

Skýrsla Matís

10- 07

Mái 2007

**Blóðþrýstingslækkandi áhrif
(Ace-hindra virkni) í íslensku
sjávarfangi –
uppsetning mæliaðferða**

**Lárus Freyr Þórhallsson
Margrét Geirsdóttir
Guðmundur Óli Hreggviðsson
Sigurður Vilhelmsson
Guðjón Þorkelsson**

MATÍS

Matvælarannsóknir
Íslands

Food research,
innovation and safety

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Blóðþrýstingslækkandi áhrif (Ace-hindravirkni) í íslensku sjávarfangi – uppsetning mæliaðferða		
Höfundar / Authors	Lárus Freyr Þórhallsson, Margrét Geirsdóttir, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sigurður Vilhelmsson og Guðjón Þorkelsson		
Skýrsla / Report	10 - 07	Útgáfudagur / Date:	Mái 2007
Verknr. / project no.	1659		
Styrktaraðilar / funding:	AVS rannsóknasjóður í sjávarútvegi		
Ágrip á íslensku:	<p>Meginmarkmið verkefnisins var að setja upp mælingar á ACE-hindra virkni á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Matis ohf). Það er ásetningur Matis ohf að nýta þessar mæliaðferðir til að auka verðmæti íslensks sjávarfangs með því að kanna í hvaða afurðum þessi virkni finnst og þar með verði mögulegt að þróa nýjar afurðir og afla nýrra markaða fyrir íslenskt sjávarfang. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, Háskólinn í LaRochelle í Frakklandi og Lyfjafræðideild Háskóla Íslands unnