6.: Mekanisk bak et refraktometer virker. En lysstråle (1) sendes gjennom et prisme (2) og treffer prøven (3). Lyset brytes forskjellig avhengig av tettheten til prøven, og detekteres av en sensor (4). Prøvens brytningsindeks (RI-verdi) beregnes av instrumentet, og konverteres til °Brix. Figuren er hentet fra <http://www.gpsil.com/our-products/refractometers/measuring-pri/#>

Praktisk utførelse

Refraktometeret og prøver ble ekvibrert til 20 °C (prøvene til romtemperatur). Først ble instrumentet kalibrert mot vann. Vannet ble tørket bort, før prøvene ble målt tre ganger hver. °Brix ble uttrykt som % løselig tørrstoff i prøvene.

4.4. Statistiske beregninger

De statistiske beregningene ble utført i Rcmdr versjon 1.9-3. De fleste av resultatene var normalfordelt, og det ble derfor antatt en normalfordeling av samtlige data.

Enveis eller toveis variansanalyse (ANOVA) ble utført før post hoc-testene Tukeys test for sammenlikning mellom prøver, og Dunnetts test for sammenlikning fra kontroll.

Pearsons produkt moment korrelasjon ble brukt for å teste korrelasjon mellom NF- κ B-aktivitet og ulike innholdstoffer.

Signifikansnivået ble satt til $p \leq 0,05$ for alle analyser.

5 RESULTATER

Saft og ekstrakt fra bær fra de norskdyrkede svarthyllsortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor fra Leikanger dyrket i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Eiker i 2014 og Sampo fra Fresvik i 2014 ble testet for deres evne til å modulere NF- κ B-aktivitet. For å få dypere forståelse for deres effekt på NF- κ B ble også innholdsstoffer analysert, deriblant TP, TMA, spesifikke sukkerer, syrer og polyfenoler, samt tørrstoffinnhold ($^{\circ}$ Brix) og pH. Fire saftprøver ble valgt ut for fraksjonering av sukkerer, syrer, polyfenoler og antocyaniner for å teste deres effekt på NF- κ B-aktivitet i U937 3 \times κ B-LUC-celler. Seks ulike innholdsstoffer det ble funnet høye verdier av i svarthyllbærene ble også testet for deres evne til å modulere NF- κ B-aktivitet. LPS-innhold i saftene, utvalgte ekstrakter og fraksjoner ble også målt.

Alle resultater fra måling av NF- κ B-aktivitet er presentert som % av mediumkontroll. Tidligere forsøk viser at luciferaseaktiviteten ved tilsatt LPS flater ut etter 6 timer inkubering (Paur et al. 2008). Dermed ble det valgt en inkubasjonstid med LPS på 6 timer i forsøkene hvor effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet ble testet. Under følger resultatene inndelt etter type prøve.

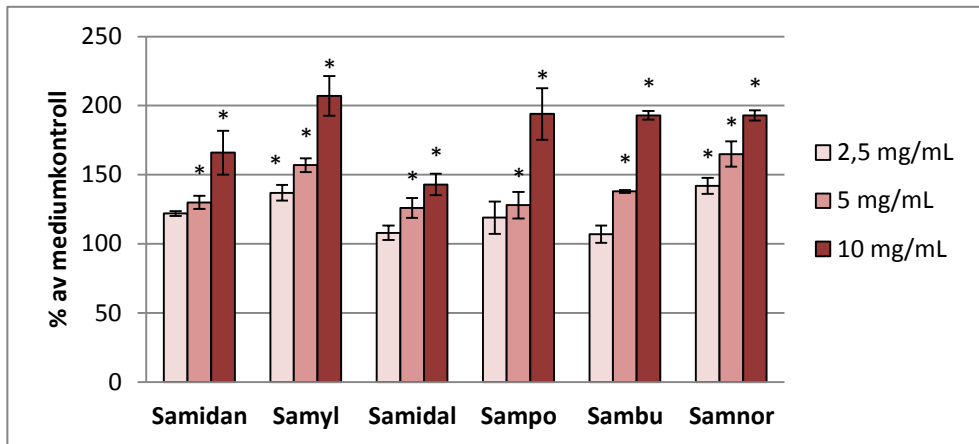
5.1. Effekt av saft fremstilt ved sentrifugering på NF- κ B-aktivitet og analyse av innholdsstoffer

5.1.1. Effekt på NF- κ B-aktivitet

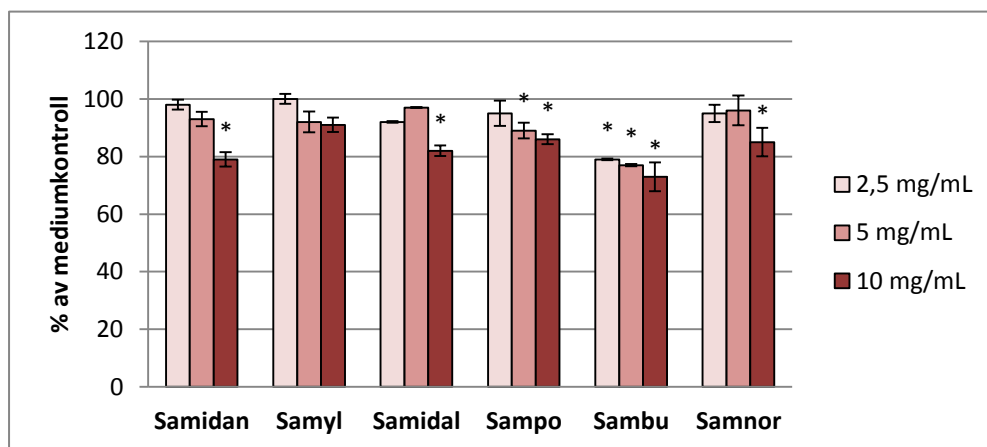
Saft som ble fremstilt på laboratoriet ved sentrifugering fra sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor fra Leikanger dyrket i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Eiker i 2014 og Sampo fra Fresvik i 2014 ble testet for deres evne til å modulere basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. NF- κ B-aktivitet ble målt ved bruk av Bright-GloTM Luciferase Assay System som beskrevet i punkt 3.2.2.

Effekt av ulike hyllebærsorter på NF- κ B-aktivitet

Økende konsentrasjoner (2,5 mg, 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium) av saft fra ulike hyllebærsorter høstet i Leikanger i 2013 ble tilsatt cellene for å teste om saftene kunne modulere NF- κ B-aktiviteten på en doseavhengig måte. Figur 5.1. viser effekten av de ulike saftene på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.2. viser effekten av de ulike saftene på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.1.: Effekt på basal NF-κB-aktivitet av saft fra ulike sorter hyllebær høstet i Leikanger i 2013. U937 3κB-LUC-celler ble inkubert med tre ulike konsentrasjoner av saft i 6,5 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg saft/mL cellemedium. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra kontroll bestemt ved Dunnetts test.



Figur 5.2.: Effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet av saft fra ulike sorter hyllebær høstet i Leikanger i 2013. U937 3κB-LUC-celler ble tilsatt tre ulike konsentrasjoner av saft. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μg/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg saft/mL cellemedium. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra kontroll bestemt ved Dunnetts test.

Det ble funnet en klar positiv sammenheng mellom konsentrasjon og basal aktivering av NF-κB, noe som viser at saft hadde en doseavhengig effekt på aktivering av NF-κB. LPS-indusert NF-κB-aktivitet hadde en negativ sammenheng mellom saftkonsentrasjon og NF-κB-aktivitet, men resultatet var ikke like tydelig her som ved basal aktivitet. Figur 5.1. viser at ved konsentrasjonene 5 og 10 mg/mL hadde alle sorter en signifikant økning i basal NF-κB-aktivitet sammenliknet med kontroll. Samyl og

Samnor ga også en signifikant økning ved 2,5 mg/mL. Figur 5.2. viser at LPS-indusert NF-κB-aktivitet ble signifikant hemmet av 10 mg saft /mL cellemedium fra alle sorter bortsett fra saft fra sorten Samyl ($p = 0,05026$). Saft fra sorten Sambu ga en signifikant nedgang av LPS-indusert NF-κB-aktivitet ved alle tre konsentrasjoner, mens saften fra sorten Sampo også viste signifikant nedgang ved 5 mg/mL.

Da de fleste sorter ga en signifikant modulering av basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet ved 10 mg/mL ble denne konsentrasjonen benyttet videre for å se på forskjell mellom sorter, år og dyrkningssted.

Effekt av høsteår og sort på NF-κB-aktivitet

Saftenes effekt av høsteår og sort på modulering av NF-κB-aktivitet vises i Tabell 5.1.

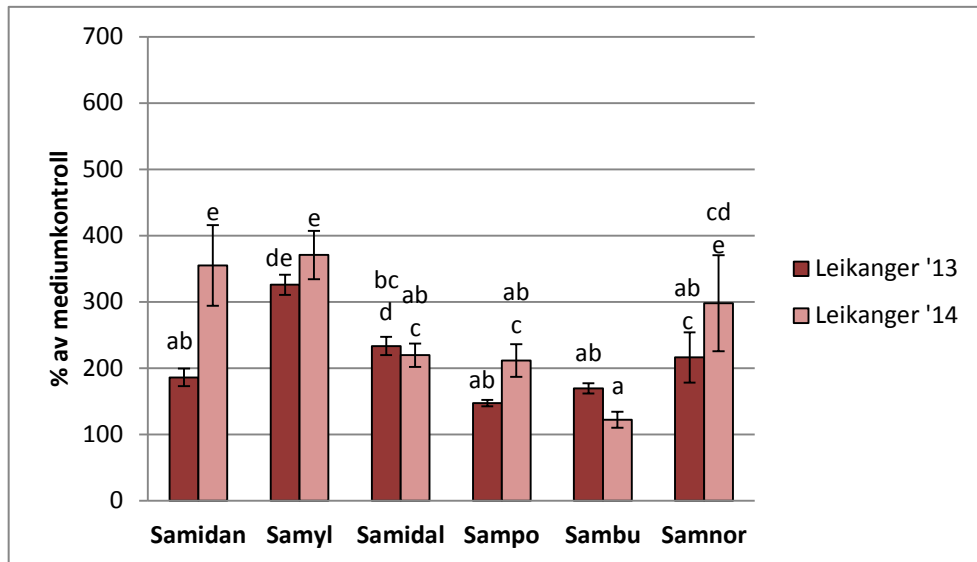
Tabell 5.1.: Effekt av høsteår og sort på modulering av NF-κB-aktivitet for saft fra bær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014.

		NF-κB-aktivitet	
		Basal	LPS-indusert
Signifikans	Sort	$p < 0,001$	$p < 0,004$
	År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Sort x År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Verdier^{1, 2}			
Sort³	Samidan	271 ^c	92 ^{b, c}
	Samyl	348 ^d	89 ^{b, c}
	Samidal	227 ^{b, c}	94 ^c
	Sampo	180 ^{a, b}	81 ^{a, b}
	Sambu	146 ^a	76 ^a
	Samnor	257 ^c	89 ^{b, c}
År⁴	2013	213 ^a	83 ^a
	2014	263 ^b	91 ^b
¹ Resultatene er oppgitt i % av mediumkontroll; ² Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom sorter eller år ($p \leq 0,05$) bestemt ved Tukeys test; ³ Gjennomsnitt per sort for 2013 og 2014 ($n \geq 6$); ⁴ Gjennomsnitt per år for de seks sortene ($n = 18$)			

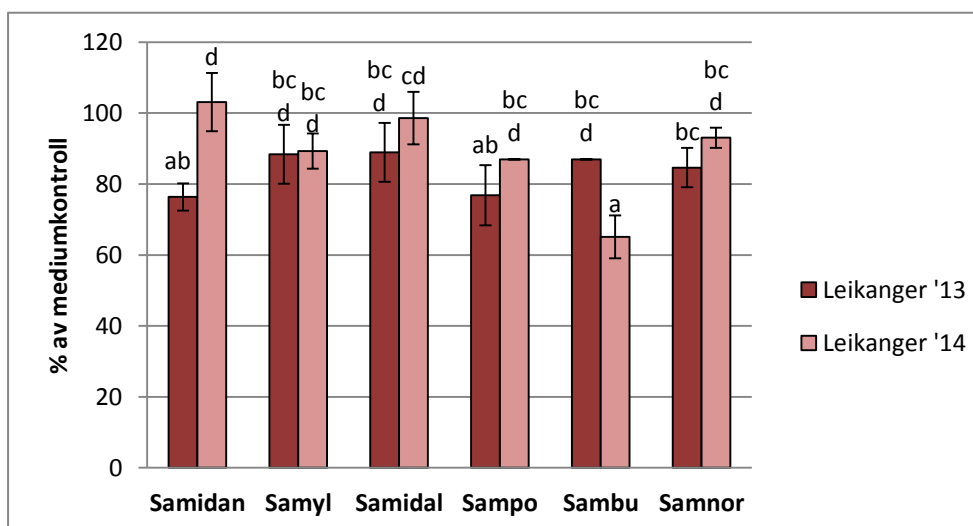
Tabell 5.1. viser at det var signifikant forskjell mellom både år og sort på saftenes evne til å modulere NF-κB-aktivitet. Saftene hadde best evne til å stimulere basal NF-κB-aktivitet i 2014, mens saftene fra 2013 hadde best evne til å hemme NF-κB-aktivitet. Gjennomsnittlig hadde saft fra Samyl best (348 %

av kontroll) og Sambu dårligst (146 % av kontroll) evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet. For saftenes effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet hadde Sambu best (76 % av kontroll) og Samidal dårligst (94 % av kontroll) evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.

Ved å dele prøvene etter sort og år kan individuelle prøver sammenliknes. Figur 5.3. viser effekten av saft fra de seks sortene dyrket i Leikanger i 2013 og 2014 på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.4. viser deres effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.3.: Effekt av basal NF- κ B-aktivitet av saft fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble inkubert med saft (10 mg/mL) i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.



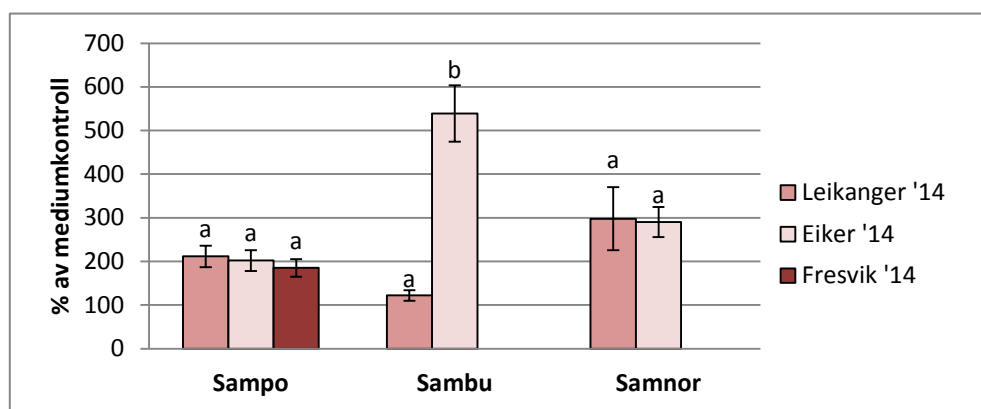
Figur 5.4.: Effekt av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av saft fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble tilsatt saft (10 mg/mL). Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.3. viser at prøvenes evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet varierer mellom år, og at årseffekten er signifikant kun for sorten Samidal. Sammenlikning av de ulike sortene viste at Sampo og Sambu ga lavest stimulering av basal NF- κ B-aktivitet begge årene, mens Samyl ga sterkest stimulering av basal NF- κ B-aktivitet begge årene.

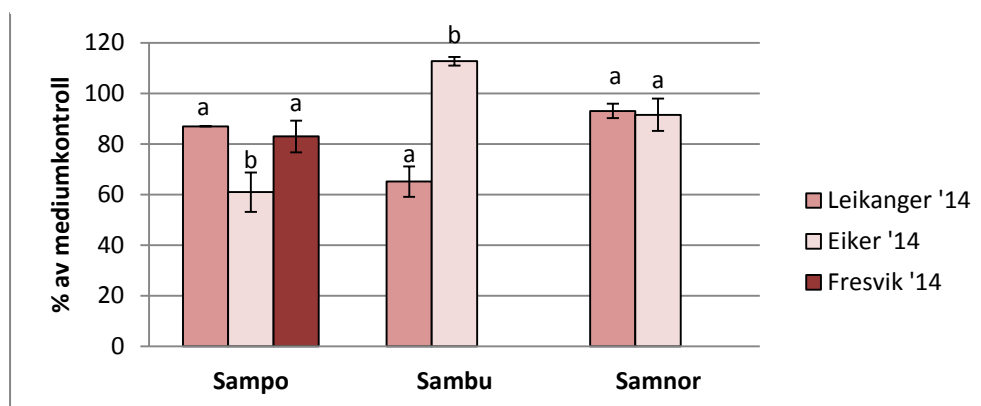
Figur 5.4. viser at saft fra Samidan og Sambu hadde signifikant forskjellig evne til å modulere LPS-indusert NF- κ B-aktivitet mellom år.

Effekt av voksested på NF- κ B-aktivitet

Saft fra Sampo dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014 Sambu dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014, samt Samnor dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014 ble sammenliknet for å undersøke om dyrkningssted påvirker de immunologiske egenskapene til bærene. Figur 5.5. viser effekt av dyrkningssted på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.6. viser effekt av dyrkningssted på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.5.: Effekt på basal NF- κ B-aktivitet av saft av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble inkubert med saft (10 mg/mL) i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.



Figur 5.6.: Effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av saft av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble tilsatt saft (10 mg/mL). Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.5. viser at det ikke var forskjell mellom saft fra Sampo dyrket i Leikanger, Eiker eller Fresvik i 2014 når det gjelder effekt på basal NF- κ B-aktivitet. Saft fra sorten Sambu viste signifikant forskjell i effekt på basal NF- κ B-aktivitet avhengig om de var dyrket i Leikanger eller Eiker. Saft fra sorten Samnor hadde ingen signifikant forskjell mellom dyrkningssted.

Figur 5.6. viser at det var signifikant forskjell mellom dyrkningssted når det gjelder effekt av saft på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Saft fra Sampo dyrket i Eiker ga signifikant bedre evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn saft fra samme sort dyrket i Leikanger eller Fresvik. Saft fra sorten Sambu viste signifikant forskjell i effekt av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet avhengig av om den var dyrket i Leikanger eller Eiker. Saft fra sorten Samnor hadde ingen signifikant forskjell mellom dyrkningssted på effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.

5.1.2. Innhold av TP, TMA, sukkerer og syrer

Saft fra sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Leikanger i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Eiker i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik i 2014 ble analysert for deres innhold av TP, TMA, sukkerer og syrer.

Innhold av TP og TMA i saft

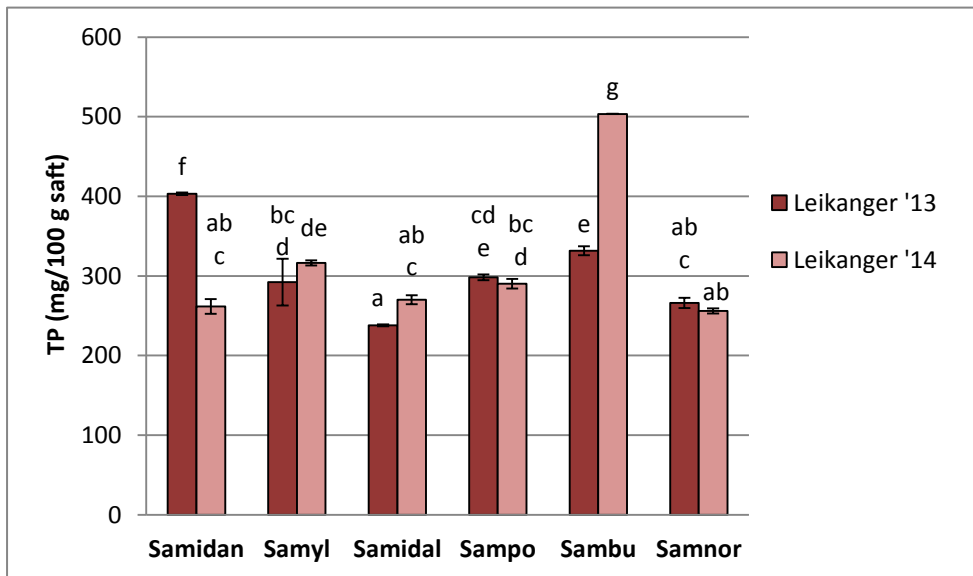
Saftene ble analysert for deres innhold av TP ved bruk av Folin-Ciocalteaus metode som beskrevet i punkt 4.3.1., og TMA ved bruk av pH-differensial-metoden beskrevet i punkt 4.3.2. Tabell 5.2. viser effekt av sort og dyrkningsår for saftenes innhold av TP og TMA.

Tabell 5.2.: Effekt av høsteår og sort på innhold av TP og TMA i saft fra bær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014.

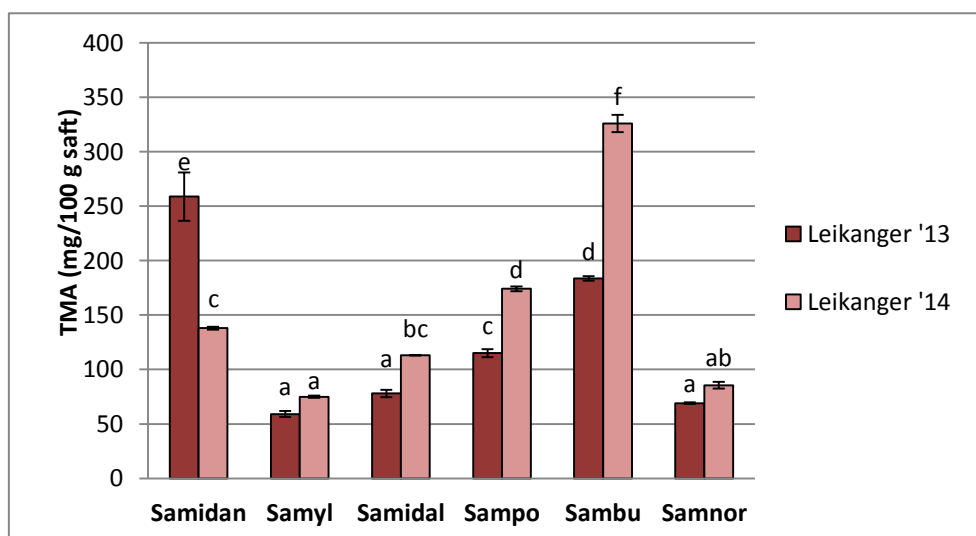
		TP ¹	TMA ²
Signifikans	Sort	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Sort x År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Verdier ³			
Sort ⁴	Samidan	333 ^d	198 ^d
	Samyl	270 ^b	67 ^a
	Samidal	254 ^a	96 ^b
	Sampo	294 ^c	145 ^c
	Sambu	418 ^e	255 ^e
	Samnor	261 ^{a, b}	77 ^a
År ⁵	2013	294 ^a	127 ^a
	2014	316 ^b	152 ^b
¹ TP, totale fenoler oppgitt i mg gallesyre-ekvivalenter (GAE) per 100 gram saft; ² Totalemonomere antocyaniner oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft; ³ Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom sorter eller år ($p \leq 0,05$) bestemt ved Tukeys test; ⁴ Gjennomsnitt per sort for dyrkningsårene 2013 og 2014 ($n = 4$); ⁵ Gjennomsnitt per år for de seks sortene ($n = 12$)			

Saftene hadde signifikant forskjell i innhold av både TP og TMA mellom både år og sort (Tabell 5.2.). Det er et signifikant høyere innhold av TP og TMA i 2014 enn i 2013, og det var større variasjoner i innholdet av TMA enn av TP. Ved å se på begge årene samlet hadde Sambu høyest innhold av både TP (418 mg) og TMA (255 mg), mens Samidal hadde lavest innhold av TP (254 mg) og Samyl hadde lavest innhold av TMA (67 mg).

Ved å dele prøvene etter sort og år kan individuelle prøver sammenliknes. Figur 5.7. viser innhold av TP og Figur 5.8. viser innhold av TMA i de enkelte saftene.



Figur 5.7.: Innhold av TP i saft fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram saft. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

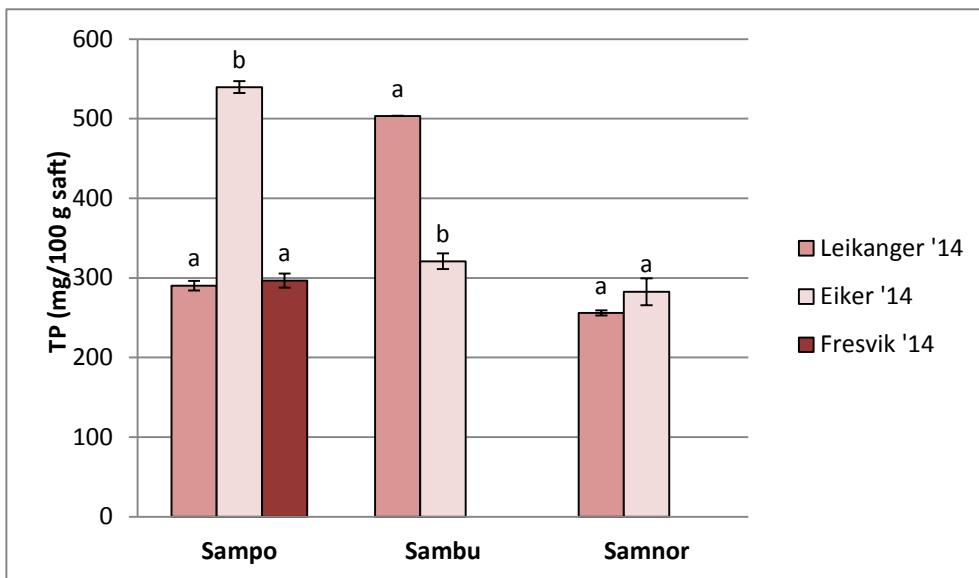


Figur 5.8.: Innhold av TMA i saft fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

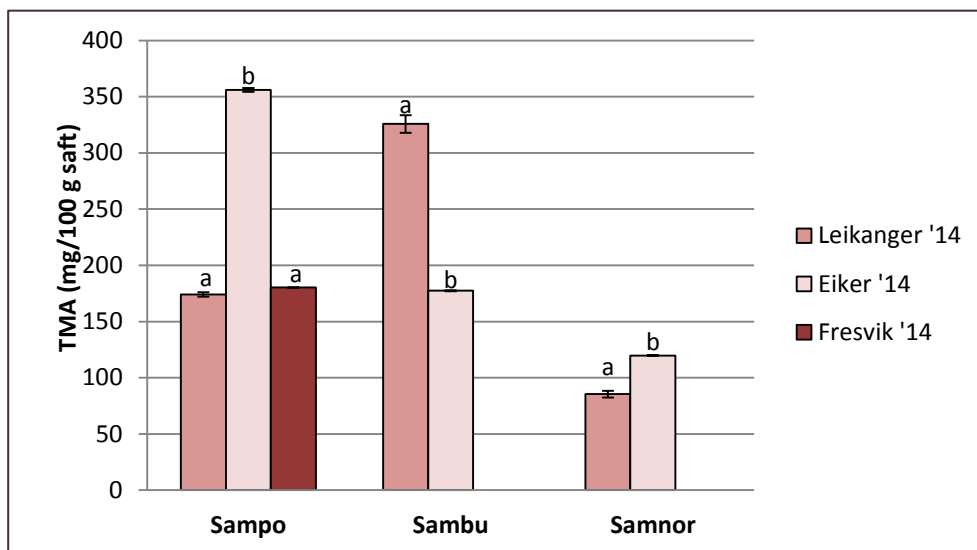
Figur 5.7. og 5.8. viser at saft fra sortene Samidan og Sambu er signifikant forskjellig mellom år. Samidan hadde høyere innhold av TP og TMA i 2013, mens Sambu hadde høyest innhold av TP og TMA i 2014. Sampo hadde også signifikant høyere innhold av TMA i 2014.

Innhold av TP og TMA i saft fra bær dyrket på ulike steder

Saft fra Sampo dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014 Sambu dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014, samt Samnor dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014 ble analysert for deres innhold av TP (Figur 5.9.) og TMA (Figur 5.10.).



Figur 5.9.: Innhold av TP i saft av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram saft. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.



Figur 5.10.: Innhold av TMA i saft av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.9. og 5.10 viser at saft fra sorten Sampo dyrket i Eiker hadde ca. 80 % høyere innhold av TP og over 100 % høyere innhold av TMA sammenliknet med saft fra Sampo fra Leikanger og Fresvik. Saft fra sorten Sambu viste signifikant forskjell i innhold av TP og TMA avhengig om de var dyrket i Leikanger eller Eiker. Saft fra sorten Samnor hadde ingen signifikant forskjell i innhold av TP, men en svak signifikant forskjell i innhold av TMA mellom dyrkningssted.

Innhold av sukker og syrer i saft

Saftene ble analysert for deres innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre ved bruk av HPLC som beskrevet i punkt 4.3.4. °Brix ble målt ved bruk av refraktometer, som beskrevet i punkt 4.3.5. pH i saftprøvene ble også målt. Resultatene vises i Tabell 5.3. og 5.4.

Tabell 5.3.: Innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre i safter fra ulike sorter og steder ^a, samt °Brix- og pH-verdier.

Prøve	Glukose (g/100 g prøve)	Fruktose (g/100 g prøve)	Sitronsyre (g/100 g prøve)	Eplesyre (g/100 g prøve)	°Brix (% løselig tørrstoff) ^b	pH
Safter 2013						
Samidan	0,9	2,8	0,5	0,4	8,7 ± 0,1	4,13
Samyl	1,4	1,3	0,9	0,3	5,6 ± 0,0	4,03
Samidal	1,0	2,0	0,6	0,4	6,6 ± 0,0	4,24
Sampo	1,0	2,9	0,7	0,5	9,1 ± 0,0	3,95
Sambu	0,9	1,9	0,6	0,3	6,8 ± 0,0	4,23
Samnor	1,3	1,2	0,8	0,3	5,4 ± 0,0	3,75
Gjennomsnitt Leikanger '13 ^b	1,1 ± 0,2	2,0 ± 0,7	0,7 ± 0,2	0,4 ± 0,1	7,0 ± 1,5	4,06 ± 0,2
Safter 2014						
Samidan	1,2	2,8	0,8	0,5	9,9 ± 0,0	3,65
Samyl	1,4	2,2	0,9	0,5	8,2 ± 0,3	3,66
Samidal	1,0	3,8	0,7	0,5	10,3 ± 0,0	4,29
Sampo	1,0	4,2	0,6	0,5	12,5 ± 0,0	3,96
Sambu	0,9	2,4	0,6	0,4	9,0 ± 0,1	4,20
Samnor	1,1	2,4	0,8	0,5	8,2 ± 0,2	3,55
Gjennomsnitt Leikanger '14 ^c	1,1 ± 0,2	3,0 ± 0,8	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	9,7 ± 1,6	3,86 ± 0,3
Sampo Eiker	3,7	2,6	0,9	0,6	11,2 ± 0,0	4,04
Sambu Eiker	5,7	4,3	1,0	0,7	14,1 ± 0,2	3,66
Samnor Eiker	5,0	4,1	0,9	0,7	12,4 ± 0,0	3,67
Sampo Fresvik	0,9	5,8	0,6	0,6	10,8 ± 0,1	4,12
Gjennomsnitt ^d	1,0 ± 1,6	2,9 ± 1,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,1	9,3 ± 2,5	3,95 ± 0,3
^a n = 1; ^b gjennomsnitt av tre målinger ±SD; ^c gjennomsnitt av seks målinger ±SD; ^d gjennomsnitt av 16 målinger ±SD						

Tabell 5.4.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom innhold av sukker, syrer, °Brix, pH og basal og LPS-indusert NF-κB -aktivitet.

	Sukker	Syrer	°Brix	pH
Basal NF-κB-aktivitet				
p-verdi	0,078	0,001	0,490	0,005
r-verdi	0,45	0,73	0,18	-0,66
LPS-indusert NF-κB-aktivitet				
p-verdi	0,271	0,135	0,650	0,080
r-verdi	2,9	0,39	0,12	-0,45

Tabell 5.3. viser at saftene fra Leikanger fra 2014 hadde høyere innhold av fruktose og eplesyre enn saftene fra 2013. Saft fra Sampo, Sambu og Samnor fra Eiker viste generelt høyere innhold av både glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre, og hadde også høye °Brix-verdier. Dette fører til høyt standardavvik på gjennomsnitt for alle prøvene, spesielt for glukose. Sampo fra Fresvik hadde det høyeste innholdet av fruktose blant saftene, med en verdi på 5,75 g/100 g saft. °Brix varierte fra 5,4 til 14,1, med gjennomsnitt på 9,3. pH i saftene varierte fra 3,55 til 4,29, med gjennomsnitt på 3,95. Det ble funnet positiv korrelasjon mellom innhold av syrer og basal NF-κB-aktivitet, og en negativ korrelasjon mellom pH og basal NF-κB-aktivitet (Tabell 5.4.).

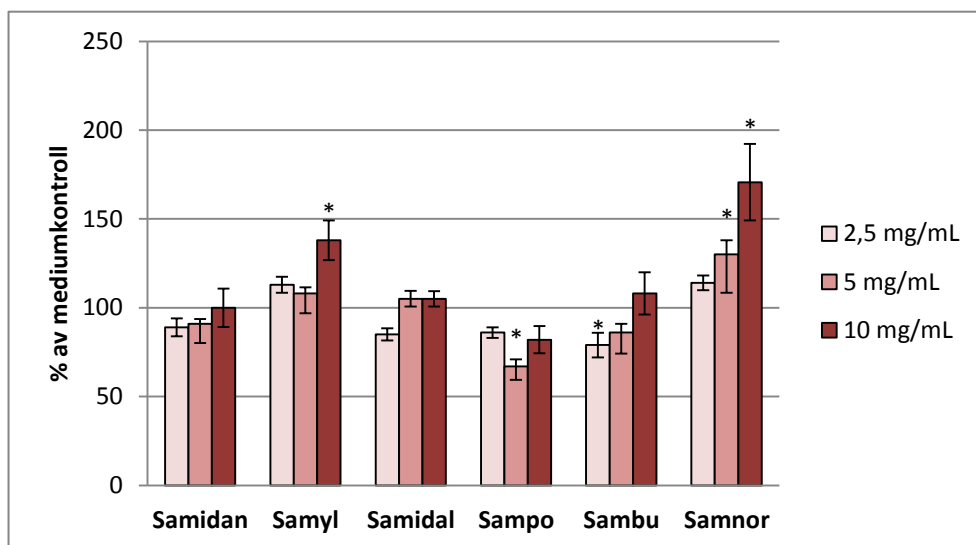
5.2. Effekt av metanolekstrakter på NF-κB-aktivitet og analyse av innholdsstoffer

5.2.1. Effekt på NF-κB-aktivitet

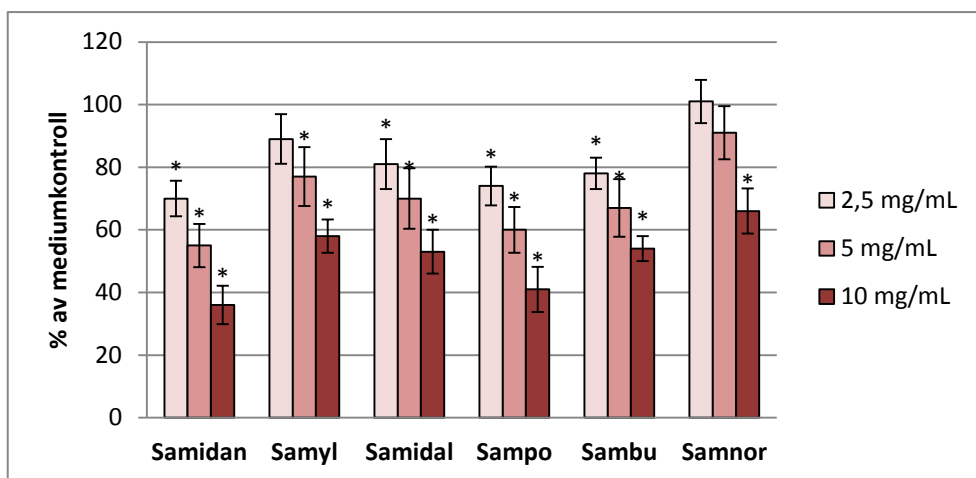
Metanolekstrakt fra sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Leikanger i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Eiker i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik i 2014 ble testet for deres evne til å modulere basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet. NF-κB-aktivitet ble målt ved bruk av Bright-Glo™ Luciferase Assay System som beskrevet i punkt 4.2.2.

Doseavhengighet og forskjell fra kontroll

Som ved saftene ble økende konsentrasjoner (2,5 mg, 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium) av ekstrakt fra ulike hyllebærsorter høstet i Leikanger i 2013 tilsatt cellene for å sjekke om ekstraktene kunne modulere NF-κB-aktiviteten på en doseavhengig måte. Figur 5.11. viser effekten av de ulike ekstraktene på basal NF-κB-aktivitet, og Figur 5.12. viser effekten av de ulike ekstraktene på LPS-indusert NF-κB-aktivitet.



Figur 5.11.: Effekt på basal NF-κB-aktivitet av ekstrakt fra ulike sorter hyllebær høstet i Leikanger i 2013. U937 3κB-LUC-celler ble inkubert med tre ulike konsentrasjoner av ekstrakt i 6,5 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg bær/mL cellemedium. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra kontroll bestemt ved Dunnetts test.



Figur 5.12.: Effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet av ekstrakt fra ulike sorter hyllebær høstet i Leikanger i 2013. U937 3κB-LUC-celler ble tilsatt tre ulike konsentrasjoner av ekstrakt. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μg/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg bær/mL cellemedium. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra kontroll bestemt ved Dunnetts test.

Begge forsøkene viste en signifikant sammenheng mellom økende konsentrasjon av tilsatt ekstrakt og endring i NF-κB-aktivitet, selv om ikke alle sortene ble signifikant forskjellig fra kontroll. Spesielt ekstraktens effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet hadde en klar sammenheng mellom økt ekstraktkonsentrasjon og nedgang i NF-κB-aktivitet (Figur 5.12.). Figur 5.11. viser at det bare var den høyeste konsentrasjonen tilsatt ekstrakt av sortene Samyl og Samnor som ga signifikant økning i basal NF-κB-aktivitet, mens ekstrakt av Sampo ved 5 mg/mL og ekstrakt av Sambu ved 2,5 mg/mL ga en signifikant nedgang i basal NF-κB-aktivitet. Figur 5.12. viser at alle sorter ved alle konsentrasjoner,

utenom Samnor ved konsentrasjonene 2,5 og 5 mg/mL og Samyl ved konsentrasjon 2,5 mg/mL, ga en signifikant nedgang i LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.

Da det var størst forskjell mellom sortene ved konsentrasjonen 10 mg/mL ble denne konsentrasjonen benyttet videre for å se på forskjell mellom sorter, år og dyrkningssted.

Effekt av høsteår og sort på NF- κ B-aktivitet

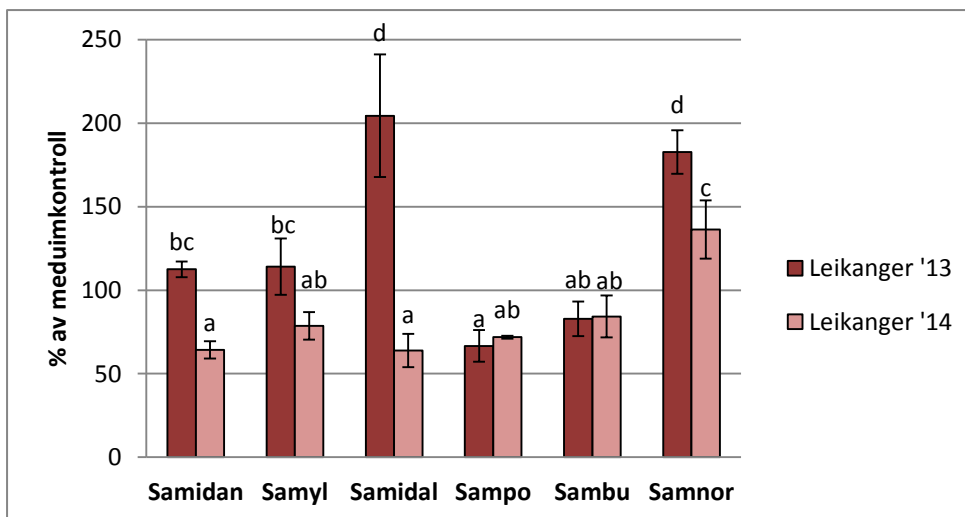
Ekstraktenes effekt av høsteår på basal NF- κ B-aktivitet vises i Tabell 5.5.

Tabell 5.5.: Effekt av høsteår og sort på basal NF- κ B-aktivitet for ekstrakt fra bær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014.

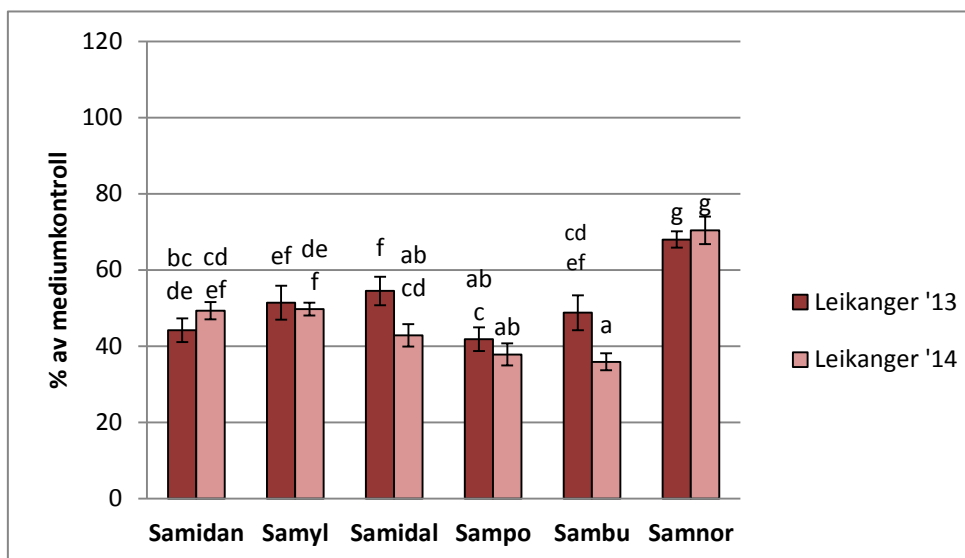
		NF-κB-aktivitet	
		Basal	LPS-indusert
Signifikans	Sort	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Sort x År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Verdier ^{1,2}			
Sort ³	Samidan	85 ^{a, b}	48 ^{b, c}
	Samyl	96 ^b	51 ^c
	Samidal	124 ^c	49 ^c
	Sampo	69 ^a	40 ^a
	Sambu	84 ^{a, b}	42 ^{a, b}
	Samnor	257 ^c	69 ^d
År ⁴	2013	127 ^a	52 ^a
	2014	81 ^b	48 ^b
¹ Verdier er oppgitt i % av mediumkontroll; ² Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom sorter eller år ($p \leq 0,05$) bestemt ved Tukeys test; ³ Gjennomsnitt per sort for 2013 og 2014 ($n \geq 6$); ⁴ Gjennomsnitt per år for de seks sortene ($n = 18$)			

Tabell 5.5. viser at både høsteår og sorter var signifikant forskjellig fra hverandre ved effekt på basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Ekstrakt fra bær dyrket i 2013 viser en bedre effekt til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet og en dårligere evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn ekstrakt fra bær dyrket i 2014. Det var stor variasjon i ekstraktenes evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet. Ekstrakt fra Samnor hadde den sterkeste evnen til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet (257 % av kontroll), og signifikant dårligst evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet (69 % av kontroll) mellom sortene. Ekstrakt fra sorten Sampo hadde dårligst evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet (69 % av kontroll), i tillegg til best hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet (40 % av kontroll) av sortene.

Prøvene ble delt etter sort og år for å finne hvor forskjellene var. Figur 5.13. viser effekten av ekstrakt fra de seks sortene dyrket i Leikanger i 2013 og 2014 på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.14. viser deres effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.13.: Effekt av basal NF-κB-aktivitet av ekstrakt fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. U937 3κB-LUC-celler ble inkubert med ekstrakt (10 mg bær/mL) i 6,5 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.



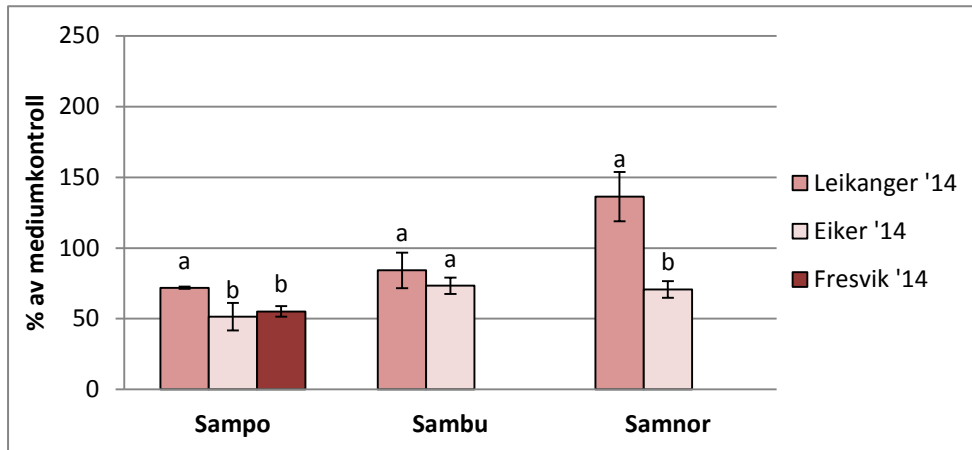
Figur 5.14.: Effekt av LPS-indusert NF-κB-aktivitet av ekstrakt fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. U937 3κB-LUC-celler ble tilsatt ekstrakt (10 mg bær/mL). Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μg/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.13. viser at effekt av år på basal NF-κB-aktivitet var størst for ekstraktene av Samidal, men også ekstrakter av Samidan og Samnor viste forskjell mellom år. Ekstrakt fra Samnor og Samidal skilte seg ut ved at Samnor stimulerte basal NF-κB-aktivitet begge årene, og ekstrakt fra Samidal stimulerte basal NF-κB-aktivitet i 2013.

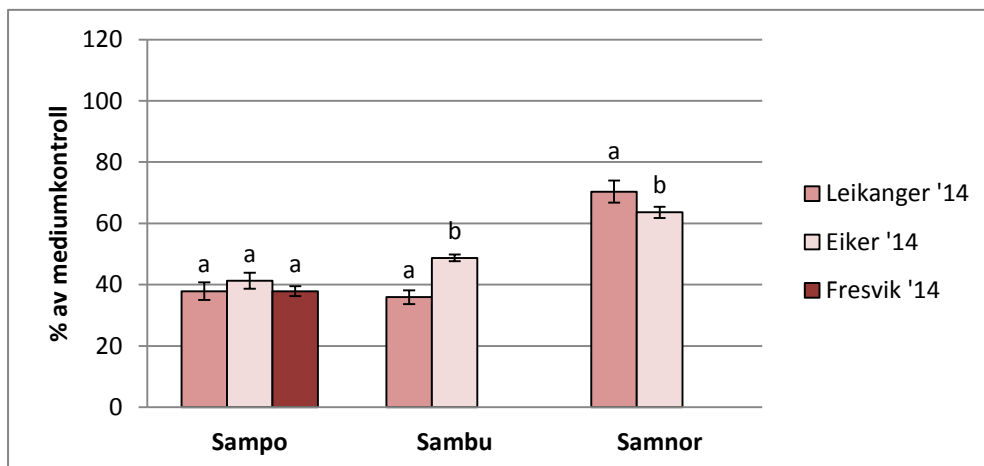
Mellom prøver for effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet (Figur 5.14.) ga ekstraktene fra Samidal og Sambu en forskjellig effekt avhengig om de var dyrket i 2013 eller 2014. De andre prøvene viste liten variasjon mellom år.

Effekt av voksested på NF- κ B-aktivitet

Ekstrakt fra Sampo dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014, Sambu dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014, samt Samnor dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014 ble sammenliknet for å undersøke om dyrkingssted påvirker de immunologiske egenskapene til bærene. Figur 5.15. viser effekt av dyrkingssted på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.16. viser effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.15.: Effekt på basal NF- κ B-aktivitet av ekstrakt av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. U937 3×3 NF- κ B-LUC-celler ble inkubert med ekstrakt (10 mg bær/mL) i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.



Figur 5.16.: Effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av ekstrakt av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. U937 3×3 NF- κ B-LUC-celler ble inkubert med ekstrakt (10 mg/mL). Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.15. viser at det var signifikant forskjell mellom dyrkingssted når det gjelder effekt av ekstrakt på basal NF- κ B-aktivitet. Ekstrakt fra Sampo dyrket i Leikanger hemmet basal NF- κ B-aktivitet i mindre grad enn ekstrakt laget av samme sort dyrket i Eiker eller Fresvik. Ekstrakt laget fra Samnor viste signifikant forskjell i effekt på basal NF- κ B-aktivitet avhengig om de var dyrket i Leikanger eller Eiker. Ekstrakt fra sorten Sambu hadde ingen signifikant forskjell mellom dyrkingssted når det gjaldt basal NF- κ B-aktivitet.

Figur 5.16. viser at ulike dyrkningssteder ikke påvirker ekstrakt laget fra Sampo sin evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Ekstrakter fra Sambu og Samnor hadde signifikant forskjell i effekt av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet avhengig av om bærene var dyrket i Leikanger eller Eiker.

5.2.2. Innhold av TP, TMA og individuelle polyfenoler i ekstrakt

Metanolekstrakt fra sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Leikanger i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Eiker i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik i 2014 ble analysert for deres innhold av TP, TMA og individuelle polyfenoler.

Innhold av TP og TMA i ekstrakt

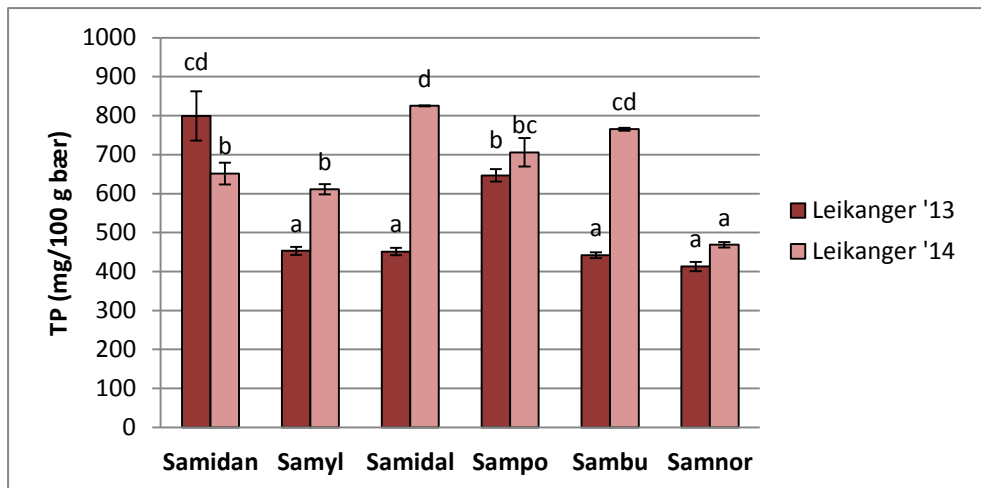
Ekstraktene ble analysert for deres innhold av TP ved bruk av Folin-Ciocalteaus metode som beskrevet i punkt 4.3.1., og TMA ved bruk av pH-differensial-metoden beskrevet i punkt 4.3.2. Tabell 5.6. viser effekt av sort og dyrkningsår.

Tabell 5.6.: Effekt av høsteår og sort på innhold av TP og TMA i ekstrakt fra bær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014.

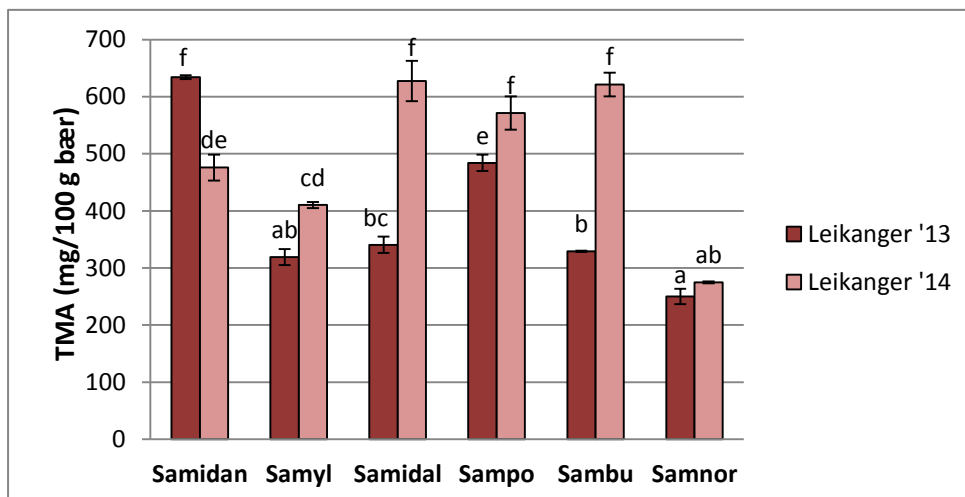
		TP ¹	TMA ²
Signifikans	Sort	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
	Sort x År	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Verdier ³			
Sort ⁴	Samidan	725 ^e	555 ^d
	Samyl	532 ^b	366 ^b
	Samidal	638 ^{c,d}	484 ^c
	Sampo	676 ^{d,e}	528 ^d
	Sambu	603 ^c	475 ^c
	Samnor	440 ^a	263 ^a
År ⁵	2013	534 ^a	392 ^a
	2014	671 ^b	497 ^b
¹ TP, totale fenoler oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram saft; ² TMA, totale monomere antocyaniner oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft ³ Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell mellom sorter eller år ($p \leq 0,05$) bestemt ved Tukeys test; ⁴ Gjennomsnitt per sort for dyrkningsårene 2013 og 2014 ($n = 4$); ⁵ Gjennomsnitt per år for de seks sortene ($n = 12$)			

Ekstraktene hadde signifikant forskjell i innhold av både TP og TMA mellom både år og sort (Tabell 5.6.). Innhold av TP og TMA var signifikant høyere i 2014 enn i 2013. Ved å se på begge årene samlet hadde Samidan høyest innhold av både TP (725 mg) og TMA (555 mg), mens Samnor hadde lavest innhold av TP (440 mg) og TMA (263 mg).

Ved å dele prøvene etter sort og år kan individuelle prøver sammenliknes. Figur 5.17. viser innhold av TP og Figur 5.18. viser innhold av TMA i de enkelte saftene.



Figur 5.17.: Innhold av TP i ekstrakt fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram bær. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

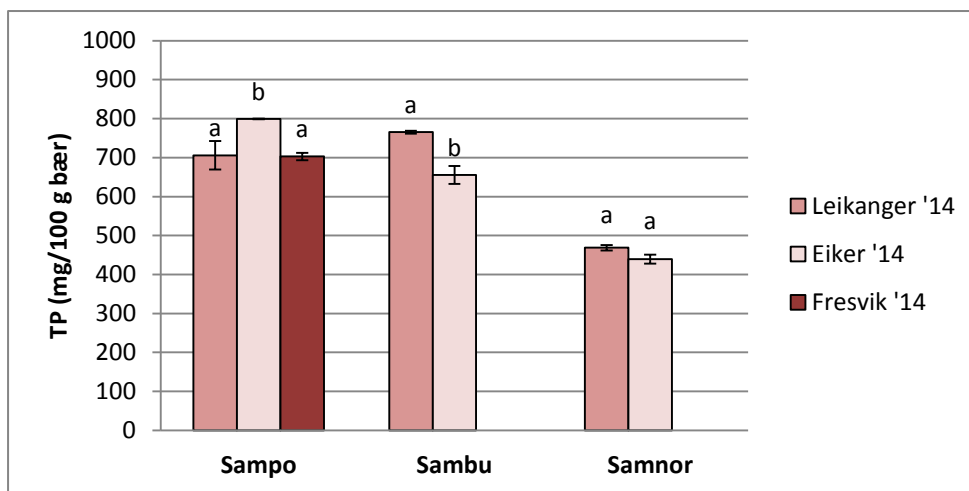


Figur 5.18.: Innhold av TMA i ekstrakt fra ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger i 2013 og 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram bær. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

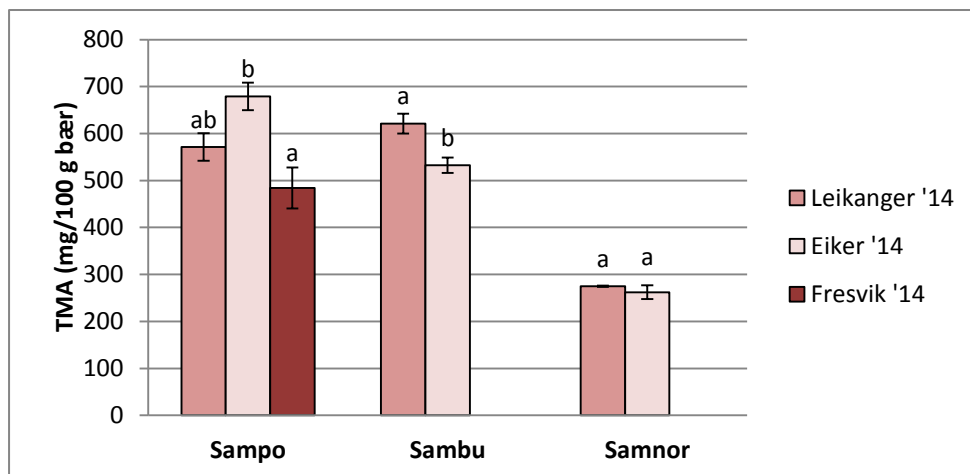
Figur 5.17. og 5.18. viser tydelig en effekt av år. Alle sorter unntatt Samidan hadde høyere innhold av TP og TMA i 2014 enn i 2013. Konsentrasjonene av TP i ekstraktene varierer fra ca. 400 mg GAE til over 800 mg GAE/100 g bær (Figur 5.17.). Innholdet av TP var høyere i 2014, bortsett fra hos Samidan hvor innhold av TP var signifikant høyere i 2013 enn i 2014. Samnor hadde lavest innhold av totale polyfenoler både i 2013 og 2014.

Innhold av TP og TMA i ekstrakt fra bær dyrket på ulike steder

Ekstrakt fra Sampo dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014 Sambu dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014, samt Samnor dyrket i Leikanger i 2014 og Eiker 2014 ble analysert for deres innhold av TP (Figur 5.19.) og TMA (Figur 5.20.).



Figur 5.19.: Innhold av TP i ekstrakt av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram bær. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.



Figur 5.20.: Innhold av TMA i ekstrakt av ulike sorter hyllebær dyrket i Leikanger, Eiker og Fresvik i 2014. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram bær. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøver av samme sort bestemt ved Tukeys test.

Figur 5.19. og 5.20. viser at ekstrakt fra Sampo dyrket i Eiker hadde signifikant høyere innhold av TP og TMA sammenliknet med ekstrakt laget fra samme sort dyrket i Fresvik. Sampo dyrket i Fresvik hadde også signifikant høyere innhold av TP enn Sampo dyrket i Leikanger. Ekstrakt fra sorten Sambu viste signifikant forskjell i innhold av TP og TMA avhengig om de var dyrket i Leikanger eller Eiker. Det var ingen signifikant effekt av dyrkningssted på innhold av TP og TMA for sorten Samnor.

Innhold av utvalgte polyfenoler i ekstrakt

Ekstraktene ble analysert for deres innhold av antocyaninene cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (Cy-3-sam-5-glu), cyanidin-3,5-diglukosid (Cy-3,5-diglu), cyanidin-3-sambubiosid (Cy-3-sam), cyanidin-3-glukosid (Cy-3-glu), flavonolet rutin og klorogensyre ved bruk av HPLC og detektert med ulike detektorer, som beskrevet i punkt 4.3.4. Resultatene vises i Tabell 5.7.

Tabell 5.7.: Konsentrasjon (mg/100 g bær) av utvalgte polyfenoler i ekstrakter ^a.

Prøve	Cy-3-sam-5-glu ^b + Cy-3,5-diglu ^c	Cy-3-sam ^d	Cy-3-glu ^e	Rutin	Klorogensyre
Ekstrakter 2013					
Samidan Leikanger	20,3 ± 0,9	439,8 ± 22,1	293,2 ± 1,8	,9 ± 2,1	28,55 ± 6,0
Samyl Leikanger	9,5 ± 0,9	231,9 ± 28,9	154,6 ± 0,4	,8 ± 0,4	42,3 ± 0,7
Samidal Leikanger	10,1 ± 0,6	242,8 ± 12,5	161,9 ± 1,2	,8 ± 12,0	49,2 ± 11,7
Sampo Leikanger	18,3 ± 0,3	345,4 ± 10,7	230,3 ± 1,3	,2 ± 2,7	46,5 ± 0,5
Sambu Leikanger	10,5 ± 0,4	243,7 ± 8,0	162,5 ± 1,0	,2 ± 0,3	47,4 ± 8,1
Samnor Leikanger	9,1 ± 0,1	189,3 ± 15,0	126,2 ± 0,8	,8 ± 2,8	69,6 ± 0,4
Gjennomsnitt for Leikanger '13^f	13,0 ± 5,0	282,2 ± 92,8	188,1 ± 61,8	30,3 ± 10,8	47,3 ± 13,3
Ekstrakter 2014					
Samidan Leikanger	35,9 ± 1,9	612,2 ± 11,5	408,1 ± 7,7	102,0 ± 2,4	29,6 ± 0,8
Samyl Leikanger	16,3 ± 0,5	551,5 ± 9,0	367,7 ± 6,0	70,6 ± 0,1	45,2 ± 2,2
Samidal Leikanger	64,9 ± 0,1	834,1 ± 10,8	556,1 ± 7,2	73,2 ± 0,7	50,1 ± 0,7
Sampo Leikanger	53,7 ± 4,0	740,6 ± 63,6	493,7 ± 42,4	77,5 ± 9,2	54,4 ± 4,0
Sambu Leikanger	47,6 ± 2,6	811,7 ± 11,0	541,1 ± 7,3	81,4 ± 9,3	54,2 ± 0,3
Samnor Leikanger	20,6 ± 0,4	355,2 ± 3,0	236,8 ± 2,0	73,3 ± 2,2	53,3 ± 0,8
Gjennomsnitt for Leikanger '14^f	39,8 ± 19,1	650,9 ± 182,4	433,9 ± 121,6	79,7 ± 11,6	47,8 ± 9,6
Sampo Eiker	22,7 ± 1,1	295,9 ± 5,8	197,3 ± 3,9	94,9 ± 7,9	45,7 ± 2,9
Sambu Eiker	45,9 ± 1,0	782,0 ± 14,9	521,3 ± 9,9	97,9 ± 1,9	53,3 ± 0,7
Samnor Eiker	48,3 ± 0,3	609,0 ± 10,6	406,0 ± 7,1	76,3 ± 2,4	38,9 ± 0,2
Sampo Fresvik	59,3 ± 2,2	646,6 ± 40,0	431,0 ± 26,4	93,3 ± 0,6	40,1 ± 3,3
Gjennomsnitt^g	30,8 ± 19,6	495,7 ± 228,8	330,5 ± 152,5	63,9 ± 29,0	46,8 ± 10,0
^a Verdier er gjennomsnitt av to målinger ± SD; ^b Cy-3-sam-5-glu, cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid; ^c Cy-3,5-diglu, cyanidin-3,5-diglukosid; ^d Cy-3-sam, cyanidin-3-sambubiosid; ^e Cy-3-glu, cyanidin-3-glukosid; ^f Gjennomsnitt av seks målinger ± SD; ^g Gjennomsnitt av 16 målinger ± SD					

Tabell 5.7. viser at det var høyere innhold av samtlige målte polyfenoler, med unntak av klorogensyre, i ekstrakter høstet i 2014 sammenliknet med 2013. Innholdet av de fire antocyaninene målt i denne oppgaven økte med gjennomsnittlig 133 % fra 2013 til 2014. Innhold av rutin økte med 167 % fra 2013 til 2014, mens innhold av klorogensyre var stabilt. Det var store variasjoner i innhold av polyfenolene mellom både sort og dyrkested, men ingen prøve som pekte seg ut hvis ekstrakt fra

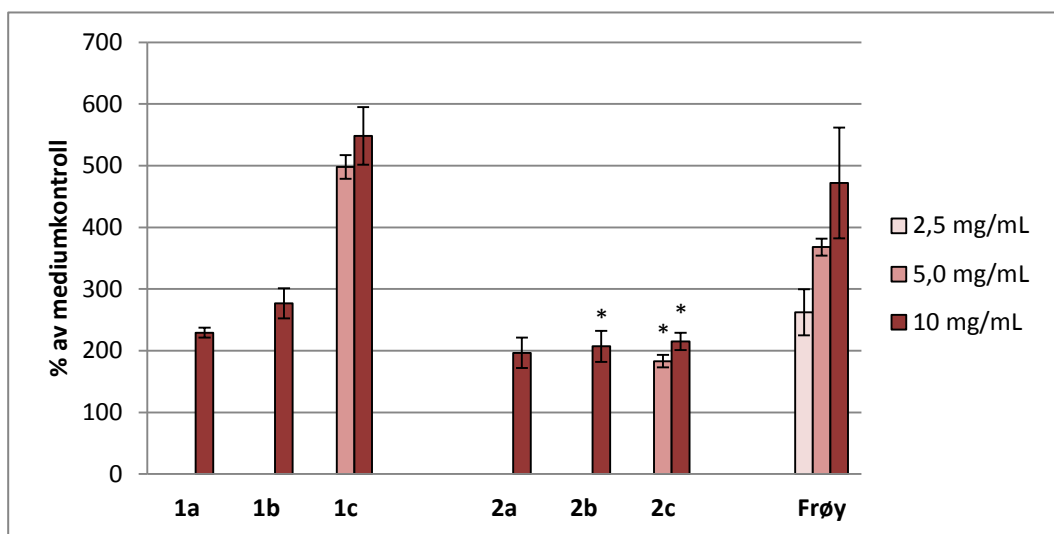
både 2013 og 2014 skal vurderes sammen. Ved å se på 2014 alene hadde ekstrakter fra sortene Samidal, Sampo og Sambu dyrket i Leikanger og Sambu dyrket i Eiker et noe høyere innhold av antocyaniner enn de andre tre sortene.

5.3. Effekt av prosessert saft på NF- κ B-aktivitet og analyse av innholdsstoffer

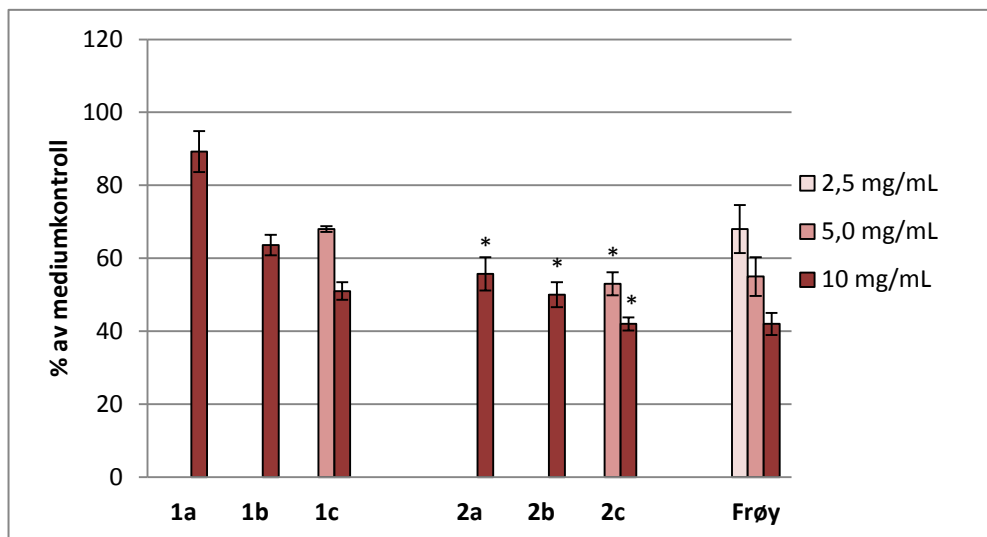
For å etterlikne industriell produksjon av saft ble svarthyllbær av sorten Sampo høstet i 2014 i Fresvik presset ved bruk av hydropresse (se punkt 4.1.3.). Det ble laget safter og konsentrater for å se på effekt av varmebehandling før pressing, pasteurisering og konsentrering. Konsentratene ble konsentrert til ca. dobbel styrke på bakgrunn av °Brix-verdi. Et kommersielt svarthyllkonsentrat som selges som helsekost (Frøy) ble også testet. Frøy var konsentrert til firedobbel styrke.

5.3.1. Effekt på NF- κ B-aktivitet

Saftene og konsentratene fra prosesseringen av sorten Sampo og helsekostproduktet Frøy ble testet for deres evne til å modulere basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Figur 5.21. viser effekten av de ulike prøvene på basal NF- κ B-aktivitet, og Figur 5.22. viser effekten av de ulike prøvene på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.21.: Effekt på basal NF- κ B-aktivitet av safter og konsentrater fra prosesseringsforsøket og det kommersielle helsekostproduktet Frøy. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble inkubert med de ulike prøvene i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. 1 = ikke varmebehandlet før pressing; 2 = varmebehandlet før pressing; a = presset saft; b = presset og pasteurisert saft; c = presset, konsentrert og pasteurisert saft. Konsentrasjonene er i mg prøve/mL cellemedium. Konsentratene ble konsentrert til ca. dobbel styrke på bakgrunn av °Brix-verdi. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) på varmebehandlede prøver (2a-c) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra prøver som ikke var varmebehandlet før pressing (1a-c).



Figur 5.22.: Effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av safter og ekstrakter fra prosesseringsforsøket og det ferdig produserte helsekostproduktet Frøy. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble inkubert med de ulike prosesserte saftene. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. 1 = ikke varmebehandlet før pressing; 2 = varmebehandlet før pressing; a = presset saft; b = presset og pasteurisert saft; c = presset, konsentrert og pasteurisert saft. Konsentrasjonene er i mg prøve/mL cellemedium. Konsentratene ble konsentrert til ca. dobbel styrke på bakgrunn av °Brix-verdi. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 forsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) på varmebehandlede prøver (2a-c) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra prøver som ikke var varmebehandlet før pressing (1a-c).

Alle de prosesserte prøvene hadde signifikant evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet (ikke vist i figur). Figur 5.21. viser at varmebehandling før pressing ga ingen (2a) eller negativ (2b og 2c) effekt på basal NF- κ B-aktivitet sammenliknet med prøvene som ikke ble varmebehandlet før pressing (1a-c). Konsentratene (1c og 2c) hadde en svak doseavhengig effekt. Konsentrat av bær som ikke var varmebehandlet før pressing (1c) ga en signifikant positiv effekt på basal NF- κ B-aktivitet av konsentreringen, mens konsentrat fra den varmebehandlede batchen (2c) ga ingen signifikant effekt av konsentrering sammenliknet med saft som ikke var konsentrert (2b).

Helsekostproduktet Frøy ga en signifikant doseavhengig stimulering av NF- κ B-aktivitet i forhold til mediumkontroll (ikke vist i figur).

Alle de prosesserte prøvene hadde signifikant evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, og effekten av konsentratene på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet er doseavhengige (ikke vist i figur). Figur 5.22. viser at varmebehandling før pressing (2a-c) ga en signifikant effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet sammenliknet med prøvene som ikke ble varmebehandlet før pressing (1a-c). Konsentratene (1c og 2c) hadde en svak doseavhengig effekt.

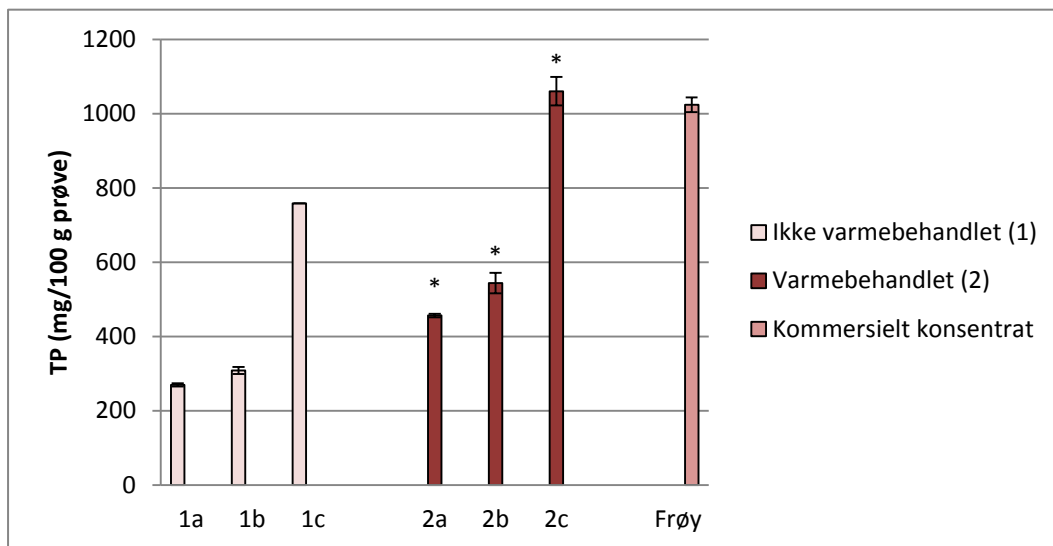
Helsekostproduktet Frøy ga en signifikant doseavhengig nedgang av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet i forhold til mediumkontroll (ikke vist i figur).

5.3.2. Innhold av TP, TMA, sukkerer, syrer og polyfenoler i prosesserte safter

Frøy og alle seks prøver fra prosesseringsforsøket ble analysert for deres innhold av TP, TMA, sukkerer, syrer og polyfenoler.

Innhold av TP i prosesserte safter

Prosesseringssaftene ble analysert for deres innhold av TP ved bruk av Folin-Ciocalteaus metode som beskrevet i punkt 4.3.1. Resultatene vises i Figur 5.23.

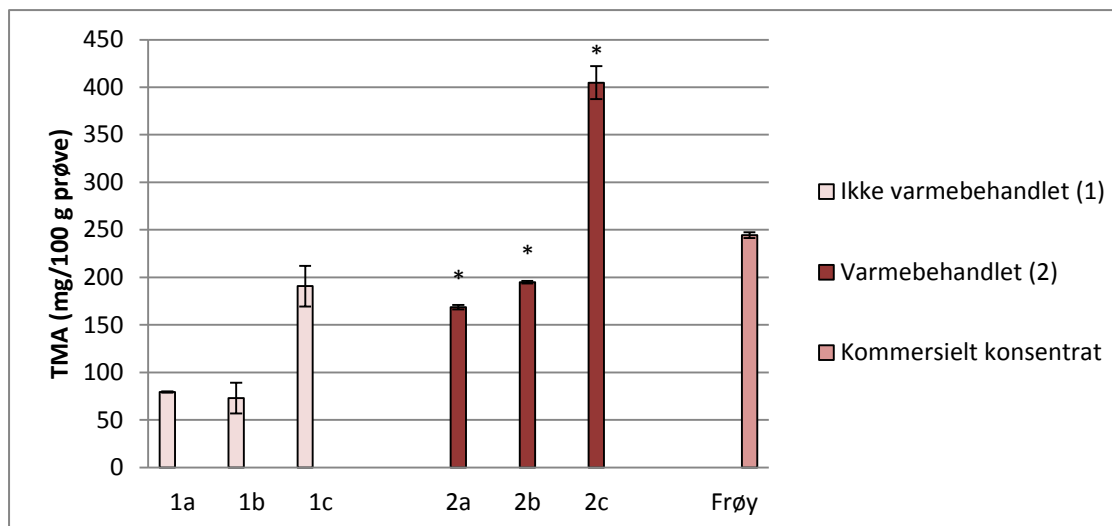


Figur 5.23.: Innhold av TP i prosesserte safter. 1 = ikke varmebehandlet før pressing; 2 = varmebehandlet før pressing; a = presset saft; b = presset og pasteurisert saft; c = presset, konsentrert og pasteurisert saft. Konsentratene ble konsentrert til ca. dobbel styrke på bakgrunn av °Brix-verdi. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram prøve. Stjerne (*) på varmebehandlede prøver (2a-c) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra prøver som ikke var varmebehandlet før pressing (1a-c).

Figur 5.23. viser at innhold av TP var signifikant høyere i de prøvene som ble varmebehandlet før pressing (2a-c) sammenliknet med de som ikke ble varmebehandlet før pressing (1a-c). Innholdet av TP økte også etter pasteurisering for begge gruppene. Konsentrering av saften (1c og 2c) økte innholdet av polyfenoler med 146 % for 1c og 95 % for 2c sammenliknet med pasteurisert saft (1b og 2b). Frøy hadde et innhold av TP på samme nivå som konsentratet av saft som ble varmebehandlet før pressing.

Innhold av TMA i prosesserte safter

Prosesseringssaftene ble analysert for deres innhold av TMA ved bruk av pH-differensial-metoden som beskrevet i punkt 4.3.2. Figur 5.24. viser innholdet av TMA i prosesseringssaftene.



Figur 5.24.: Innhold av TMA prosesseringssaftene. 1 = ikke varmebehandlet før pressing; 2 = varmebehandlet før pressing; a = presset saft; b = presset og pasteurisert saft; c = presset, konsentrert og pasteurisert saft. Konsentratene ble konsentrert til ca. dobbel styrke på bakgrunn av °Brix-verdi. Resultatene er gjennomsnitt av paralleller \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram prøve. Stjerne (*) på varmebehandlede prøver (2a-c) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra prøver som ikke var varmebehandlet før pressing (1a-c).

Figur 5.24. viser at innholdet av TMA i prøvene som ble varmebehandlet før pressing (2a-c) hadde signifikant høyere innhold av TMA enn prøvene som ikke ble varmebehandlet før prosessering (1a-c). Pasteurisering ga signifikant økning i TMA-innhold for prøvene som ikke ble varmebehandlet før pressing (2b), mens det var ingen signifikant endring i prøvene som ikke ble varmebehandlet før pressing (1b). Konsentrering økte innholdet av TMA i begge gruppene betraktelig (1c og 2c).

Sammenliknet med de andre prøvene var innholdet av TMA i Frøy noe lavere enn forventet.

Innhold av sukker og syrer i prosesserte safter

De prosesserte saftene ble analysert for deres innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre ved bruk av HPLC som beskrevet i punkt 4.3.4. °Brix ble målt ved bruk av refraktometer, som beskrevet i punkt 4.3.5. pH i saftprøvene ble også målt. Resultatene vises i Tabell 5.8.

Tabell 5.8.: Innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre i prosesserte safter ^a.

Prøve	Glukose (g/100 g prøve)	Fruktose (g/100 g prøve)	Sitronsyre (g/100 g prøve)	Eplesyre (g/100 g prøve)	°Brix (% løselig tørrestoff) ^b	pH
Saft av bær som ikke ble varmebehandlet før pressing						
1a (Etter pressing)	1,2	3,6	0,8	0,5	10,6	3,65
1b (Etter pressing og pasteurisering)	1,2	3,6	0,8	0,6	10,3	-
1c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	2,9	8,7	1,6	1,3	23,2	-
Saft av bær som ble varmebehandlet før pressing (opp til 80 °C over 90 min.)						
2a (Etter pressing)	1,3	3,9	0,9	0,6	12,2	-
2b (Etter pressing og pasteurisering)	1,4	4,0	0,9	0,6	12,5	-
2c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	3,0	9,2	1,7	1,4	26,8	-
Frøy (kommersielt helsekostprodukt)	2,8	9,2	1,7	1,3	25,2	3,71
^a n = 1; ^b Gjennomsnitt av tre målinger						

Tabell 5.8. viser at innholdet av sukker og syrer er marginalt høyere i saft som ble varmebehandlet før pressing (2a-c) sammenliknet med saft som ikke ble varmebehandlet før pressing (1a-c). De pasteuriserte saftene (1b og 2b) ble liten grad påvirket av pasteuriseringen sammenliknet med upasteurisert saft (1a og 2a). Innholdet av sukker og syrer i konsentratene (1c og 2c) økte med omtrent samme faktor som prøven ble konsentrert (2,1 ganger for saftene uten varmebehandling før pressing og 2,25 ganger for de varmebehandlede saftene).

Innhold av utvalgte polyfenoler i prosessert saft

De prosesserte saftene ble analysert for deres innhold av antocyaninene cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (Cy-3-sam-5-glu), cyanidin-3,5-diglukosid (Cy-3,5-diglu), cyanidin-3-sambubiosid (Cy-3-sam), cyanidin-3-glukosid (Cy-3-glu), flavonolet rutin og klorogensyre ved bruk av HPLC som beskrevet i punkt 4.3.4. Resultatene vises i Tabell 5.9.

Tabell 5.9.: Konsentrasjon (mg/100 g prøve) av utvalgte polyfenoler i prosesseringsafters ^a.

Prøve	Cy-3-sam-5glu ^b + Cy-3,5-diglu ^c	Cy-3-sam ^d	Cy-3-glu ^e	Rutin	Klorogensyre
Saft av bær som ikke ble varmebehandlet før pressing					
1a (Etter pressing)	25,3	76,2	50,8	88,7	26,9
1b (Etter pressing og pasteurisering)	26,7	99,7	66,4	114,3	38,2
1c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	63,6	196,2	130,8	96,2 ^f	100,1
Saft av bær som ble varmebehandlet før pressing (opp til 80 °C over 90 min.)					
2a (Etter pressing)	34,4	198,4	132,3	240,9	40,4
2b (Etter pressing og pasteurisering)	39,4	231,7	154,4	133,1	47,1
2c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	81,7	438,0	292,0	295,9	103,6
Frøy (kommersielt helsekostprodukt)	44,0	229,8	153,2	314,5	123,5
^a n = 1; ^b Cy-3-sam-5-glu, cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid; ^c Cy-3,5-diglu, cyanidin-3,5-diglukosid; ^d Cy-3-sam, cyanidin-3-sambubiosid; ^e Cy-3-glu, cyanidin-3-glukosid ^f usikkert resultat					

Tabell 5.9. viser at saftene som ble varmebehandlet før pressing (2a-c) hadde et høyere innhold av de utvalgte polyfenolene i forhold til saftene som ble presset direkte (1a-c). Spesielt cyanidin-3-sambubiosid og cyanidin-3-glukosid hadde ekstra høye verdier i saftene som ble varmebehandlet før pressing (2a-c). Det var også et høyere innhold av de utvalgte polyfenolene i pasteurisert saft (1b og 2b) sammenliknet med upasteurisert saft (1a og 2a).

5.4. Effekt av ulike innholdsstoffer i svarthyllbær på NF-κB-aktivitet

For å prøve å bestemme hvilke komponenter i svarthyllbær som gir en immuneffekt ble ulike fraksjoner av saften testet for deres evne til å endre NF-κB-aktivitet. I tillegg ble seks innholdsstoffer som svarthyllbær inneholder mye av testet for deres evne til å modulere NF-κB-aktivitet; sukker (glukose), syre (sitronsyre), antocyanin (cyanidin-3-glukosid), hydroksykaneltsyre (klorogensyre) og flavonol (rutin).

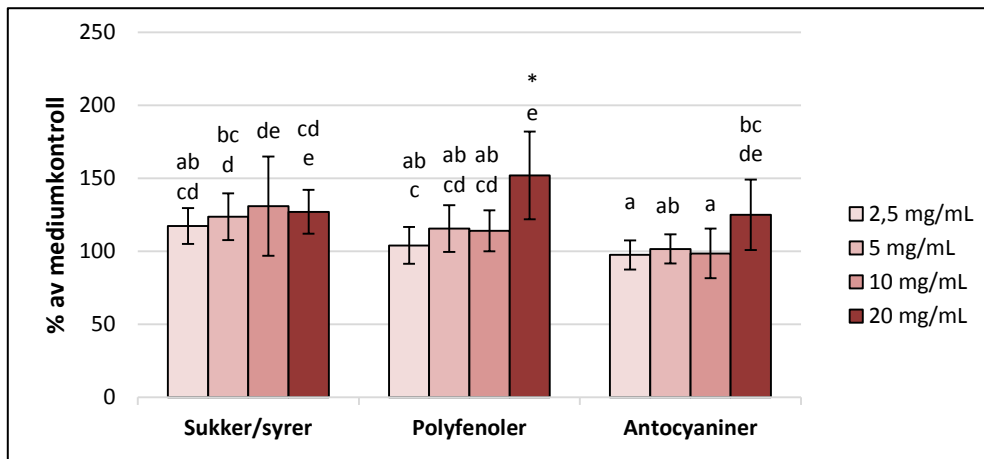
5.4.1. Fraksjonering av fire prøver svarthyllsaft

Safter av sortene Samidan og Samyl dyrket i Leikanger i 2013, Sampo dyrket i Leikanger i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik 2014 ble valgt ut for fraksjonering. Sukker/syre-fraksjon, polyfenolfraksjon og antocyaninfraksjon ble eluert ved bruk av en C18 – SepPak-kolonne og ulike løsningsmidler, beskrevet i punkt 4.1.4. De ulike fraksjonene ble også analysert for innhold av TP, og antocyanin-

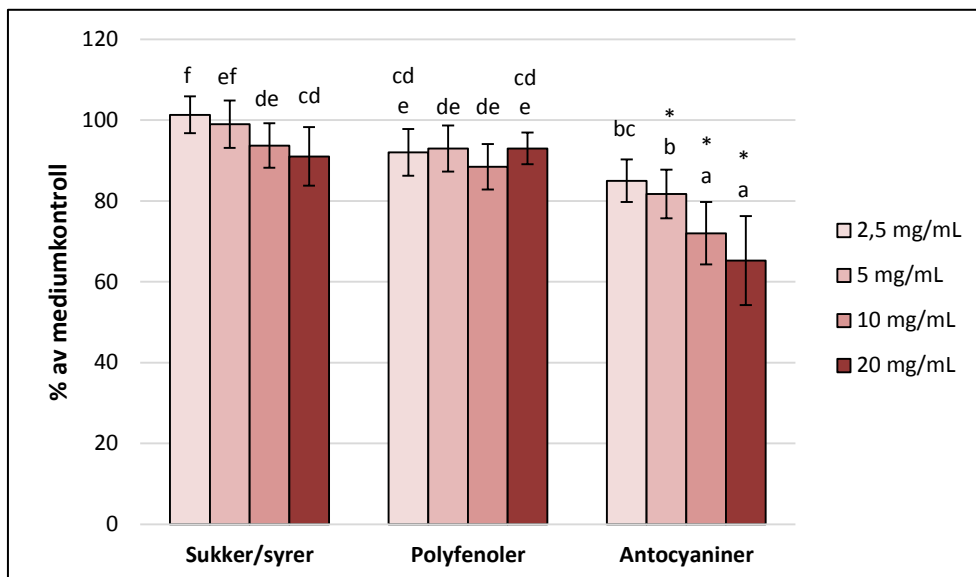
fraksjonene ble analysert for TMA.

Effekt på NF- κ B-aktivitet av fraksjoner

Figur 5.25. viser den gjennomsnittlige effekten av sukker/syre-fraksjon, polyfenolfraksjon og antocyaninfraksjon på basal NF- κ B-aktivitet av de fire prøvene i fire ulike konsentrasjoner. Figur 5.26 viser deres evne til å modulere LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.25.: Effekt på basal NF- κ B-aktivitet av sukker/syre-, polyfenol- og antocyaninfraksjonen. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble inkubert med økende konsentrasjoner av prøve i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg prøve/mL cellededium, og tilsvarer innholdet i samme mengde saft. Stolpene viser gjennomsnitt \pm SD av prosent av mediumkontroll av de fire ulike prøvene ($n \geq 12$), hvor hvert forsøk ble utført ≥ 3 ganger i triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant ($p \leq 0,05$) forskjell fra kontroll bestemt ved Dunnetts test. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.



Figur 5.26.: Effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av sukker/syre-, polyfenol- og antocyaninfraksjonen. U937 3 \times κ B-LUC-celler ble tilsatt fire konsentrasjoner av prøve. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Konsentrasjonene er i mg prøve/mL cellededium, og tilsvarer innholdet i samme mengde saft. Stolpene viser gjennomsnitt \pm SD av prosent av mediumkontroll av de fire ulike prøvene ($n \geq 12$), hvor hvert forsøk ble utført ≥ 3 ganger i triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant ($p \leq 0,05$) forskjell fra kontroll bestemt ved Dunnetts test. Ulike bokstaver indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) mellom prøvene bestemt ved Tukeys test.

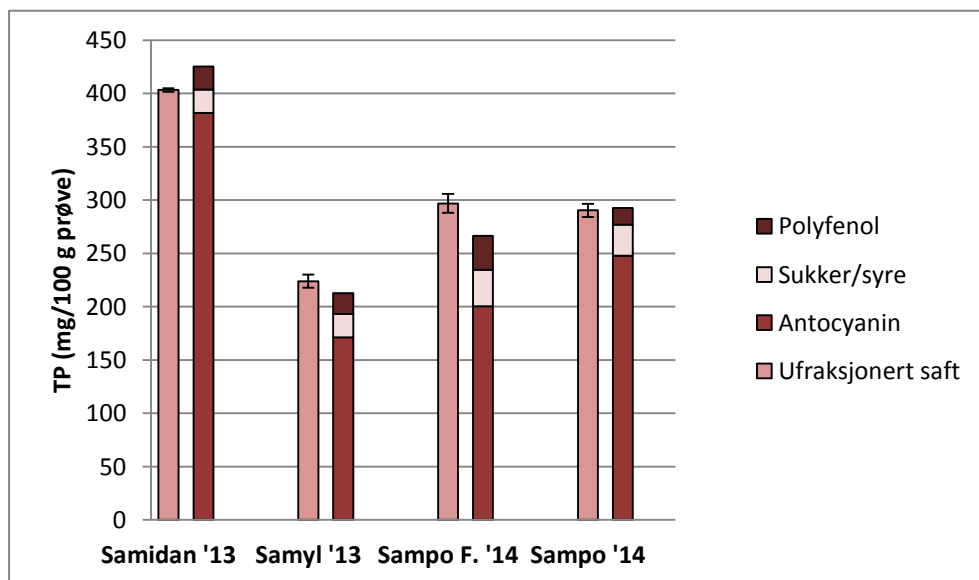
Figur 5.25. viser at kun polyfenolfraksjonen ga signifikant effekt på basal NF- κ B-aktivitet ved konsentrasjonen 20 mg/mL. Det var ingen signifikant forskjell i fraksjonenes evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet.

Figur 5.26. viser at både sukker/syrefraksjonen og antocyaninfraksjonen ga en doseavhengig effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, mens det bare var de tre sterkeste konsentrasjonene for antocyaninfraksjonen som ga en signifikant effekt fra kontroll. Mellom de ulike enkeltprøvene viser 5, 10 og 20 mg/mL av antocyaninfraksjonen signifikant bedre evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn de andre fraksjonene.

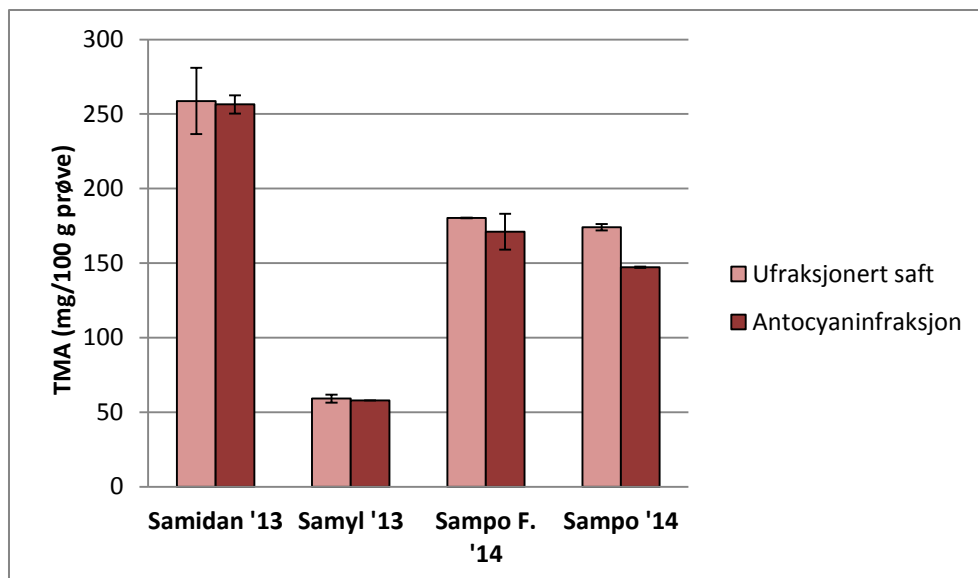
Innhold av TP, TMA, sukker, syrer og utvalgte polyfenoler i de ulike fraksjonene

Innholdet av TP, TMA, sukker/syrer og polyfenoler i de ulike fraksjonene ble analysert og sammenliknet med ufraksjonert saft av samme prøve for å sjekke om fraksjoneringen var vellykket. Sukker/syrefraksjonen, polyfenolfraksjonen og antocyaninfraksjonen av de fire saftene ble analysert for deres innhold av TP. Antocyaninfraksjonen ble analysert for TMA. Hver prøve ble sammenliknet med saft før fraksjonering fra samme prøve. Hver fraksjon ble også analysert for utvalgte sukker, syrer og polyfenoler ved bruk av HPLC.

Figur 5.27. viser innholdet av TP i antocyanin-, polyfenol- og sukker/syre-fraksjonene fra de fire utvalgte saftene, samt saft før fraksjonering. Figur 5.28. viser sammenlikning av innholdet av TMA i saft før fraksjonering mot antocyaninfraksjonen av samme saft.



Figur 5.27.: Innhold av TP i ufraksjonert saft (ensfarget stolpe) og i de ulike fraksjonene fra ulike sorter og dyrkningsår. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram prøve.



Figur 5.28.: Innhold av TMA i saft før fraksjonering og i antocyaninfraksjonen til de fire prøvene. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram prøve.

Ved å legge sammen innholdet av TP i de ulike fraksjonene kan det ses at det ikke er stor endring i innhold av TP fra saft før fraksjonering (Figur 5.27). Hovedandelen av TP i saftene er antocyaniner, og det ble også detektert TP i sukker/syrefraksjonen. Figur 5.28. viser at fraksjonert saft ikke hadde betydelig endring i antocyanininnhold.

Innhold av sukker, syrer og utvalgte polyfenoler

For en mer detaljert analyse av hva fraksjonene inneholdt ble de analysert for innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre, samt antocyaninene cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid (Cy-3-sam-5-glu), cyanidin-3,5-diglukosid (Cy-3,5-diglu), cyanidin-3-sambubiosid (Cy-3-sam), cyanidin-3-glukosid (Cy-3-glu), flavonolet rutin og klorogensyre ved bruk av HPLC som beskrevet i punkt 4.3.4. Bare fraksjonene fra Sampo fra Leikanger og Fresvik dyrket i 2014 ble testet for innhold av sukker og syrer. Resultatene vises i Tabell 5.10. og 5.11.

Tabell 5.10.: Innhold av glukose, fruktose, sitronsyre og eplesyre i utvalgte fraksjoner ^a.

Prøve	Glukose (g/100 g prøve)	Fruktose (g/100 g prøve)	Sitronsyre (g/100 g prøve)	Eplesyre (g/100 g prøve)
Sukker/syrefraksjon				
Sampo Fresvik '14	0,3	1,2	0,2	0,2
Sampo '14	0,3	0,7	0,2	0,1
Polyfenolfraksjon				
Sampo Fresvik '14	0,1	- ^b	-	-
Sampo '14	0,1	-	-	-
Antocyaninfraksjon				
Sampo Fresvik '14	0,1	-	-	-
Sampo '14	0,1	-	-	-
^a n = 1; ^b -, ikke detekterbar mengde				

Tabell 5.11.: Konsentrasjon (mg/100 g prøve) av utvalgte polyfenoler i de ulike fraksjonene ^a.

Prøve	Cy-3-sam-5-glu ^b + Cy-3,5-diglu ^c	Cy-3-sam ^d	Cy-3-glu ^e	Rutin	Klorogensyre
Sukker/syrefraksjon					
Samidan '13	- ^f	-	-	-	-
Samyl '13	-	-	-	-	-
Sampo Fresvik '14	17,6	-	-	-	-
Sampo '14	-	2,0	1,3	-	-
Polyfenolfraksjon					
Samidan '13	-	-	-	-	-
Samyl '13	-	-	-	2,0	4,5
Sampo Fresvik '14	-	-	-	6,7	9,0
Sampo '14	-	-	-	8,3	28,2
Antocyaninfraksjon					
Samidan '13	8,7	69,5	46,3	20,3	1,7
Samyl '13	4,6	21,8	14,6	17,5	2,3
Sampo Fresvik '14	40,4	67,7	45,1	39,9	3,2
Sampo '14	18,0	104,6	69,7	58,0	6,3
^a n = 1; ^b Cy-3-sam-5-glu, cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid; ^c Cy-3,5-diglu, cyanidin-3,5-diglukosid; ^d Cy-3-sam, cyanidin-3-sambubiosid; ^e Cy-3-glu, cyanidin-3-glukosid; ^f -, Ikke detekterbar mengde					

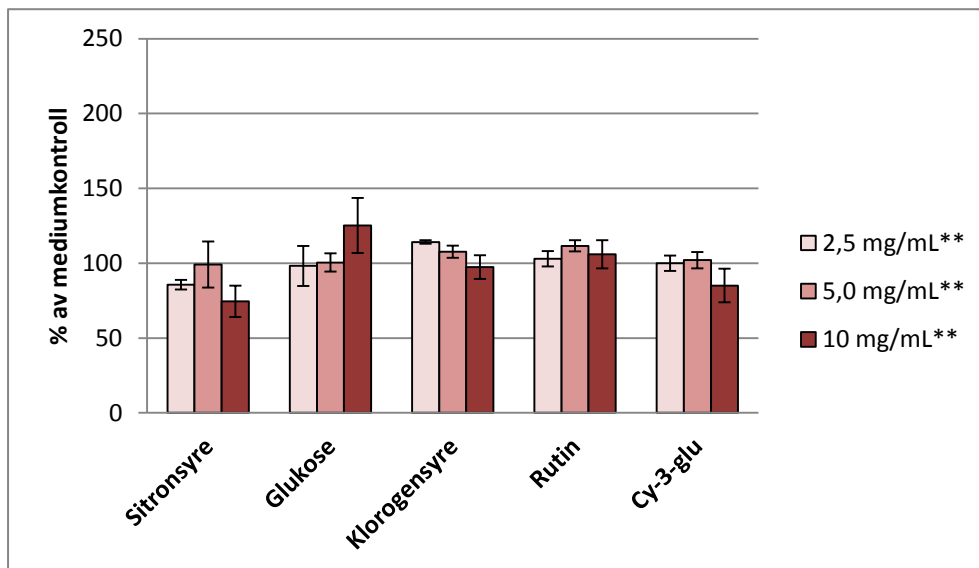
Som det fremstår av Tabell 5.10. ble sukkerne og syrene kun eluert ut i sukker/syrefraksjonen, med unntak av glukose som også ble detektert i små mengder i polyfenol- og antocyaninfraksjonen.

Tabell 5.11. viser at sukker/syre-fraksjonene inneholder lite av de analyserte polyfenolene, og polyfenolfraksjonene inneholder ikke antocyaniner. Antocyaninfraksjonene inneholder derimot en høyere andel av rutin og en liten andel klorogensyre selv om disse i utgangspunktet skulle befinne seg i polyfenolfraksjonen.

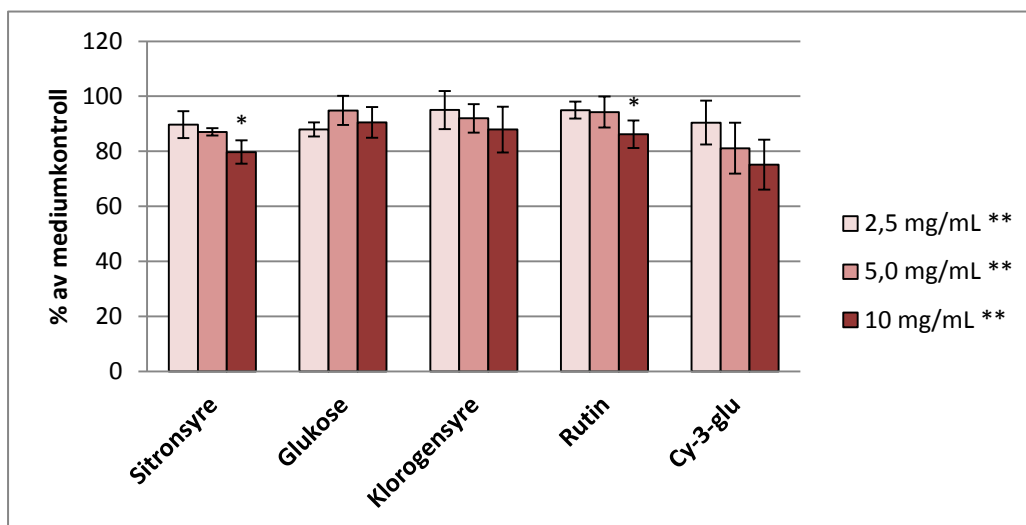
5.4.2. Effekt på NF-κB-aktivitet av ulike innholdsstoffer

For testing av enkeltkomponentenes evne til å modulere basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet ble det valgt ut et sukker (glukose), en syre (sitronsyre), et antocyanin (cyanidin-3-glukosid), en hydroksykaneltsyre (klorogensyre) og et flavonol (rutin). Dette er stoffer det er mye av i svarthyllbær.

Økende konsentrasjoner av stockløsninger av citronsyre (10,02 mg/mL), glukose (99,89 mg/mL), klorogensyre (1,08 mg/mL), rutin (1,02 mg/mL) og cyanidin-3-glukosid (1,03 mg/mL) som tilsvarer konsentrasjoner til 2,5 mg, 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium ble tilsatt cellene for å sjekke om enkeltkomponentene kunne modulere NF-κB-aktivitet, og om de hadde en doseavhengig effekt. Figur 5.29. viser effekten av de ulike enkeltkomponentene på basal NF-κB-aktivitet, og Figur 5.30. viser effekten av de ulike enkeltkomponentene på LPS-indusert NF-κB-aktivitet.



Figur 5.29.: Effekt på basal NF-κB-aktivitet av innholdsstoffer det finnes mye av i svarthyllbær. ** Cellene ble tilsatt konsentrasjoner av sitronsyre (0,025 – 0,100 mg/mL), glukose (0,250 – 1,000 mg/mL), klorogensyre (0,003 – 0,011 mg/mL), rutin (0,003 – 0,011 mg/mL) og cyanidin-3-glukosid (0,003 – 0,011 mg/mL) som tilsvarer de konsentrasjoner som kan finnes i 2,5 mg, 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium. U937 3κκB-LUC-celler ble inkubert med økende konsentrasjoner av stoffene i 6,5 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 forsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Ingen prøve var signifikant forskjellig ($p \leq 0,05$) fra kontroll ved bruk av Dunnetts test.

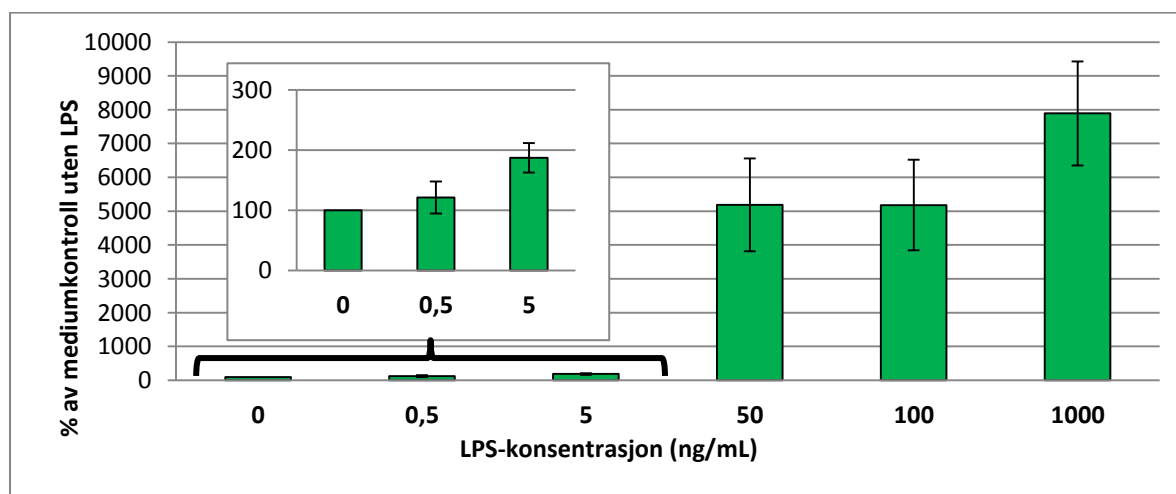


Figur 5.30.: Effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet av innholdsstoffer det finnes mye av i svarthyllbær. ** U937 3κκB-LUC-cellene ble tilsatt konsentrasjoner av sitronsyre (0,025 – 0,100 mg/mL), glukose (0,250 – 1,000 mg/mL), klorogensyre (0,003 – 0,011 mg/mL), rutin (0,003 – 0,011 mg/mL) og cyanidin-3-glukosid (0,003 – 0,011 mg/mL) som tilsvarer de konsentrasjoner som kan finnes i 2,5 mg, 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF-κB-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 forsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra kontroll ved bruk av Dunnetts test.

Ingen av de seks innholdsstoffene hadde signifikant evne til å modulere basal NF-κB-aktivitet (Figur 5.29.). Ved effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet (Figur 5.30.) ga sitronsyre og rutin en signifikant hemming ved konsentrasjon tilsvarende 10 mg saft /mL cellemedium, mens cyanidin-3-glukosid ga signifikant hemming både ved konsentrasjoner tilsvarende 5,0 mg og 10 mg saft/mL cellemedium, og hadde en klar doseavhengig effekt.

5.5. Stimulering av basal NF- κ B-aktivitet på grunn av LPS-kontaminering

For å teste LPS-sensitiviteten til U937 $3\times\kappa$ B-LUC-celle ble benyttet i denne oppgaven ble ulike konsentrasjoner LPS (0 ng, 0,5 ng, 5 ng, 50 ng, 100 ng og 1000 ng LPS/mL cellemedium) inkubert med cellene i 6 timer. Figur 5.31. viser at basal NF- κ B-aktivitet økte med økt konsentrasjon tilsatt LPS. Ved tilsatt 0,5 ng LPS/mL cellemedium økte NF- κ B-verdien sammenliknet med kontroll til 121 ± 26 %, mens tilsatt 5 ng LPS/mL cellemedium ga en effekt på 187 ± 24 % fra kontroll. LPS ga en signifikant økning av NF- κ B-aktiviteten fra tilsatt konsentrasjon på 5 ng LPS/mL cellemedium og høyere i forhold til saftenes evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet. Konsentrasjon på 1000 ng LPS/mL cellemedium økte NF- κ B-aktiviteten nesten 80 ganger sammenliknet med basal NF- κ B-aktivitet.



Figur 5.31.: Effekt av ulike konsentrasjoner av LPS på basal NF- κ B-aktivitet. U937 $3\times\kappa$ B-LUC-celler ble inkubert med ulike konsentrasjoner av LPS og inkubert i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt \pm SD (n = 7).

5.5.1. Effekt av LPS-kontaminering på basal NF- κ B-aktivitet

Da svært lave konsentrasjoner LPS viste å gi en signifikant effekt på den basale NF- κ B-aktiviteten til cellene ble LPS-konsentrasjonen i utvalgte prøver målt ved bruk av EndoZyme[®] recombinant Factor C (rFC) Assay Kit, som beskrevet i punkt 4.3.3. Resultatene vises i Tabell 5.12.

Tabell 5.12.: Innhold av LPS i utvalgte ufortynnede prøver ^a. Konsentrasjon av LPS i cellemediumet er for safter, prosesseringssafter, fraksjoner og filtrater 100 ganger lavere enn tall oppgitt i tabell ved konsentrasjoner på 10 mg prøve/mL cellemedium. For ekstraktene er konsentrasjonen av LPS i cellemediumet 20 ganger lavere enn tall oppgitt i tabell ved konsentrasjoner på 10 mg ekstrakt/mL cellemedium.

Prøve	LPS (ng/mL)	SD
Saft		
Samidan '13	52,83	3,49
Samyl '13	416,35	29,32
Samidal '13	51,29	1,13
Sampo '13	21,64	2,58
Sambu '13	142,33	17,29
Samnor '13	67,71	17,08
Samidan '14	3,86	0,57
Samyl '14	6,62	0,19
Samidal '14	13,8	7,62
Sampo '14	147,65	12,01
Sambu '14	26,92	6,36
Samnor '14	11,01	0,89
Sampo Eiker	308,51	5,27
Sambu Eiker	63,81	14,12
Sampo Fresvik	25,34	1,59
Prosessering		
Ikke varmebehandlet før pressing		
1a (Etter pressing)	259,58	2,43
1b (Etter pressing og pasteurisering)	271,06	26,61
1c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	550,01	42,41
Varmebehandlet før pressing		
2a (Etter pressing)	254,33	5,50
2b (Etter pressing og pasteurisering)	293,95	39,79
2c (Etter pressing, konsentrering og pasteurisering)	370,69	87,18
Ekstrakt		
Samidan '13	0,02	0,01
Sampo '13	0,01	0,00
Samnor '13	0,03	0,01
Samidan '14	0,00	
Sampo '14	0,01	0,00
Sambu '14	0,26	0,00
Fraksjoner		
SS ^b Samidan '13	4,67	0,14
PP ^c Samidan '13	0,49	0,57
AC ^d Samidan '13	0,97	0,33

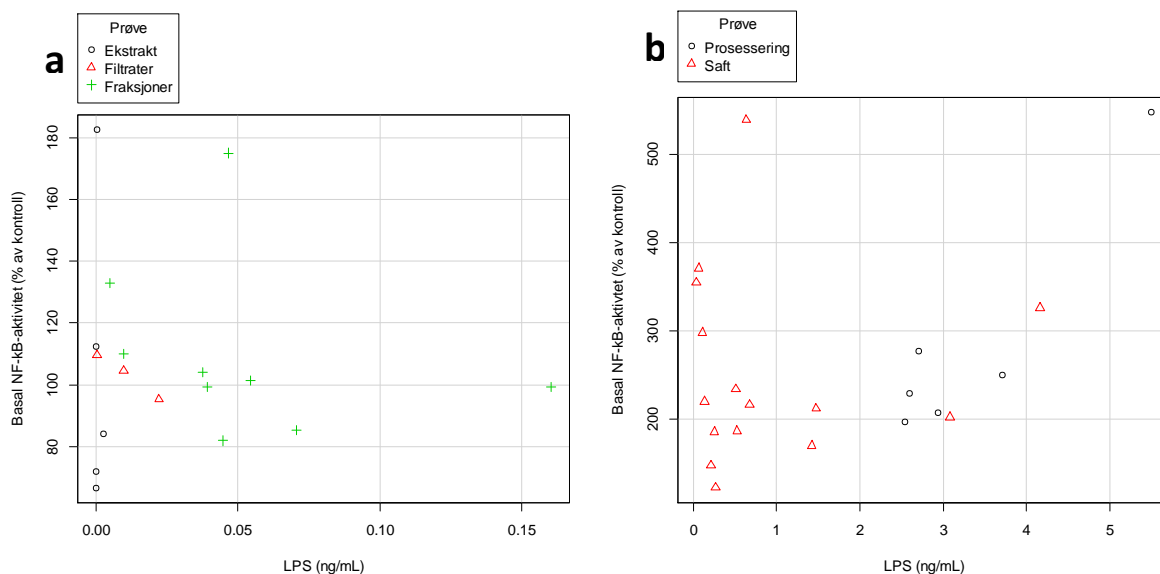
Fortsettelse Tabell 5.12.

Prøve	LPS (ng/mL)	SD
SS Sampo '14	3,93	2,03
SS Sampo Fresvik	16,04	3,68
PP Sampo '14	5,45	2,15
PP Sampo Fresvik	3,75	1,77
AC Sampo '14	4,47	1,27
AC Sampo Fresvik	7,07	4,44

^a Gjennomsnitt av to målinger; ^b SS, sukker/syrefraksjon; ^c PP, polyfenolfraksjon; ^d AC, antocyaninfraksjon

Tabell 5.12. viser at saftene og saftene fra prosesseringsforsøket generelt har høyere innhold av LPS enn ekstraktene og fraksjonene. Det var interessant å undersøke om det var en korrelasjon mellom innhold av LPS og prøvenes evne til å modulere NF-κB-aktivitet.

Korrelasjon mellom LPS- innhold og basal NF-κB-aktivitet er vist i Figur 5.32. For enklere å illustrere spredningen i prøver med lavt innhold av LPS (ekstrakt, filtrat og fraksjoner) ble det laget to grafer. De statistiske beregningene er gjort på alle prøvene samlet.



Figur 5.32.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom LPS-innhold i ekstrakter, filtrater og fraksjoner, saft og prosesserte safter og deres evne til å modulere basal NF-κB-aktivitet i U937 3xκB-LUC-celler ved konsentrasjon 10 mg prøve/mL cellemedium. (a) viser sammenheng mellom prøver med LPS-konsentrasjon < 0,18 ng/mL cellemedium og effekt på basal NF-κB-aktivitet. (b) viser sammenheng mellom prøver med LPS-konsentrasjon < 6 ng/mL cellemedium og effekt på basal NF-κB-aktivitet. Det er benyttet Pearsons produkt-moment korrelasjonskoeffisient), n = 38. LPS-verdien er gjennomsnitt av to målinger. NF-κB-verdien er gjennomsnitt av ≥3 forsøk, utført i triplikater.

Figur 5.32. viser at saft- og prosesseringsprøvene generelt hadde høyere innhold av LPS enn ekstraktene, fraksjonene og filtratene, som hadde et LPS-innhold på høyest 0,15 ng/mL cellemedium ved tilsatt 10 mg prøve/mL cellemedium. Statistiske beregninger viste at det var en positiv korrelasjon mellom LPS-innhold og basal NF-κB-aktivitet (p -verdi < 0,001, $r = 0,55$). Lav r -verdi

indikerer at LPS-innholdet i prøvene ikke kan forklare sammenhengen alene, men den lave p -verdien forteller at prøvenes innhold av LPS kunne være en av faktorene som ga økt basal NF- κ B-aktivitet.

5.5.2. Effekt av sterilfiltrering av saft på basal NF- κ B-aktivitet, TP og TMA

Da det ble målt høy konsentrasjon av LPS i noen av saftprøvene og prosesseringsaftene var det av interesse å finne ut om LPS-innholdet i prøvene hadde en medvirkning til de basale NF- κ B-resultatene tidligere målt. Samyl dyrket i Leikanger i 2013 og 2014 samt pasteurisert saft som ikke var varmebehandlet før pressing fra prosesseringsforsøket (1b) med varierende innhold av LPS ble valgt ut til sterilfiltrering for å fjerne LPS i prøven. Tabell 5.13. viser innhold av LPS i de filtrerte og ufiltrerte saftprøvene.

Tabell 5.13.: LPS-innhold i tre utvalgte prøver før og etter sterilfiltrering ^a.

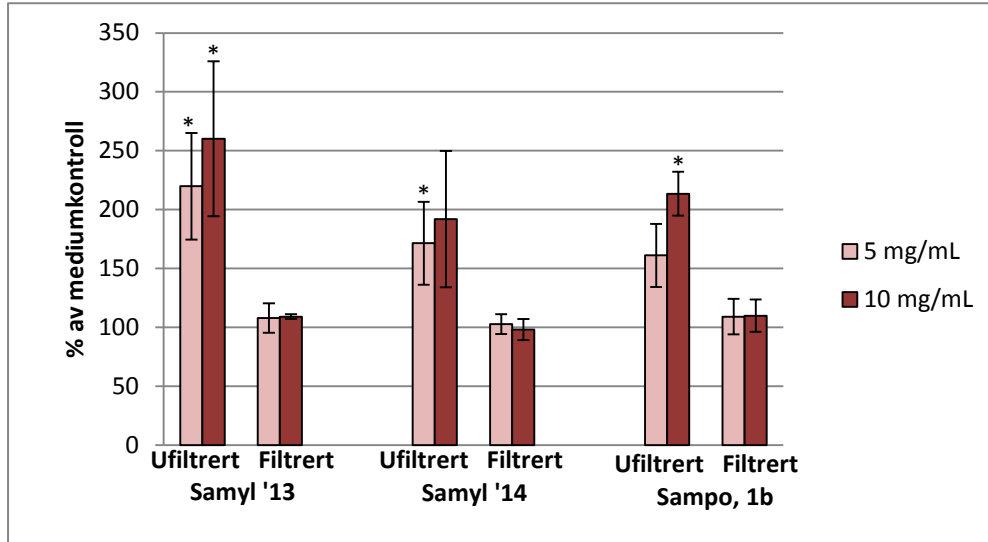
Prøve	Ikke sterilfiltrert	Sterilfiltrert	% nedgang i LPS-innhold
Saft Samyl '13	416,35 ± 29,32	0,97 ± 0,04	99,77
Saft Samyl '14	6,62 ± 0,19	2,22 ± 0,26	66,4
Saft Sampo (1b) ^b	271,06 ± 26,61	- ^c	>99,9
^a Verdiene er gjennomsnitt av to målinger ± SD, og oppgitt i ng LPS/mL ufortynnet prøve; ^b Pasteurisert saft som ikke var varmebehandlet før pressing fra prosesseringsforsøket; ^c -, Ikke detekterbar mengde			

Tabell 5.13. viser at sterilfiltrering drastisk senket LPS-innholdet i saftene.

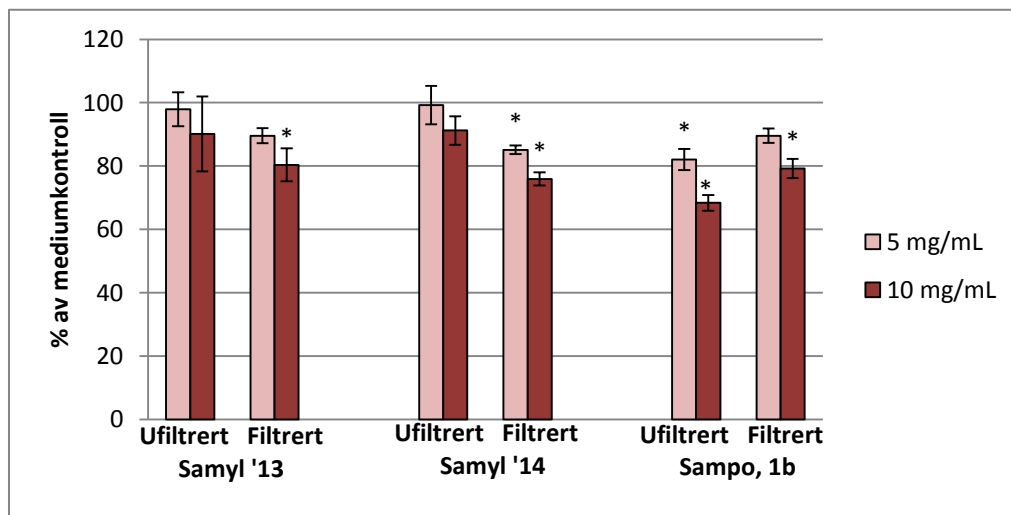
Det var dermed interessant å se om de sterilfiltrerte saftene hadde en annen effekt på basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn de ufiltrerte saftene. I tillegg ble innhold av TP og TMA analysert både før og etter filtrering for å sjekke om sterilfiltreringen påvirket disse innholdsstoffene.

Effekt av sterilfiltrering av saft på NF- κ B-aktivitet

To ulike konsentrasjoner av ufiltrert og filtrert saft ble testet for deres evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet. Resultatene vises i Figur 5.33. og 5.34.



Figur 5.33.: Effekt på basal NF- κ B-aktivitet av saft før (ufiltrert) og etter (filtrert) sterilfiltrering. Saft av sortene Samyl 2013, Samyl 2014 og den prosesserte saften Sampo 1b (pasteurisert saft uten varmebehandling før pressing) ble testet. U937 3 κ B-LUC-celler ble inkubert med saft eller sterilfiltrert saft i to ulike konsentrasjoner i 6,5 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 forsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra mediumkontroll bestemt ved Dunnetts test.



Figur 5.34.: Effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av saft før (ufiltrert) og etter (filtrert) sterilfiltrering. Saft av sortene Samyl 2013, Samyl 2014 og den prosesserte saften Sampo 1b (pasteurisert saft uten varmebehandling før pressing) ble testet. U937 3 κ B-LUC-celler ble inkubert med saft eller sterilfiltrert saft i to ulike konsentrasjoner. Etter 30 min. inkubering ble det tilsatt 1 μ g/mL LPS, og cellene ble inkubert videre i 6 timer før NF- κ B-aktiviteten ble målt. Stolpene viser gjennomsnitt av ≥ 3 forsøk \pm SD av prosent av mediumkontroll, hvor det i hvert forsøk ble utført triplikater. Stjerne (*) indikerer signifikant forskjell ($p \leq 0,05$) fra mediumkontroll bestemt ved Dunnetts test.

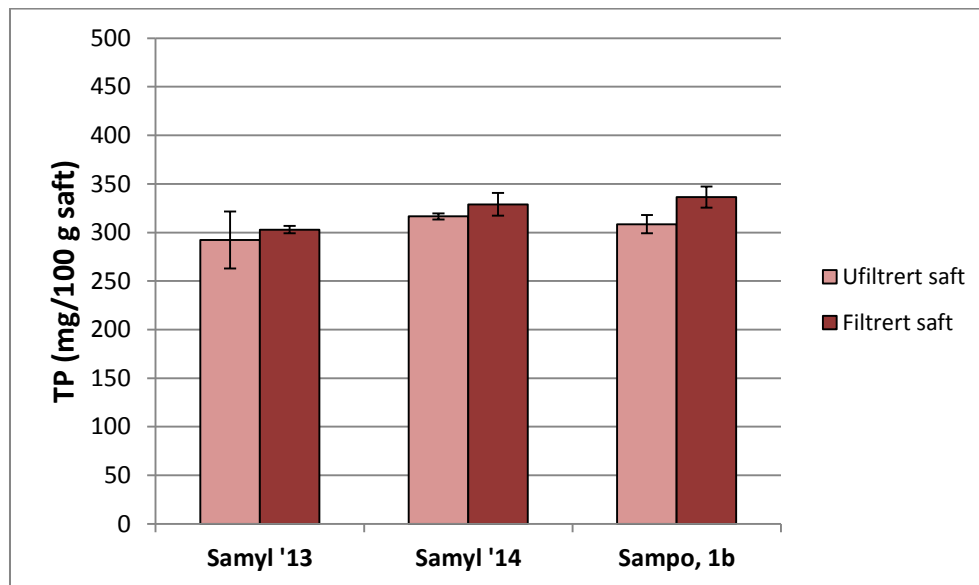
Figur 5.33. viser at ingen konsentrasjoner av de tre sterilfiltrerte saftene ga signifikant effekt på basal NF- κ B-aktivitet. Dette tyder på at filtreringen fjerner stoffer som stimulerer basal NF- κ B-aktivitet.

Figur 5.34. viser at to av de tre sterilfiltrerte prøvene hadde større effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn de ufiltrerte saftene, hvor den tredje hadde uendret eller svakere hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn ufiltrert saft fra samme prøve.

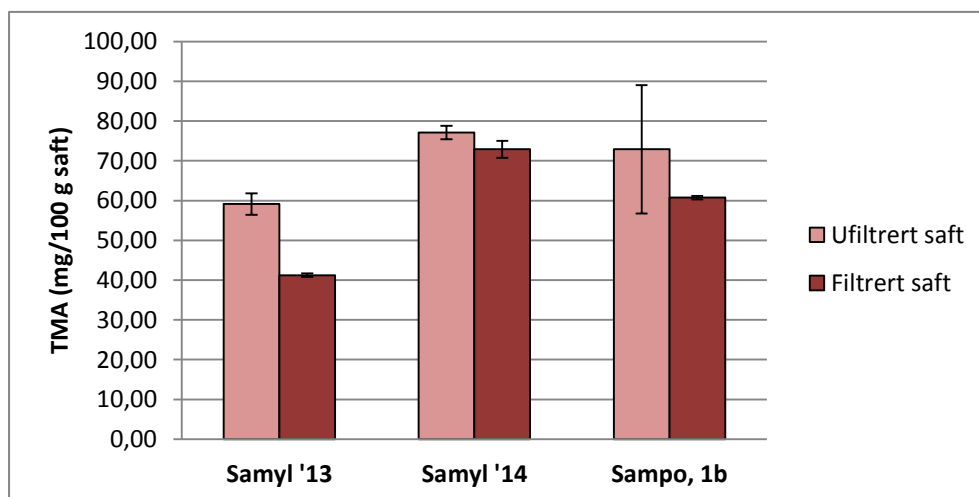
Innhold av TP og TMA og ble målt i filtratene for å sjekke om sterilfiltrering påvirker innholdet av disse stoffene.

Effekt av sterilfiltrering av saft på innhold av TP og TMA

Innhold av TP og TMA ble målt før og etter sterilfiltrering. Resultatet vises i Figur 5.35. og 5.36.



Figur 5.35.: Innhold av TP i ufiltrert og filtrert saft. Saft av sortene Samyl 2013, Samyl 2014 og den prosesserte saften Sampo 1b (pasteurisert saft uten varmebehandling før pressing) ble analysert. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram saft.



Figur 5.36.: Innhold av TMA i ufiltrert og filtrert saft. Saft av sortene av sortene Samyl 2013, Samyl 2014 og den prosesserte saften Sampo 1b (pasteurisert saft uten varmebehandling før pressing) ble analysert. Resultatene er gjennomsnitt av to målinger \pm SD, og oppgitt i mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft.

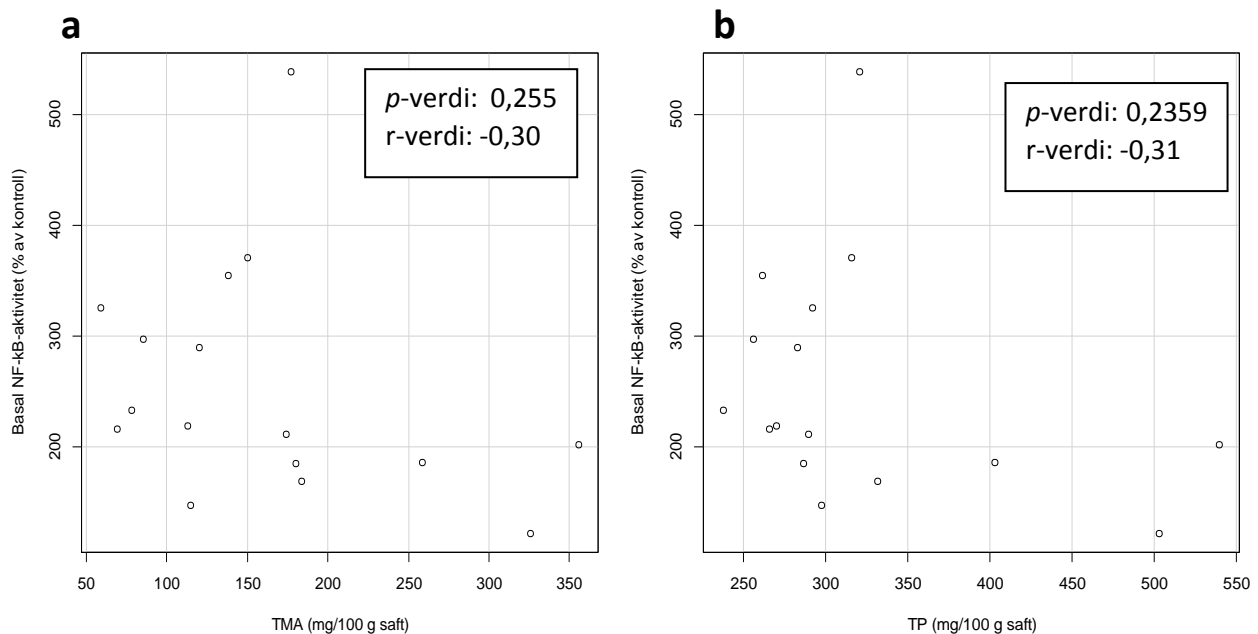
Som observert i Figur 5.35. var det ikke noen betydelig endring i innhold av TP før og etter sterilfiltrering. Det var en svak nedgang i innholdet av TMA i den sterilfiltrerte saften sammenliknet med ufiltrert saft (Figur 5.36.)

5.6. Korrelasjon mellom innhold av polyfenoler og NF- κ B-aktivitet

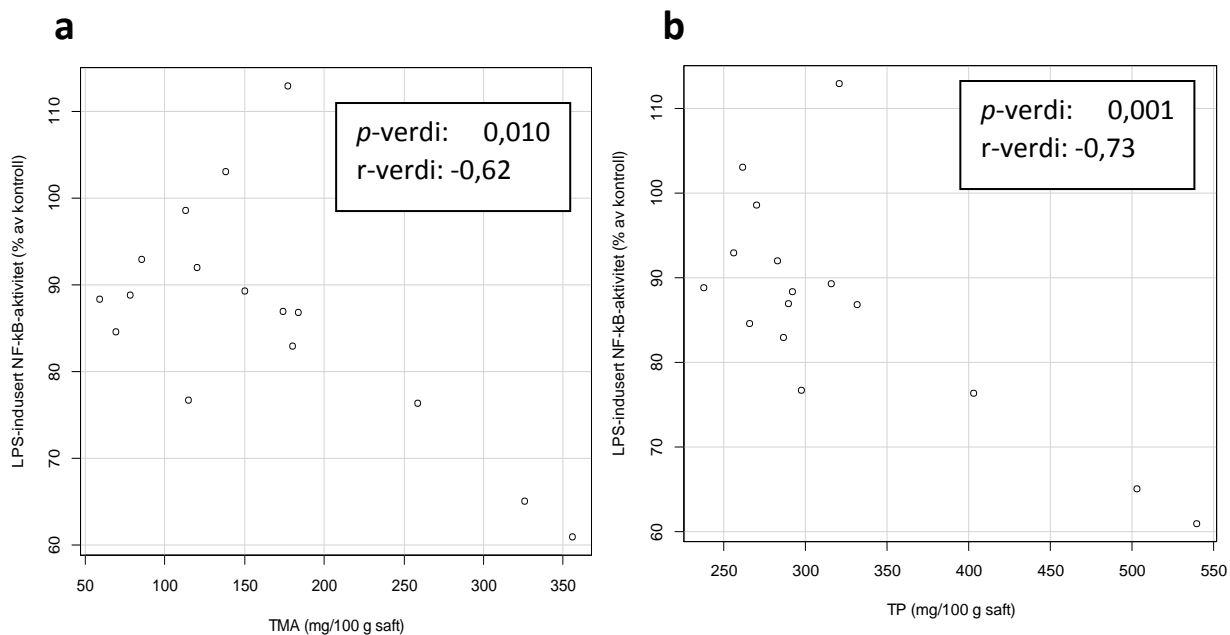
Det høye innholdet av polyfenoler antas å være hovedgrunnen til helsebringende effekter sett hos bær. For å teste om det var en lineær sammenheng mellom innhold av polyfenoler og antocyaniner og evne til å modulere NF- κ B-aktivitet ble saftene, prosesseringssaftene og ekstraktene testet for grad av korrelasjon ved bruk av Pearsons produkt-moment korrelasjon (r -verdi). På grunn av ulik behandling ble saft, prosessert saft og ekstrakter analysert separat.

5.6.1. Korrelasjon mellom saftens evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA

Effekt på basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av saft fra Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Leikanger i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor fra Eiker i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik i 2014 ble testet mot deres innhold av TP og TMA for å se om det var en sammenheng mellom innhold av TP og TMA og saftenes evne til å modulere basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Figur 5.37. viser sammenheng mellom saftenes effekt på basal NF- κ B-aktivitet, TMA (a) og TP (b), mens Figur 5.38. viser sammenheng mellom LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, TMA (a) og TP (b).



Figur 5.37.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom innhold av TMA (a) og TP (b) i saft og deres evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet i U937 3 \times κ B-LUC-celler ($n = 16$). TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft mens TP er oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram saft. Basal NF- κ B-aktivitet er gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk utført i trippletter, og er oppgitt i % av mediumkontroll.

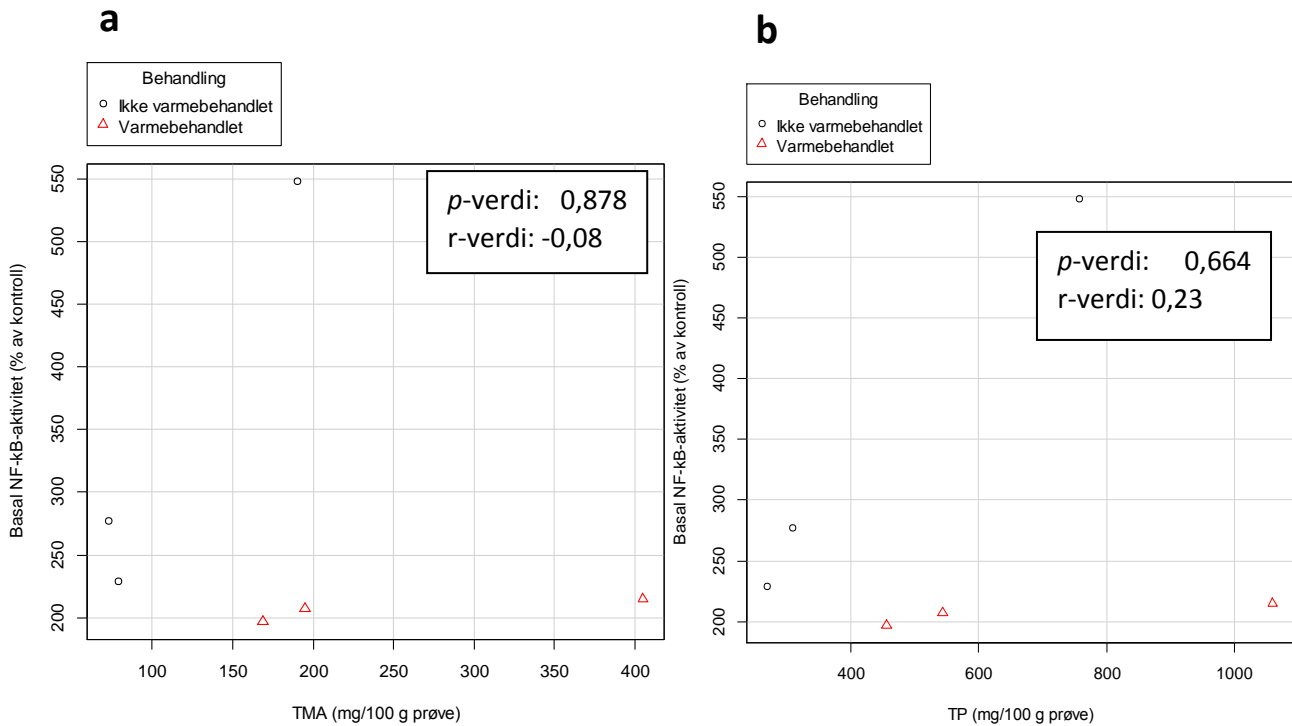


Figur 5.38.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom innhold av TMA (a) og TP (b) i saft og deres evne til å modulere LPS-indusert NF-κB-aktivitet i U937 3κB-LUC-celler (n = 16). TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft mens TP er oppgitt i mg gallesyreekvivalenter (GAE) per 100 gram saft. LPS-indusert NF-κB-aktivitet er gjennomsnitt av ≥3 celleforsøk utført i triplerter, og er oppgitt i % av mediumkontroll.

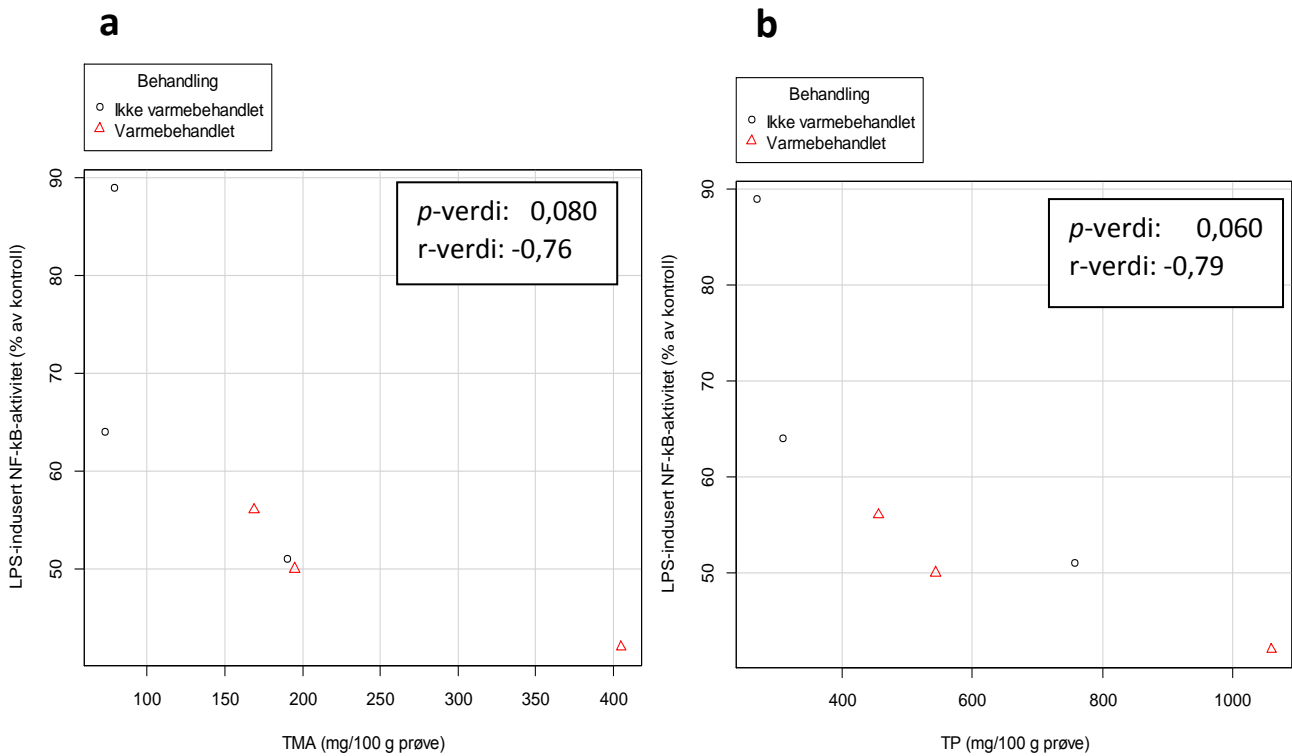
Figur 5.37. viser at det ikke var korrelasjon mellom saftenes effekt på basal NF-κB-aktivitet og deres innhold av TP og TMA. For saftenes effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA (Figur 5.38.) vises det en negativ korrelasjon med høy grad av signifikans, spesielt for TP (p -verdi = 0,001, $r = -0,73$).

5.6.2. Korrelasjon mellom prosesserte safters evne til å modulere NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA

Effekt på basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet av prosesserte safter ble testet mot deres innhold av TP og TMA for å se om det var en sammenheng mellom innhold av TP og TMA og saftenes evne til å modulere basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet. Figur 5.39. viser sammenheng mellom ekstraktens effekt på basal NF-κB-aktivitet, TMA (a) og TP (b), mens Figur 5.40. viser sammenheng mellom LPS-indusert NF-κB-aktivitet, TMA (a) og TP (b).



Figur 5.39.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom prosesserte safters innhold av TMA (a) og TP (b) og deres evne til å modulere basal NF-κB-aktivitet i U937 3κB-LUC-celler (n = 6). Varmebehandlet = saftene ble varmet opp til 80°C før pressing; ikke varmebehandlet = saftene ble presset uten varmebehandling først. TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram prøve mens TP er oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram prøve. Basal NF-κB-aktivitet er gjennomsnitt av ≥3 celleforsøk utført i tripletter, og er oppgitt i % av mediumkontroll.

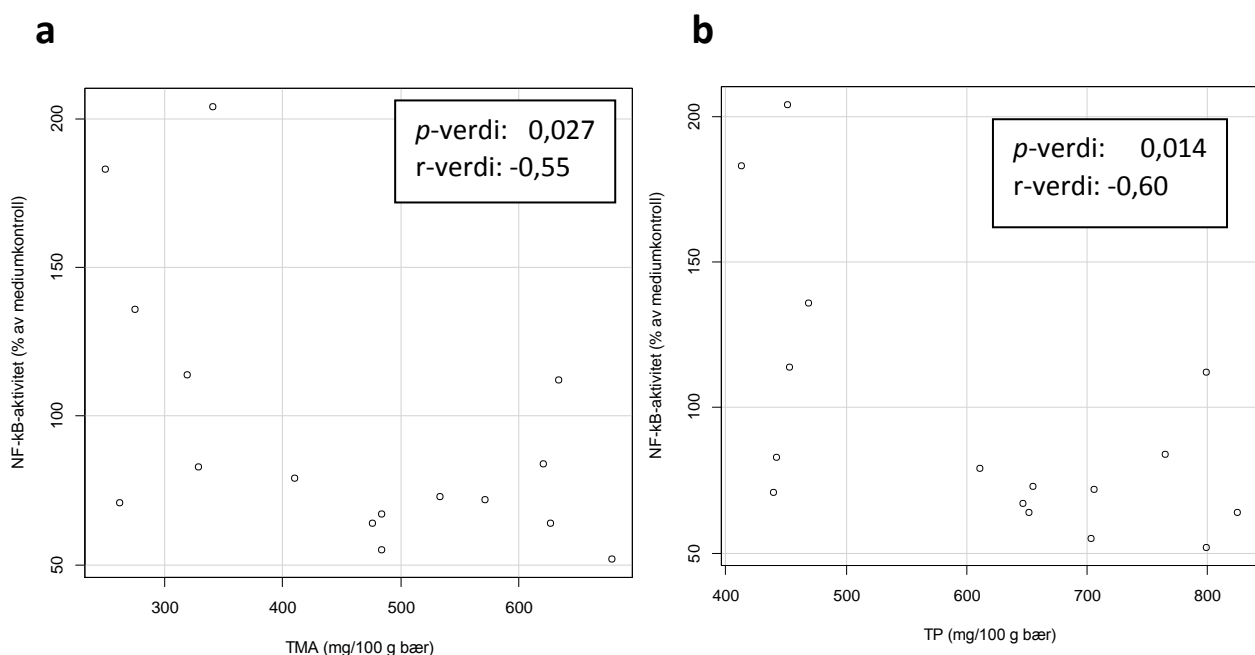


Figur 5.40.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom prosesserte safters innhold av TMA (a) og TP (b) og deres evne til å modulere LPS-indusert NF-κB-aktivitet i U937 3κB-LUC-celler (n = 6). Varmebehandlet = saftene ble varmet opp til 80°C før pressing; ikke varmebehandlet = saftene ble presset uten varmebehandling først. TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram prøve mens TP er oppgitt i mg gallesyrekvivalenter (GAE) per 100 gram prøve. Basal NF-κB-aktivitet er gjennomsnitt av ≥3 celleforsøk utført i tripletter, og er oppgitt i % av mediumkontroll.

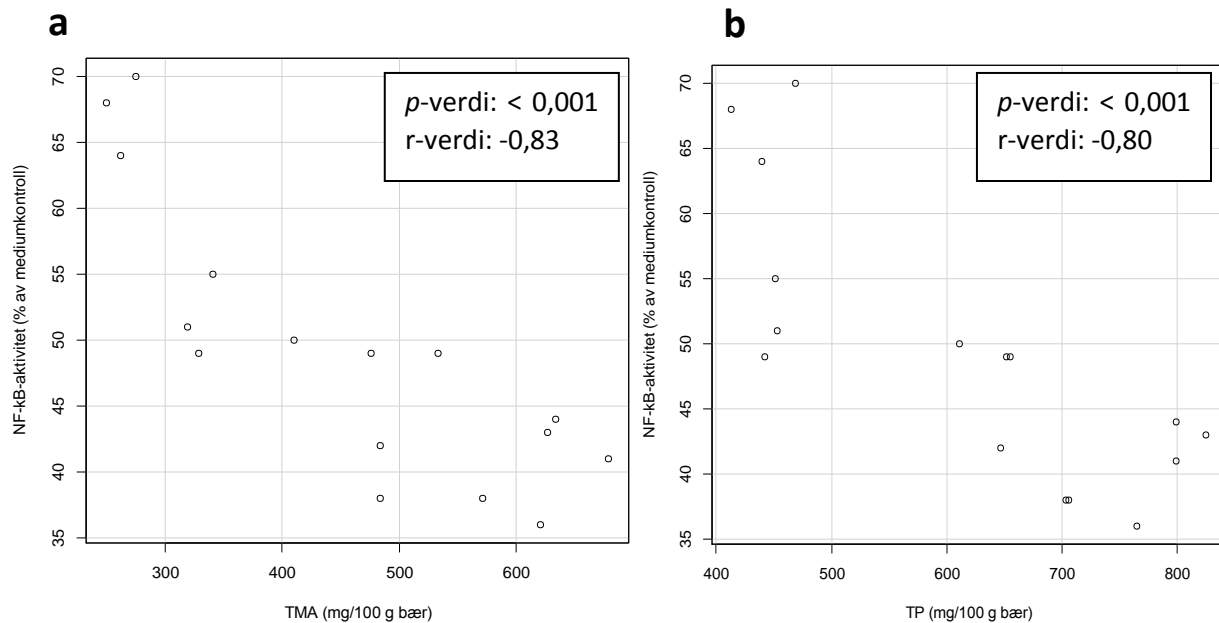
Ingen korrelasjon ble observert mellom effekt på modulering av basal NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA (Figur 5.39.). Figur 5.40. viser en korrelasjon mellom de prosesserte saftenes evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet og deres innhold av TP og TMA, men på grunn av få punkter ble det ikke en signifikant korrelasjonseffekt ved korrelasjonstesten som ble utført.

5.6.3. Korrelasjon mellom ekstraktens evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA

Effekt på basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av metanolekstrakt fra Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor dyrket i Leikanger i 2013 og 2014, Sampo, Sambu og Samnor fra Eiker i 2014 og Sampo dyrket i Fresvik i 2014 ble testet mot deres innhold av TP og TMA for å se om det var en sammenheng mellom innhold av TP og TMA og ekstraktens evne til å modulere basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Figur 5.41. viser sammenheng mellom ekstraktens effekt på basal NF- κ B-aktivitet, TMA (a) og TP (b), mens Figur 5.42. viser sammenheng mellom LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, TMA (a) og TP (b).



Figur 5.41.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom ekstraktens innhold av TMA (a) og TP (b) og deres evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet i U937 κ B-LUC-celler (n = 16). TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram bær mens TP er oppgitt i mg gallesyre-ekvivalenter (GAE) per 100 gram bær. Basal NF- κ B-aktivitet er gjennomsnitt av ≥ 3 celleforsøk utført i tripler, og er oppgitt i % av mediumkontroll.



Figur 5.42.: Pearsons produkt-moment korrelasjon mellom ekstraktens innhold av TMA (a) og TP (b) og deres evne til å modulere LPS-indusert NF-κB-aktivitet i U937 3κB-LUC-celler (n = 18). TMA og TP er gjennomsnitt av to målinger, og TMA er oppgitt som mg cyanidin-3-glukosid-ekvivalenter per 100 gram saft mens TP er oppgitt i mg gallesyre-ekvivalenter (GAE) per 100 gram saft. LPS-indusert NF-κB-aktivitet er gjennomsnitt av ≥3 celleforsøk utført i tripler, og er oppgitt i % av mediumkontroll.

Figur 5.41. og 5.42. viser at ekstraktene hadde tendens til en negativ korrelasjon mellom både basal og LPS-indusert NF-κB-aktivitet og innhold av TP og TMA. Korrelasjon mellom ekstraktens evne til å hemme LPS-indusert NF-κB-aktivitet og innhold av TMA og TP var sterkt signifikant.

6 DISKUSJON

Denne oppgaven er en del av et prosjekt finansiert av Norges Forskningsråd (NFR) hvor hovedmålet er å utvikle innovative bærprodukter med helseprofil av norskdyrket svarthyll (*Sambucus nigra*). Hovedhensikten med denne oppgaven var å måle immunologisk effekt av saft og metanolekstrakt av ulike sorter svarthyll, samt av safter fra ulike trinn i et prosesseringsforsøk som etterlikner kommersiell saftproduksjon. I tillegg ble ulike innholdsstoffer målt for å se om det var forskjell mellom sortene, og om det var noen sammenheng mellom mengde av ulike innholdsstoffer og effekt på NF- κ B-aktivitet.

6.1. Effekt av svarthyll på NF- κ B-aktivitet

Saft og ekstrakt fra sortene Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor fra Leikanger dyrket i 2013 og 2014 ble testet for deres evne til å modulere basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Metanolekstrakter ble laget for å ekstrahere ut en større andel av de antatte virkestoffene, mens saft ble laget som et mer reelt produkt for forbruker. Saften i denne oppgaven ble laget ved sentrifugering i laboratoriet. Ved studier av NF- κ B-aktivitet er det ønskelig med en svak stimulering i forhold til mediumkontroll av basal NF- κ B-aktivitet, mens det er ønskelig med en svak hemming av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet i forhold til LPS-indusert mediumkontroll. En kombinasjon av disse evnene anses som optimalt da en svak stimulering av basal NF- κ B-aktivitet kan virke forebyggende på sykdom og allergier, mens hemming av indusert NF- κ B-aktivitet (som ved sykdom og infeksjoner) kan virke forkortende og lindrende på sykdomsforløpet (Paur et al. 2008).

Saftene og ekstraktene fra bær dyrket i Leikanger i 2013 ga alle en doseavhengig effekt på evne til å modulere NF- κ B-aktivitet, hvor effekten var tydeligst for saftenes evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet og ekstraktene evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Den doseavhengige effekten tyder på at det er noe i prøvene som fører til den observerte effekten.

Det var signifikante forskjeller mellom både sorter og dyrkningsår, i tillegg til interaksjon mellom sort og år for både safter og ekstrakter. Saftenes evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet var best i 2014, mens deres evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet var best i 2013. For ekstraktene var det motsatt, så det var ingen klar sammenheng mellom ønsket effekt på modulering av NF- κ B-aktivitet og dyrkeår. For saftene skilte Samyl seg signifikant ut med en gjennomsnittlig effekt på 348 % av mediumkontroll på basal NF- κ B-aktivitet, mens Sambu med 146 % av mediumkontroll hadde den dårligste effekten på basal NF- κ B-aktivitet av de seks sortene. Både saftene og ekstraktene av Sampo og Sambu viste best evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet sammenliknet med de andre sortene, og ekstraktene av disse to sortene viste en sterkere hemming av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn saftene. Blant ekstraktene hadde Samnor signifikant svakest evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet av de seks sortene. Ekstrakter fra Samidal og Samnor viste best evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet, hvor Samnor ga god effekt begge årene, mens Samidal hadde stor forskjell i sin effekt på basal NF- κ B-aktivitet mellom årene. Denne store forskjellen i evnen til Samidal dyrket to forskjellige år til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet er vanskelig å forklare, og høyt

standardavvik tyder på usikkerhet rundt denne målingen.

For å teste effekt av voksested ble saft og ekstrakt av bær fra to (Leikanger og Eiker) eller tre (Leikanger, Eiker og Fresvik) steder analysert. I Leikanger og Eiker ble sortene Sampo, Sambu og Samnor dyrket, mens i Fresvik ble sorten Sampo dyrket. Leikanger og Eiker ligger geografisk langt fra hverandre (Eiker i Buskerud og Leikanger i Sogn og Fjordane), mens både Leikanger og Fresvik ligger i Sogn og Fjordane. Det var stor variasjon i effekt av voksested på modulering av NF- κ B-aktivitet for både saft og ekstrakt, noe som tyder på at bærenes voksested kan ha en effekt på modulering av NF- κ B-aktivitet. Det var derimot ingen av dyrkestedene som generelt ga bedre eller dårligere effekt enn de andre dyrkestedene på evne til å modulere NF- κ B-aktivitet, hvor for eksempel ekstrakt fra bær av Sambu dyrket i Leikanger hadde bedre evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn ekstrakt fra bær av Sambu dyrket i Eiker, mens det for ekstrakt av bær av Samnor dyrket i Leikanger hadde svakere effekt på evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn ekstrakt fra bær av Samnor dyrket i Eiker. Prøver fra bær fra flere dyrkesteder burde vært testet for å få et sterkere statistisk grunnlag for å konkludere om ulikt dyrkested påvirker bærenes immunologiske effekt. For analysene hvor det ble benyttet kun to dyrkesteder ligger derimot stedene langt fra hverandre, noe som kan gi tydeligere effekt av dyrkested enn om stedene hadde vært nære hverandre.

Svarthyll har i andre studier vist å ha en dempende effekt på immunresponser, hvor flere er aktivert av NF- κ B-gener (Birkenfeld & Halperin 2002; Ciocoiu et al. 2012a). Dette er i samsvar med at svarthyll i denne oppgaven også ga en hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Derimot ble det ikke funnet noen tidligere studier som har undersøkt hvordan sort, dyrkningsår og dyrkningssted påvirker den immunologiske effekten av bær.

6.2. Innholdsstoffer i svarthyll

For å sammenlikne sortene ytterligere og korrelere innholdsstoffer til immunologisk effekt ble saftene analysert for innhold av totale fenoler (TP), totale monomere antocyaniner (TMA) og sukkerer og syrer, mens ekstraktene ble analysert for innhold av TP, TMA og utvalgte polyfenoler. Matplanter med høyt innhold av polyfenoler er ansett å ha en positiv effekt på immunsystemet, og det er derfor ønskelig med et høyt innhold av disse stoffene. Forholdet mellom sukkerer og syrer er viktig for smak av produktet.

Saftenes innhold av TP varierte mellom 254 mg gallesyreekvivalenter (GAE) (Samidal) og 418 mg GAE (Sambu) per 100 g prøve, og innhold av TMA mellom 67 mg cyanidin-3-glukosidekvivalenter (CGE) (Samyl) og 255 mg CGE (Sambu) per 100 g prøve. Av ekstraktene hadde Samidan høyest innhold av både TP (725 mg GAE/100 g bær) og TMA (555 mg CGE/100 g bær), mens Samnor hadde lavest verdi av både TP (440 mg GAE/100 g bær) og TMA (263 mg CGE/100 g bær). De individuelle prøvene stemte overens med analyse av individuelle polyfenoler. Tidligere studier av ulike sorter svarthyllbær viser stor variasjon i innhold av TP, TMA og spesifikke polyfenoler både for sorter og år (Akbulut et al. 2009; Lee & Finn 2007). Polyfenoler i bær, inkludert svartyll, ekstraheres vanligvis med organiske løsemidler som etanol, metanol eller aceton for å få størst utbytte av polyfenoler. Derfor blir innholdet av polyfenoler i ekstraktene, og ikke saftene, sammenliknet med tall fra litteraturen. I denne oppgaven ble metanol benyttet, men tidligere studier viser at andre løsningsmidler, som for

eksempel vandige løsninger av etanol og aceton, kan gi et betydelig høyere utbytte av TP og TMA fra bær enn hva metanol gjør (Boeing et al. 2014; Duymuş et al. 2014). Rapporterte resultater av innhold av TP i svarthyllekstrakt (*Sambucus nigra*) varierer mellom 364 og 929 mg GAE/100 g bær (Lee & Finn 2007; Skrede et al. 2012), og innhold av TMA varierer mellom 170 og 697 mg CGE/100 g bær. Disse funnene stemmer overens med funnene i denne oppgaven.

Gjennomsnittlig var innholdet av TP og TMA henholdsvis 97 % og 218 % høyere i ekstraktene enn i saftene, noe som viser at metanolekstraksjon frigjorde mer antocyaniner enn saft fremstilt ved sentrifugering. Det var høy grad av positiv korrelasjon mellom innhold av TP og TMA i saftene ($p < 0,001$, $r = 0,92$) og ekstraktene ($p < 0,001$, $r = 0,97$), hvor TMA bidrar med gjennomsnittlig 45 % av TP i saft og 74 % i ekstrakt. Denne store forskjellen mellom andel av TMA i saft og ekstrakt er mest sannsynlig på grunn av at en høyere andel antocyaniner ble frigjort i ekstraktene enn i saftene. Dessuten ble måling av TP gjort ved bruk av Folin-Ciocalteaus metode som baserer seg på en redoksreaksjon. Den måler dermed alle reduserende forbindelser i prøven, ikke bare polyfenoler. Andre reduserende forbindelser er blant annet vitamin C, monomere sukkerer og organiske syrer, som det antageligvis var et forholdsvis høyere innhold av i saftene enn i ekstraktene, og som i større grad bidrar til TP i saftene enn i ekstraktene. For å minimere innhold av sukkerer og syrer kunne det derfor ha vært hensiktsmessig å rense prøven før måling, for eksempel ved bruk av SPE for å fjerne sukkerer og organiske syrer (Roura et al. 2006). Ved måling av TMA med pH-differensialmetoden er det enkelte monomere antocyaniner som også absorberer lys ved pH 4,5, noe som kan føre til underestimering av innhold av TMA i prøvene (Lee 2005). Begge metodene benytter seg av ekvivalenter (gallesyre for TP og cyanidin-3-glukosid for TMA) for å beregne innholdet av TP og TMA, men det er mange andre polyfenoler og antocyaniner i prøvene med andre egenskaper enn disse forbindelsene. Dermed blir ikke bestemmelsen av polyfenoler og monomere antocyaniner helt nøyaktig ved bruk av TP- og TMA-metodene. Det er derimot fordelaktig å ha en fast ekvivalent som benyttes da resultater av ulike råvarer og produkter enklere kan sammenliknes.

Forskjellig dyrkested kan påvirke innholdet av polyfenoler, og deriblant antocyaniner, i ulike bærsorter (Connor et al. 2002; Häkkinen & Törrönen 2000), og ulike miljøfaktorer som UV-stråling, temperatur og tørke er vist å påvirke innholdet av antocyaniner i ulike planter (Chalker-Scott 1999). Klimatisk sett var 2013 og 2014 to svært ulike år, hvor 2013 var et dårlig år med en sen vår og kald sommer, og 2014 var et veldig bra dyrkingsår med mange soldager. Dette gjenspeilte seg i innhold av TP og TMA, hvor innholdet i saftene i 2014 var henholdsvis 7,5 % og 20,0 % høyere enn i 2013. For ekstraktene var innholdet av TP og TMA i 2014 henholdsvis 26 % og 27 % høyere enn i 2013.

Innhold av sukkerer og syrer i saftene varierte lite mellom år. Glukose hadde gjennomsnittlig innhold på 1,11 g/100 g saft, fruktose på 2,51 g/100 g saft, sitronsyre på 0,73 g/100 g saft og epletsyre på 0,44 g/100 g saft. Gjennomsnittlig °Brix var 9,3 og pH var 3,95. Disse verdiene stemmer overens med verdier rapportert av enkelte (Lee & Finn 2007; Skrede et al. 2012), men er lavere enn verdier rapportert av andre (Veberic et al. 2009). Sortvariasjon, ulikt dyrkested og ulik prøvepreparering kan være årsaker til dette. Innholdet av glukose og fruktose ser ut til å være høyere i bær dyrket i Eiker enn i Leikanger og Fresvik, med unntak av fruktose som hadde høyest innhold i Sampo fra Fresvik.

6.3. Oppsummering av NF-κB-aktivitet og innholdsstoffer i svarthyll

Tabell 6.1. oppsummerer hvilke sorter svarthyllbær som viste best evne til å modulere NF-κB-aktivitet (høyest verdi på basal NF-κB-aktivitet og lavest verdi på LPS-indusert NF-κB-aktivitet) og hadde høyeste verdier av TP og TMA i saft og ekstrakt.

Tabell 6.1.: Oppsummering av sortene med best evne til å modulere NF-κB og med høyest innhold av TP og TMA. For effekt på basal NF-κB-aktivitet gjelder høyeste verdi, mens for effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet gjelder laveste verdi.

Prøve	Basal NF-κB	LPS-indusert NF-κB	TP^a	TMA^b
Samidan			E ^c	E
Samyl	S ^d			
Samidal				
Sampo		E		
Sambu		S	S	S
Samnor	E			

^a TP, totale fenoler; ^b TMA, totale monomere antocyaniner; ^c E, beste verdi for ekstrakt; ^d S, beste verdi for saft

Saftene viser potensiale til å ha en kombinert effekt, hvor de både kan stimulere basal NF-κB-aktivitet og inhibere LPS-indusert NF-κB-aktivitet. Ekstraktene har evne til å inhibere LPS-indusert NF-κB-aktivitet, men det varierer mellom sorter og år hvilke prøver som også har en stimulerende effekt på basal NF-κB-aktivitet. Prøver med en kombinert effekt inneholder antageligvis stoffer som virker både stimulerende på NF-κB-aktivitet, men i tillegg hemmer et steg i NF-κB-signalveien som er avhengig av en aktivering. Det ser også ut til at prøver med god evne til å stimulere basal NF-κB-aktivitet har dårligere evne til å hemme LPS-indusert NF-κB-aktivitet, og omvendt, uten at denne mekanismen er klar.

6.4. Effekt av prosessering på NF-κB-aktivitet og innholdsstoffer

Svarthyllbær blir som oftest prosessert før de konsumeres. Effekten av industriell prosessering av svarthyllbær på NF-κB-aktivitet og utbytte av innholdsstoffer ble derfor undersøkt. Bær av sorten Sampo dyrket i Fresvik ble testet for effekt av varmebehandling (varmebehandlet i kombidamper i 90 minutter opp til 80°C, og avkjølt til 40°C), pasteurisering og konsentrering. Konsentratene ble konsentrert til ca. halvt volum på bakgrunn av °Brix ved bruk av rotavapor ved 40 °C og redusert trykk.

Generelt ga varmebehandling av bærene før pressing uendret eller dårligere effekt på basal NF-κB-aktivitet, og en mer hemmende effekt på LPS-indusert NF-κB-aktivitet enn saft av bær som ikke ble varmebehandlet før pressing. Pasteurisert saft hadde en sterkere evne til å modulere NF-κB-aktivitet enn upasteurisert saft for de behandlede bærene. Denne effekten av pasteurisering ble ikke sett for bærene som ble varmebehandlet før pressing. Konsentrert saft av varmebehandlede bær hadde en

dårligere evne til å modulere basal NF- κ B-aktivitet enn saft av bær som ikke ble varmebehandlet før pressing. Sammenliknet med ukonsentrert saft ga konsentrering av saft fra bær som var varmebehandlet før pressing ingen endring i effekt på basal NF- κ B-aktivitet. Dette var ikke som forventet, da konsentrering fører til høyere innhold av aktive stoffer enn ukonsentrert saft (Skrede et al. 2000). Derimot ga konsentrering en mer hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet sammenliknet med ukonsentrert saft for både varmebehandlet og ikke-varmebehandlede bær før pressing. Det ble ikke funnet tidligere publikasjoner hvor forskjellige prosesseringstrinn i produksjon av saft fra bær ble testet for immunologisk effekt.

Saftene av bær som ble varmebehandlet før pressing hadde et høyere innhold av TP og TMA enn saftene fra bær som ikke ble varmebehandlet før pressing, noe som også stemmer med resultatene for innhold av spesifikke polyfenoler. En av forklaringene til det høyere utbytte av polyfenoler i saftene som ble varmebehandlet før pressing er at varme løser opp plantecellene og lettere frigjør polyfenoler under pressing. I tillegg nevnes det i flere artikler at kort varmebehandling før pressing inhiberer enzymer som kan føre til degradering av antocyaniner (Brownmiller et al. 2008; Rossi et al. 2003; Skrede et al. 2000). I denne oppgaven ble bærene forbehandlet med varme i 90 minutter opp til 80 °C. Varmebehandlingen som er beskrevet å gi en positiv effekt på utbyttet av antocyaniner varer i kun tre minutter opp til 95 °C (Brownmiller et al. 2008; Rossi et al. 2003). Det hadde vært interessant å teste om denne kortere varmebehandlingen hadde gitt høyere utbytte av antocyaniner enn bær som ikke ble varmebehandlet før pressing i forhold til den mer langvarige varmebehandlingen benyttet i denne oppgaven.

Pasteurisert saft hadde et høyere innhold av TP enn upasteurisert saft for både safter som var laget av bær som ble varmebehandlet og ikke-varmebehandlet før pressing, mens for innhold av TMA ble denne effekten bare observert hos de saftene av bær som ble varmebehandlet før pressing. Innholdet av spesifikke antocyaniner viste derimot en økning i konsentrasjon for begge behandlingsgruppene. To forsøk med effekt av pasteurisering på antocyanininnhold i blåbærjuice ble funnet (Brownmiller et al. 2008; Skrede et al. 2000). Skrede *et al.* fikk også et høyere innhold av antocyaniner ved pasteurisering av blåbærjuice, mens Brownmiller *et al.* fant ingen signifikant endring i pasteurisert juice. Bærene i forsøket til Brownmiller *et al.* var derimot varmebehandlet før pressing, noe som kan forklare det uforandrede innholdet av antocyaniner. Skrede *et al.* forklarer det økte innholdet av antocyaniner i pasteurisert saft med at enzymer i upasteurisert saft kan ha degradert antocyaniner under oppbevaring og/eller tining før analyse slik at det ikke er innholdet av antocyaniner i pasteurisert saft som har økt, men innholdet i upasteurisert saft som har sunket. Konsentratene hadde ca. dobbelt så høyt innhold av TP og TMA som de ukonsentrerte saftene, noe som stemmer med at de var konsentrert til halvt volum. Innhold av sukker og syrer var marginalt høyere i den varmebehandlede gruppen, noe som kan skyldes en lett konsentrering av bærmassen under oppvarming før pressing.

Helsekostproduktet Frøy viste god evne til å både stimulere basal NF- κ B-aktivitet og å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Et annet kommersielt svarthyllprodukt (Sambucol) er vist å stimulere basal produksjon av ulike inflammatoriske cytokiner i monocytiske celler (Birkenfeld & Halperin 2002), noe som stemmer overens med Frøy sin evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet. Frøy hadde et høyt innhold av TP, men andelen TMA av TP var bare 25 %, mot normalt ca. 45 % i saft. Selv om Frøy var konsentrert fire ganger korresponderte ikke innholdet av TP, TMA og spesifikke polyfenoler med innholdet i konsentratene som ble konsentrert to ganger. Dette kan skyldes et lavere innhold av polyfenoler i bærene benyttet til produksjon av Frøy, eller tap under prosessering og oppbevaring.

6.5. Innholdsstoffer som påvirker NF- κ B-aktivitet

Det var tydelig at noe i svarthyllbærene hadde en modulerende effekt på både basal og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, og for å finne ut hva det var testet vi effekten av ulike fraksjoner av bærene, i tillegg til enkelte innholdsstoffer det finnes mye av i svarthyllbær, for deres evne til å modulere NF- κ B-aktivitet.

6.5.1. Effekt av fraksjoner og utvalgte innholdsstoffer

Polyfenoler, antocyaniner, sukker og syrer ble i fire utvalgte safter isolert ved fraksjonering ved bruk av SPE for å teste deres effekt på NF- κ B-aktivitet.

Ingen av fraksjonene skilte seg ut ved å ha signifikant bedre evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet enn de andre fraksjonene, men polyfenolfraksjonens sterkeste konsentrasjon (20 mg saft/mL) ga signifikant stimulerende effekt sammenliknet med kontroll. Tidligere celleforsøk har vist at polysakkarider isolert fra svarthyllbær ga en dose-avhengig stimulerende effekt på basal NF- κ B-aktivitet (Lu et al. 2014), men det ble ikke funnet publikasjoner med monomere sakkarider eller organiske syrer som hovedsakelig finnes i svarthyllbær.

Antocyaninfraksjonen skilte seg signifikant ut fra de andre fraksjonene ved å gi en hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet ved de tre sterkeste konsentrasjonene (opptil 35 % hemming). Dette stemmer overens med de andre resultatene i denne oppgaven hvor prøver med høyt innhold av antocyaniner også har sterkest effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Karlsen *et al.* fant i sin studie med U937 3 \times κ B-LUC-celler at kapsler med antocyaniner isolert fra blåbær og solbær inhiberte LPS-indusert NF- κ B-aktivitet med 27,6 % (Karlsen et al. 2007).

Polyfenolfraksjonen hadde uventet lav effekt på modulering av NF- κ B-aktivitet. HPLC-resultatene viser at polyfenolene klorogensyre og hovedandelen av rutin også delvis ble eluert i antocyaninfraksjonen. Det er derfor sannsynlig at også andre polyfenoler det ikke ble analysert for ble eluert i antocyaninfraksjonen istedenfor polyfenolfraksjonen. Dette kan være en av grunnene til at polyfenolfraksjonen hadde liten effekt på modulering av NF- κ B-aktivitet og antocyaninfraksjonen hadde stor effekt, da den også inneholdt andre forbindelser enn antocyaniner.

Innholdet av TP var bevart i fraksjonene sammenliknet med innhold av TP i saft fra samme prøve. Sukker/syrefraksjonen inneholdt ikke polyfenoler, men bidro allikevel til TP, noe som viser at det også finnes reduserende forbindelser i sukker/syre-fraksjonen (fruktose, glukose og organiske syrer). Det var ingen tydelig endring i antocyanininholdet ved fraksjonering. Dette tyder på at SPE-metoden benyttet fungerer bra til å eluere monomere antocyaniner fra svarthyllsaft.

De fem innholdstoffene glukose, sitronsyre, klorogensyre, rutin og cyanidin-3-glukosid i tilsvarende mengde som i saftene hadde ingen signifikant effekt på basal NF- κ B-aktivitet, mens sitronsyre, rutin og cyanidin-3-glukosid hadde en signifikant hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Få publikasjoner ble funnet om disse innholdstoffenes effekt på NF- κ B-aktivitet. Paur *et al.* fant ingen signifikant effekt av rutin på evne til å modulere U937 3 \times κ B-LUC-celler hverken på basal eller LPS-indusert NF- κ B-aktivitet ved konsentrasjon 10 μ M/mL (Paur et al. 2008). I denne oppgaven ga kun

sterkeste konsentrasjon av rutin (ca. 17 $\mu\text{M}/\text{mL}$) marginal signifikant effekt på LPS-indusert NF- κB -aktivitet, noe som kan være på grunn av forskjell i konsentrasjon. En studie av Hollmann *et al.* på biotilgjengelighet av rutin viser at rutin må metaboliseres av mikroorganismer i tykktarmen før de absorberes (Hollman *et al.* 1997), og metabolittene til rutin kan ha en annen effekt enn selve rutin. Isolert cyanidin-3-glukosid er funnet å ha en hemmende effekt på UVB-indusert NF- κB -aktivitet i humane keratinocytter (HaCaT) ved å måle endring i transkripsjon av NF- κB sine målgener ved bruk av RT-qPCR (Cimino *et al.* 2006). Cyanidin-3-glukosid hadde også en hemmende effekt på LPS-indusert NF- κB -aktivitet i denne oppgaven. Høy konsentrasjon av glukose (tre ganger høyere enn i denne oppgaven) er vist å aktivere inflammatoriske gener i monocytiske cellelinjer (deriblant U937-celler) via NF- κB -aktivering (Guha *et al.* 2000; Shanmugam *et al.* 2003). Forskjellig konsentrasjon og inkuberingstid kan være grunnen til at dette resultatet ikke stemmer overens med resultatet i denne oppgaven.

Selv om enkelte andre innholdsstoffer har gitt effekt på både basal og LPS-indusert NF- κB -aktivitet i U937 3 κB -LUC-celler (Paur *et al.* 2008), var det ikke overraskende at effekten av stoffene i denne oppgaven var lav. Stoffenes biotilgjengelighet og metabolisme blir ikke tatt hensyn til i en *in vitro*-modell. Flere studier understreker sannsynligheten for at mikronæringsstoffer har en synergisk effekt og bør derfor konsumeres sammen for å få en helsebringende effekt *in vivo* (Kolberg *et al.* 2013; Liu 2003). Unaturlig høyt inntak av enkelte polyfenoler som kan skje ved bruk av kosttilskudd kan også være skadelig da noen flavonoider (enkelte quercetin-derivater) også har pro-oksidative egenskaper (Kessler *et al.* 2003; Miura *et al.* 1998). Et kosthold basert på variert inntak av frukt, bær og grønnsaker er derfor anbefalt.

6.5.2. Korrelasjon mellom innhold av TP og TMA og effekt på NF- κB -aktivitet

Prøvene i denne oppgaven hadde varierende innhold av polyfenoler og ulik effekt på NF- κB -aktivitet. Det var derfor interessant å teste om det var en korrelasjon mellom innhold av TP og TMA i de ulike prøvene og deres evne til å modulere NF- κB -aktivitet. Da høyere innhold av antocyaniner er vist å gi en doseavhengig immunologisk effekt (Kim *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2004) er det grunn til å tro at bær med høyere innhold av antocyaniner gir en sterkere immunologisk effekt, både *in vitro* og *in vivo*. Variasjon i innhold av polyfenoler og antocyaniner kan derfor være en av grunnene til sortenes ulike effekt på NF- κB -aktivitet.

Det ble funnet negativ korrelasjon mellom innhold av TMA og TP og LPS-indusert NF- κB -aktivitet både for saftene og ekstraktene. Det ble også funnet negativ korrelasjon mellom basal NF- κB -aktivitet og innhold av TP og TMA i ekstraktene, men det ble ikke observert sammenheng mellom innhold av TP og TMA og saftenes evne til å modulere basal NF- κB -aktivitet. Selv om det generelt var en korrelasjon mellom innhold av TP og TMA og effekt på NF- κB -aktivitet var det ikke alltid sorten med høyest/lavest innhold av TP eller TMA som hadde den beste/dårligste evnen til å modulere NF- κB -aktivitet.

Ved testing av korrelasjon mellom de prosesserte saftene og deres evne til å modulere basal NF- κB -aktivitet ble det ikke funnet korrelasjon med innhold av TP og TMA. Det ble heller ikke funnet signifikant korrelasjon mellom LPS-indusert NF- κB -aktivitet og innhold av TP og TMA. Få punkter ga dårlig grunnlag for de statistiske beregningene, selv om det kan se ut som i figuren at det var en

negativ korrelasjon mellom LPS-indusert NF- κ B-aktivitet og innhold av TP ($p = 0,06$, $r = -0,79$) og TMA ($p = 0,08$, $r = -0,76$).

Det ble ikke funnet noe tidligere arbeid gjort på sammenheng mellom NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA, men det er sett at spesifikke antocyaniner gir en doseavhengig immunologisk effekt (Kim et al. 2006; Zhao et al. 2004). På bakgrunn av dette og resultatene i denne oppgaven er det derfor grunn til å tro at det kan være en sammenheng mellom innhold av TMA og TP og saftene og ekstraktenes evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet, og ekstraktenes evne til å hemme basal NF- κ B-aktivitet.

Ingen korrelasjon ble funnet mellom innhold av sukker og °Brix på modulering av NF- κ B-aktivitet, men det ble funnet positiv korrelasjon mellom innhold av syrer og basal NF- κ B-aktivitet, og negativ korrelasjon mellom pH og effekt på basal NF- κ B-aktivitet. Ingen tidligere studier av effekt av organiske syrer på NF- κ B-aktivitet ble funnet. I denne oppgaven var hovedfokuset på innhold av polyfenoler da det er disse som er antatt å gi immunologisk effekt.

6.5.3. Effekt av LPS-kontaminering på NF- κ B-aktivitet

Da svært lave konsentrasjoner LPS viste å gi en signifikant effekt på den basale NF- κ B-aktiviteten til cellene ble LPS-konsentrasjonen i utvalgte prøver målt. LPS er bakteriefragmenter og kan finnes over alt der det ikke er sterilt, og bær som har hengt ute under åpen himmel er inget unntak. Innholdet av LPS i enkelte av saftene og de prosesserte saftene var høye nok til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet, og det ble funnet en korrelasjon mellom prøvenes innhold av LPS og evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet. Sterilfiltrering av tre utvalgte safter viste at innholdet av LPS ble sterkt redusert, og effekten på basal NF- κ B-aktivitet sank til ingen effekt sammenliknet med kontroll både for safter med opprinnelig høyt og opprinnelig lavt innhold av LPS. Dette kan tyde på at saftenes innhold av LPS delvis kan forklare deres stimulerende effekt på basal NF- κ B-aktivitet.

Innholdet av LPS i de prosesserte saftene var spesielt høyt (2,5 – 5,5 ng/mL cellemedium), og det var ingen korrelasjon mellom basal NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA. Resultatene for effekt av de prosesserte saftene på basal NF- κ B-aktivitet blir derfor usikre.

Da LPS-indusert NF- κ B-aktivitet stimuleres med en mye høyere konsentrasjon av LPS enn det som er funnet i prøvene var det ikke forventet at LPS-kontaminering i prøvene skulle påvirke effekten av LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Effekten av sterilfiltrert saft på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet ble allikevel testet. To av de filtrerte saftene ga en noe kraftigere hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn de ufiltrerte saftene fra samme prøve. Dette kan ha vært på grunn av en svak konsentrering ved sterilfiltreringen av saftene, siden ca. 10 % av prøven ble holdt igjen i filteret. Den siste saften viste derimot en svak dårligere evne til å inhibere LPS-indusert NF- κ B-aktivitet enn den ufiltrerte saften fra samme prøve. Det var også sterkere korrelasjon mellom LPS-indusert NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA, noe som styrker teorien om at LPS bidrar til effekten observert på basal NF- κ B-aktivitet av saftene og de prosesserte saftene, men ikke til resultatene for LPS-indusert NF- κ B-aktivitet.

Siden effekten av saftene på basal NF- κ B-aktiviteten ble borte fra saftene etter sterilfiltrering var det stoffer som ble holdt igjen av filteret som var årsaken til dette. Filteret slapp igjennom molekyler under 10,000 Da. De fleste strukturer av LPS er over 10,000 Da (Lameire & Mehta 2000), og holdes dermed igjen i filteret. Polyfenoler har sjelden molekylvekt større enn 1000 Da, og skulle teoretisk sett gå igjennom filteret, men grad av forgreining i molekylet spiller også inn. Innholdet av TP i de sterilfiltrerte saftene ble bevart, mens det var en svak nedgang i innhold av TMA. Det ble observert en mørkerød, viskøs masse i filteret, noe som kan tyde på at noe av antocyaninene satt igjen i partikler i saften som ble holdt igjen av filteret (Figur 6.1.). Men siden LPS ga en kraftig immunrespons ved lave mengder er det grunn til å tro at fjerning av LPS var hovedårsaken til nedgangen av basal NF- κ B-aktivitet etter sterilfiltrering.



Figur 6.1.: Saft etter sterilfiltrering. Saften (2) er filtrert gjennom et filter(1) ved bruk av sentrifuge, og filteret holder igjen partikler >10.000 Da.

6.6. Bruk av celler

NF- κ B er et genregulatorisk protein som styrer mange av de immunologiske responsene i en celle. Måling av endring i NF- κ B-aktivitet etter stimulering av cellene med et stoff vil derfor si mye om stoffets immunologiske effekt. U937 3 κ B-LUC-cellelinjen ble valgt da den har innsatt et luciferase-reportergen som uttrykkes avhengig av og proporsjonalt med aktivering av NF- κ B i cytosol. Bruk av U937 3 κ B-LUC-celler er en rask og enkel måte å undersøke om stoffer påvirker NF- κ B-aktiviteten *in vitro*. Da cellene kan oppføre seg forskjellig avhengig av hvilken passasje (antall splittings) de befinner seg i (cellene ble byttet ut etter 25 passasjer (ca. 8 uker)) vil forsøkene gi en naturlig varians i responsen. På grunn av dette ble resultatene presentert i % av mediumkontroll. Andre faktorer som

kan påvirke resultatene og gi høye standardavvik er forskjellig konsentrasjon av celler i brønnene og unøyaktig pipettering av prøvene i brønnene.

Luciferasereporter-modellen sier ikke noe om hvilke gener som påvirkes eller hvor i signalkaskaden påvirkningen skjer. Hvis dette er av interesse kan enzymkoblet immunosorbent assay (ELISA) eller RT-qPCR kan benyttes for å måle utvalgte uttrykte κ B-gener (for eksempel spesifikke cytokiner).

Hvorvidt *in vitro*-modeller kan relateres til *in vivo*-situasjoner er omdiskutert. Ulike celler og vev signaliserer seg imellom, og begrenset opptak og varierende grad av metabolisering av matkomponenter er bare noen av utfordringene som er vanskelig å gjenskape *in vitro*. Dyremodeller blir ofte benyttet, men resultater fra disse forsøkene kan ikke med sikkerhet sammenliknes med humane forsøk (van der Worp et al. 2010). Av etiske, praktiske og økonomiske årsaker blir *in vitro*-modeller ofte benyttet i en innledende fase før eventuelle *in vivo*-forsøk utføres. *In vitro*-studier kan bare gi en pekepinn for grad av effekt i mennesker, og ingen konklusjon kan trekkes før validerte humane studier er gjennomført.

Polyfenoler og andre stoffer gjennomgår høy grad av metabolisering før de når blodbanen. Da disse metabolittene har en annen struktur enn de opprinnelige stoffene som blir konsumert kan effekten av metabolisert og umetabolisert stoff være forskjellig (Manach et al. 2004). Fremtidige studier på effekt av matkomponenter *in vitro* bør derfor utføres med metabolitter i fysiologiske konsentrasjoner lik den som er troverdig å finnes der cellelinjen benyttes kommer fra (for eksempel konsentrasjonen i blodet når monocytter benyttes) (Giménez-Bastida et al. 2012; Tomás-Barberán & Andrés-Lacueva 2012). Siden monocytter ble benyttet i denne oppgaven burde optimalt sett metabolittene til polyfenolene som finnes i svarthyllbær blitt benyttet, da det i hovedsak er disse som når blodbanen og de monocytiske cellene. Dette er vanskelig å få til i praksis da hele bær kan gi opphav til mange kjente og ukjente metabolitter. Det er sett at polyfenoler før metabolisering kan ha en effekt på immunresponsen i tarmceller, og selv om NF- κ B-aktivering er nokså lik i immunceller kunne det ha vært hensiktsmessig å benytte en tarmcellelinje transfektert med 3 \times κ B-LUC for å teste effekt av native polyfenoler/innholdsstoffer i svarthyllbær.

Konsentrasjonen benyttet i denne oppgaven var stort sett 10 mg prøve/mL cellemedium. For saftene er gjennomsnittlig saftutbytte av svarthyllbær er ca. 74 % (Kaack et al. 2008b), noe som tilsvarer 7,4 mg bær/mL cellemedium. Dette tilsvarer konsumering av 37,5 g bær for et gjennomsnittlig menneske med 5 L blod i kroppen ved 100 % biotilgjengelighet. Biotilgjengelighet av polyfenoler varierer sterkt avhengig av type polyfenol og sammensetning av måltidet (Manach et al. 2004). Ved å anta en biotilgjengelighet på 5 % tilsvarer dette et inntak på 750 g. Dette er høyere enn hva som er normalt å konsumere, og selv om svarthyllprodukter ofte er konsentrert er det en litt høy mengde for å være realistisk.

6.7. Generelle bemerkninger

I denne oppgaven ble det kun testet for innhold og immunologisk effekt av enkelte innholdsstoffer i svarthyllbær. Selv om det hovedsakelig er polyfenolene som er antatt å ha en helsefremmende effekt (Tomás-Barberán & Andrés-Lacueva 2012), inneholder svarthyllbær også mange andre stoffer, blant annet en høy andel flyktige forbindelser, som for eksempel fenylacetaldehyd (Ağalar et al. 2014; Kaack 2008a), som både kan ha positiv eller negativ effekt på helsen. I denne oppgaven ble det funnet en positiv korrelasjon mellom innhold av syrer og basal NF- κ B-aktivitet, noe som ikke utelukker at også andre innholdsstoffer enn polyfenoler kan ha en biologisk effekt.

Resultatene i denne oppgaven kan kun brukes som en indikasjon på om det er forskjell mellom sorter og år. Gjennomsnitt over to år er egentlig for lite for å kunne si noe om årseffekt, og bærene bør høstes på flere ulike steder med ulike miljøforhold for å gi et representativt utvalg av sortene. Analyse av sukker og syrer i saftene ble kun utført én gang, derfor er dette svært usikre tall, selv om de stemmer med litteraturen.

7 KONKLUSJON

Målene for denne oppgaven var å bestemme effekt av saft og metanolekstrakt av seks ulike sorter svarthyllbær (Samidan, Samyl, Samidal, Sampo, Sambu og Samnor) på NF- κ B-aktivitet, samt å bestemme effekt av år og dyrkested, i tillegg til å bestemme innhold av ulike innholdsstoffer for å finne ut hvilke stoffer som bidrar til den observerte effekten. For å etterlikne industriell produksjon av saft ble en av sortene prosessert for å teste effekt av varmebehandling, pasteurisering og konsentrering på evne til å modulere NF- κ B-aktivitet og innholdsstoffer.

Det var signifikante forskjeller både mellom sorter, år og dyrkested for både saft og ekstrakt. Ingen av årene skilte seg ut med best evne til å modulere NF- κ B-aktivitet, men innholdet av TP og TMA var signifikant høyere i 2014 enn i 2013. Sortene Sampo og Sambu hadde best evne til å hemme LPS-indusert NF- κ B-aktivitet både for saftene og ekstraktene. I tillegg hadde Sambu høyest innhold av TP og TMA av saftene. Heller ingen av dyrkestedene skilte seg ut fra de andre ved å ha bær med bedre evne til å modulere NF- κ B-aktivitet. Det ble funnet signifikant negativ korrelasjon mellom saftene og ekstraktens LPS-induserte NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA, og negativ korrelasjon mellom ekstraktens basale NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA. Det ble ikke funnet korrelasjon mellom saftenes basale NF- κ B-aktivitet og innhold av TP og TMA. Det ble derimot funnet en positiv korrelasjon mellom saftenes innhold av LPS og basal NF- κ B-aktivitet. Det er grunn til å tro at resultater med forsøk av saft var påvirket av LPS-innholdet i prøvene. Innhold av andre forbindelser som det ikke ble fokusert på i denne oppgaven kan også ha påvirket prøveresultatene.

Varmebehandling av bær før pressing til saft ga ingen eller hemmende effekt på evne til å stimulere basal NF- κ B-aktivitet og LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. En forklaring til økt hemmende effekt for saft av bær som ble varmebehandlet før pressing kan være det økte utbytte av polyfenoler i forhold til saft av bær som ikke ble varmebehandlet før pressing. Det er usikkert hvorfor saft av bær som ble varmebehandlet før pressing ga uendret eller negativ effekt på basal NF- κ B-aktivitet. Et høyt innhold av LPS i de prosesserte saftene kan ha påvirket effekten på basal NF- κ B-aktivitet.

Kort oppsummert er det usikkert i hvilken grad norskdyrket svarthyll kan stimulere basal NF- κ B-aktivitet, men de har en potensiell hemmende effekt på LPS-indusert NF- κ B-aktivitet. Det er grunn til å tro at høyt innhold av polyfenoler, og antocyaniner spesielt, i bærene er årsaken til den hemmende effekten. Produkter av svarthyllbær dyrket i Norge kan derfor ha en dempende effekt ved sykdom og lidelser forårsaket av forhøyede nivåer av NF- κ B-aktivitet, noe det er interessant å undersøke nærmere.

8 VIDERE ARBEID

Som en fortsettelse av arbeidet i denne oppgaven hadde det vært interessant å teste effekt av svarthyll *in vivo*, for eksempel ved bruk av mus transfektert med $3\times\kappa\text{B}$ -LUC. Dette vil gi en bedre forståelse av bærenes effekt i menneskekroppen enn ved bruk av kun *in vitro*-modeller.

Videre bør prøver av bær og bærprodukter sterilfiltreres for å fjerne LPS før måling av basal NF- κB -aktivitet. Det kan imidlertid virke som at det er mer hensiktsmessig å konsentrere seg om svarthylls effekt på LPS-indusert NF- κB -aktivitet, da disse resultatene var mest lovende.

For å få bedre grunnlag for å si noe om effekt av år og sort bør også bær fra flere år analyseres og tas med i beregning av effekt på NF- κB -aktivitet og innholdsstoffer.

9 REFERANSER

- Aaby, K., Mazur, S., Nes, A. & Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132 (1): 86-97.
- Ağalar, H. G., Demirci, B. & Başer, K. H. C. (2014). The Volatile Compounds of Elderberries (*Sambucus nigra* L.). *Natural Volatiles & Essential Oils*, 1 (1): 51-54.
- Akbulut, M., Ercisli, S. & Tosun, M. (2009). Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*, 5 (20): 320-323.
- Alexander, C. & Rietschel, E. T. (2001). Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of Endotoxin Research*, 7 (3): 167-202.
- Austena, L. M. I., Carlsen, H., Ertesvag, A., Alexander, G., Blomhoff, H. K. & Blomhoff, R. (2004). Vitamin A status significantly alters nuclear factor- κ B activity assessed by in vivo imaging. *The FASEB Journal*.
- Basu, A., Wilkinson, M., Penugonda, K., Simmons, B., Betts, N. & Lyons, T. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal*, 8 (1): 43.
- Basu, A., Rhone, M. & Lyons, T. J. (2010). Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition reviews*, 68 (3): 168-177.
- Birkenfeld, S. & Halperin, T. (2002). The effect of herbal remedies on the production of human inflammatory and anti-inflammatory cytokines.
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M. & Heurteaux, C. (2001). Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance. *The Journal of Neuroscience*, 21 (13): 4668-4677.
- Boath, A. S., Grussu, D., Stewart, D. & McDougall, G. J. (2012). Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? *Food Digestion*, 3 (1-3): 1-7.
- Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M. J., Oberritter, H. & Schulze, M. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European journal of nutrition*, 51 (6): 637-663.
- Boeing, J., Barizao, E., e Silva, B., Montanher, P., de Cinque Almeida, V. & Visentainer, J. (2014). Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chemistry Central Journal*, 8 (1): 48.
- Bonizzi, G. & Karin, M. (2004). The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology*, 25 (6): 280-288.
- Borchers, A. T., Keen, C. L., Stern, J. S. & Gershwin, M. E. (2000). Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72 (2): 339-347.
- Bottero, V., Imbert, V., Freiin, C., Formento, J. L. & Peyron, J. F. (2003). Monitoring NF- κ B transactivation potential via real-time PCR quantification of I κ B- α gene expression. *Molecular Diagnosis*, 7 (3): 187-194.
- Brownmiller, C., Howard, L. & Prior, R. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of food science*, 73 (5): H72-H79.
- Burge, B., Mumcuoglu, M. & Simmons, T. (1999). The effect of sambucol on flu-like symptoms in chimpanzees: Prophylactic and symptom-dependent treatment. *International Zoo News* 46 (1).
- Cao, G., Muccitelli, H. U., Sánchez-Moreno, C. & Prior, R. L. (2001). Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (5): 920-926.

- Cardoso, L., Araujo, M., Goes, A., Pacifico, L., Oliveira, R. & Oliveira, S. (2007). Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microbial Cell Factories*, 6 (1): 1.
- Carlsen, C. & Stapelfeldt, H. (1997). Light sensitivity of elderberry extract. quantum yields for photodegradation in aqueous solution. *Food Chemistry*, 60 (3): 383-387.
- Carlsen, H., Moskaug, J. O., Fromm, S. H. & Blomhoff, R. (2002). In vivo imaging of NF-kappa B activity. *Journal of Immunology*, 168 (3): 1441-1446.
- Cerdá, B., Espín, J. C., Parra, S., Martínez, P. & Tomás-Barberán, F. A. (2004). The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6- one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition*, 43 (4): 205-220.
- Chalker-Scott, L. (1999). Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and photobiology*, 70 (1): 1-9.
- Christensen, L., Kaack, K. & Fretté, X. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 227 (1): 293-305.
- Cimino, F., Ambra, R., Canali, R., Saija, A. & Virgili, F. (2006). Effect of cyanidin-3-O-glucoside on UVB-induced response in human keratinocytes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (11): 4041-4047.
- Ciocoiu, M., Serban, D., Bădescu, L., Tutunaru, D., Badulescu, O. & Bădescu, M. (2010). The effects of sambucus nigra extract in experimental arterial hypertension. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 15 (2): 87.
- Ciocoiu, M., Badescu, L., Badulescu, O., Tutunaru, D. & Badescu, M. (2012a). Protective intervention of sambucus nigra polyphenols in the diabetic heart. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 17 (1).
- Ciocoiu, M., Badescu, L., Badulescu, O. & Badescu, M. (2012b). „Intervention of Sambucus Nigra Polyphenolic Extract in Experimental Arterial Hypertension”. *International Journal of Medical and Biological Sciences*, 6: 197-201.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C. B. S., Finn, C. E. & Hancock, J. F. (2002). Genotypic and Environmental Variation in Antioxidant Activity, Total Phenolic Content, and Anthocyanin Content among Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127 (1): 89-97.
- Dahan, A. & Altman, H. (2004). Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability[mdash]mechanism, extent and relevance. *Eur J Clin Nutr*, 58 (1): 1-9.
- Dulf, F. V., Oroian, I., Vodnar, D. C., Socaciu, C. & Pintea, A. (2013). Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus* species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules*, 18 (10): 11768-11782.
- Duymuş, H. G., Göger, F. & Başer, K. H. C. (2014). In vitro antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry*, 155 (0): 112-119.
- Finkel, T. & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 (6809): 239-247.
- FIVEphoton Biochemicals. (2015). *NF-kB Activation Assay Kit Protocol for NFKB-2 and hNFKB-4*. 4 s.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Rhodes, M. J. C. & Johnson, I. T. (1998). Quercetin Glucosides Interact With the Intestinal Glucose Transport Pathway 1. *Free Radical Biology and Medicine*, 25 (1): 19-25.
- Gilmore, T. & Herscovitch, M. (2006a). Inhibitors of NF-κB signaling: 785 and counting. *Oncogene*, 25 (51): 6887-6899.
- Gilmore, T. D. (2006b). Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25 (51): 6680-6684.
- Giménez-Bastida, J. A., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F., Espín, J. C. & García-Conesa, M.-T. (2012). Intestinal Ellagitannin Metabolites Ameliorate Cytokine-Induced Inflammation and Associated Molecular Markers in Human Colon Fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (36): 8866-8876.

- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25 (4): 386-401.
- González-Sarrías, A., Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A., Dolara, P. & Espín, J. C. (2010). NF- κ B-dependent anti-inflammatory activity of urolithins, gut microbiota ellagic acid-derived metabolites, in human colonic fibroblasts. *British Journal of Nutrition*, 104 (04): 503-512.
- Guha, M., Bai, W., Nadler, J. L. & Natarajan, R. (2000). Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor α Gene Expression in Monocytic Cells via Hyperglycemia-induced Oxidant Stress-dependent and -independent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (23): 17728-17739.
- Hartmann, G. & Krieg, A. (1999). CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene therapy*, 6 (5): 893-903.
- Hearst, C., McCollum, G., Nelson, D., Ballard, L. M., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., Rooney, P. J., Loughrey, A., Moore, J. E. & Rao, J. R. (2010). Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *Journal of medicinal plants research*, 4 (17): 1805-1809.
- Helsedirektoratet. (2015). *Helsedirektoratets kostråd*. Helsedirektoratet.no.
- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. (2002). The κ B-NF- κ B Signaling Module: Temporal Control and Selective Gene Activation. *Science*, 298 (5596): 1241-1245.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62 (6): 1276-82.
- Hollman, P. C. H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., v.d. Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M. & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418 (1-2): 152-156.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444 (7121): 860-867.
- Hyglos GmbH. (2013). *EndoZyme (R) Recombinant Factor C Endotoxin Detection Assay Package Insert*, 1.1/2013. Germany: Hyglos GmbH. 12 s.
- Häkkinen, S. H. & Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33 (6): 517-524.
- Joseph, S. V., Edirisinghe, I. & Burton-Freeman, B. M. (2014). Berries: Anti-inflammatory effects in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (18): 3886-3903.
- Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., Alonso-Villaverde, C., Menéndez, J. A. & Platform†, f. t. B. F. C. (2014). Polyphenols and the modulation of gene expression pathways: can we eat our way out of the danger of chronic disease? *Critical reviews in food science and nutrition*, 54 (8): 985-1001.
- Kaack, K. (2008a). Aroma composition and sensory quality of fruit juices processed from cultivars of elderberry (*Sambucus nigra* L.). *European Food Research and Technology*, 227 (1): 45-56.
- Kaack, K., Frette, X. C., Christensen, L. P., Landbo, A.-K. & Meyer, A. S. (2008b). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*, 226 (4): 843-855.
- Kanner, J., Gorelik, S., Roman, S. & Kohen, R. (2012). Protection by Polyphenols of Postprandial Human Plasma and Low-Density Lipoprotein Modification: The Stomach as a Bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (36): 8790-8796.
- Karakaş, F. P., Yildirim, A. & Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. *Turkish Journal of Biology*, 36 (6): 641-652.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z.-W. (2002). NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2 (4): 301-310.
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L. & Blomhoff, R. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma

- concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *The Journal of nutrition*, 137 (8): 1951-1954.
- Kessler, M., Ubeaud, G. & Jung, L. (2003). Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55 (1): 131-142.
- Kim, H. J., Tsoy, I., Park, J. M., Chung, J. I., Shin, S. C. & Chang, K. C. (2006). Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. *FEBS Letters*, 580 (5): 1391-1397.
- Kim, S. O., Kundu, J. K., Shin, Y. K., Jin-Hong, P., Cho, M.-H., Tae-Yoon, K. & Young-Joon, S. (2005). [6]-Gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF- κ B in phorbol ester-stimulated mouse skin. *Oncogene*, 24 (15): 2558-67.
- Kiss, E. A., Vonarbourg, C., Kopfmann, S., Hobeika, E., Finke, D., Esser, C. & Diefenbach, A. (2011). Natural Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Control Organogenesis of Intestinal Lymphoid Follicles. *Science*, 334 (6062): 1561-1565.
- Knudsen, B. & Kaack, K. (2013). *A Review of Human Health and Disease Claims for Elderberry (Sambucus nigra) Fruit*. I International Symposium on Elderberry 1061. 121-131 s.
- Kolberg, M., Paur, I., Balstad, T. R., Pedersen, S., Jacobs Jr, D. R. & Blomhoff, R. (2013). Plant extracts of spices and coffee synergistically dampen nuclear factor- κ B in U937 cells. *Nutrition Research*, 33 (10): 817-830.
- Kong, F.-k. (2009). Pilot clinical study on a proprietary elderberry extract: efficacy in addressing influenza symptoms. *Online J Pharmacol Pharmacokin*, 5: 32.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H. & Törrönen, A. R. (2007). Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (4): 1612-1619.
- Kopp, E. & Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, 265 (5174): 956-959.
- Krawitz, C., Abu Mraheil, M., Stein, M., Imirzalioglu, C., Domann, E., Pleschka, S. & Hain, T. (2011). Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 11.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. & Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10): 3954-3962.
- Lambert, J. D. & Elias, R. J. (2010). The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501 (1): 65-72.
- Lameire, N. & Mehta, R. (2000). *Complications of Dialysis*. USA: CRC Group.
- Landbo, A. K., Kaack, K. & Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8 (1): 135-142.
- Lawrence, T. & Fong, C. (2010). The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- κ B. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42 (4): 519-523.
- Lee, J. & Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S-nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (14): 2665-2675.
- Lee, J. D., Robert W.; Wrolstad, Ronald E. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, Volume 88 (5): pp. 1269-1278.
- Lila, M. A. & Raskin, I. (2005). Health-related interactions of phytochemicals. *Journal of Food Science*, 70 (1): R20-R27.

- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3): 517S-520S.
- Lodish, H. F., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular cell biology*, b. 4: WH Freeman New York.
- Lu, C. H., Lei, W. & Fritsche, K. (2014). Innate immune modulatory effects of elderberry polysaccharides in murine macrophage cell line RAW 264.7 (647.40). *The FASEB Journal*, 28 (1 Supplement).
- Macheix, J. J. & Fleuriet, A. (1990). *Fruit phenolics*: CRC press.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 (5): 727-747.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454 (7203): 436-444.
- Matejicek, A., Kaplan, J., Matejickova, J., Vespalcova, M. & Cetkovska, J. (2014). *Comparison of Substances in Elderberry Cultivars and Wild Elderberry*. II International Symposium on Wild Relatives of Subtropical and Temperate Fruit and Nut Crops 1074. 105-109 s.
- Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P. A., Cassetti, F. & Raschetti, R. (2009). Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65 (4): 331-341.
- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N. & Stewart, D. (2009). Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115 (1): 193-199.
- Miura, Y. H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T. & Fukui, S. (1998). Active oxygens generation by flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21 (2): 93-96.
- Moskaug, J. Ø., Carlsen, H., Myhrstad, M. C. & Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (1): 277S-283S.
- Murphy, K. M. (2011). *Janeway's immunobiology*: Garland Science.
- Myhrstad, M. C. W., Carlsen, H., Nordström, O., Blomhoff, R. & Moskaug, J. Ø. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radical Biology and Medicine*, 32 (5): 386-393.
- Nantz, M. P., Rowe, C. A., Muller, C., Creasy, R., Colee, J., Khoo, C. & Percival, S. S. (2013). Consumption of cranberry polyphenols enhances human γ -delta-T cell proliferation and reduces the number of symptoms associated with colds and influenza: a randomized, placebo-controlled intervention study. *Nutr J*, 12: 161.
- Nicholson, S. K., Tucker, G. A. & Brameld, J. M. (2008). Effects of dietary polyphenols on gene expression in human vascular endothelial cells. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67 (01): 42-47.
- Ochmian, I., Oszmiański, J. & Skupień, K. (2012). Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83 (1): 64-69.
- Opplysningskontoret for frukt og grønt. (2014). Totaloversikten, Frisk frukt, bær, grønnsaker og poteter 2004-2013. Norge. 29 s.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, 18 (49): 6853-6866.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. & Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21 (1): 3-11.
- Paur, I., Austenaa, L. M. & Blomhoff, R. (2008). Extracts of dietary plants are efficient modulators of nuclear factor kappa B. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (4): 1288-1297.
- Paur, I., Balstad, T. R., Kolberg, M., Pedersen, M. K., Austenaa, L. M., Jacobs, D. R. & Blomhoff, R. (2010). Extract of Oregano, Coffee, Thyme, Clove, and Walnuts Inhibits NF- κ B in Monocytes and in Transgenic Reporter Mice. *Cancer Prevention Research*, 3 (5): 653-663.

- Piskula, M. K. & Terao, J. (1998). Accumulation of (–)-Epicatechin Metabolites in Rat Plasma after Oral Administration and Distribution of Conjugation Enzymes in Rat Tissues. *The Journal of Nutrition*, 128 (7): 1172-1178.
- Promega Corporation. (2011). *Bright-Glo™ Luciferase Assay System Technical Manual. Instructions for Use of Product(s); E2610,; E2620,; E2650*. USA. 22 s.
- Promega Corporation. (2012). *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin. Instructions for Use of Product(s) G7570, G7571, G7572, G7573*. USA. 13 s.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, 68 (1): 125-131.
- Rieder, A., Grimmer, S., L. Achmann, F., Westereng, B., Kolset, S. O. & Knutsen, S. H. (2013). Generic tools to assess genuine carbohydrate specific effects on in vitro immune modulation exemplified by β -glucans. *Carbohydrate Polymers*, 92 (2): 2075-2083.
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, F. U., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Ulmer, A. J., Zähringer, U., Seydel, U. & Di Padova, F. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, 8 (2): 217-225.
- Roder, D. M. (2002). The epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 5 (1): 5-11.
- Roschek, B., Jr., Fink, R. C., McMichael, M. D., Li, D. & Alberte, R. S. (2009). Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*, 70 (10): 1255-1261.
- Ross, J. A. & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22: 19-34.
- Rossi, M., Giussani, E., Morelli, R., Lo Scalzo, R., Nani, R. C. & Torreggiani, D. (2003). Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of highbush blueberry juice. *Food Research International*, 36 (9–10): 999-1005.
- Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R. & Lamuela-Raventós, R. M. (2006). Total Polyphenol Intake Estimated by a Modified Folin–Ciocalteu Assay of Urine. *Clinical Chemistry*, 52 (4): 749-752.
- Ruiz, P. A., Braune, A., Hölzlwimmer, G., Quintanilla-Fend, L. & Haller, D. (2007). Quercetin inhibits TNF-induced NF- κ B transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *The Journal of nutrition*, 137 (5): 1208-1215.
- Ruusalepp, A., Yan, Z.-Q., Carlsen, H., Czibik, G., Hansson, G., Moskaug, J.-Ø., Blomhoff, R. & Valen, G. (2006). Gene Deletion of NF- κ B p105 Enhances Neointima Formation in a Mouse Model of Carotid Artery Injury. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 20 (2): 103-111.
- Ryan, J. (2008). *Endotoxins and Cell Culture, Technical Bulletin*, 1. USA: Corning Incorporated. 8 s.
- Sasaki, R., Nishimura, N., Hoshino, H., Isa, Y., Kadowaki, M., Ichi, T., Tanaka, A., Nishiumi, S., Fukuda, I., Ashida, H., et al. (2007). Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochemical Pharmacology*, 74 (11): 1619-1627.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130 (8): 2073S-2085S.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y. J., Lee, R., Sand, D., Scheuller, H. S. & Heber, D. (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (25): 9329-9339.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (3): 630-635.
- Shanmugam, N., Reddy, M. A., Guha, M. & Natarajan, R. (2003). High Glucose-Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and Chemokine Genes in Monocytic Cells. *Diabetes*, 52 (5): 1256-1264.
- Sidor, A. & Gramza-Michałowska, A. (2014). Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food – a review. *Journal of Functional Foods* (0).
- Sineiro, J., Franco, D., Rubilar, M., Sánchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N. & Núñez, M. J. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *EJEAFChe*, 7 (8): pp 3210-3216.

- Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16 (3): 144-158.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E. & Durst, R. W. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*, 65 (2): 357-364.
- Skrede, G., Martinsen, B. K., Wold, A.-B., Birkeland, S.-E. & Aaby, K. (2012). Variation in quality parameters between and within 14 Nordic tree fruit and berry species. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 62 (3): 193-208.
- Spagnuolo, C., Russo, M., Bilotto, S., Tedesco, I., Laratta, B. & Russo, G. L. (2012). Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1259 (1): 95-103.
- Spencer, J. P. E., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srai, S. K. & Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*, 458 (2): 224-230.
- Sweadner, K. J., Forte, M. & Nelsen, L. L. (1977). Filtration removal of endotoxin (pyrogens) in solution in different states of aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 34 (4): 382-385.
- Tarozzi, A., Marchesi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Andrisano, V., Fiori, J., Cantelli-Forti, G. & Hrella, P. (2005). Protective Effects of Cyanidin-3-O- β -glucopyranoside Against UVA-induced Oxidative Stress in Human Keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 81 (3): 623-629.
- Thole, J. M., Kraft, T. F. B., Sueiro, L. A., Kang, Y.-H., Gills, J. J., Cuendet, M., Pezzuto, J. M., Seigler, D. S. & Lila, M. A. (2006). A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *Journal of Medicinal Food*, 9 (4): 498-504.
- Tomás-Barberán, F. A. & Andrés-Lacueva, C. (2012). Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (36): 8773-8775.
- Tsuda, T. (2008). Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (3): 642-646.
- Ulltveit, G. (1998). *Ville bær: Alle spiselige ville bær i Norge*. Norge: Teknologisk forlag.
- Valen, G. (2004). Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure. *Basic research in cardiology*, 99 (1): 1-7.
- van der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'Collins, V. & Macleod, M. R. (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS medicine*, 7 (3): e1000245.
- Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F. & Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114 (2): 511-515.
- Walter, B. (2014). *Specific gravity 166 Success Secrets* Emereo Publishing.
- Wang, L. & Reeves, P. R. (1998). Organization of Escherichia coli O157 O antigen gene cluster and identification of its specific genes. *Infection and Immunity*, 66 (8): 3545-3551.
- Waterhouse, A. L. (2001). Determination of Total Phenolics. I: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- World Health Organization (WHO). (2014). *Global Status Report on Noncommunicable Diseases*. Geneva, Switzerland.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W. & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16 (9): 423-428.
- Yang, R. C., Chen, H. W., Lu, T. S. & Hsu, C. (2000). Potential protective effect of NF- κ B activity on the polymicrobial sepsis of rats preconditioning heat shock treatment. *Clinica Chimica Acta*, 302 (1-2): 11-22.
- Yi, W. G., Fischer, J., Krewer, G. & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (18): 7320-7329.

- Youdim, K. A., McDonald, J., Kalt, W. & Joseph, J. A. (2002). Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults ☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (5): 282-288.
- Young-Joon, S. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews. Cancer*, 3 (10): 768-80.
- Zakay-Rones, Z., Thom, E., Wollan, T. & Wadstein, J. (2004). Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the Treatment of Influenza A and B Virus Infections. *Journal of International Medical Research*, 32 (2): 132-140.
- Zhao, C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P. & Magnuson, B. A. (2004). Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (20): 6122-6128.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no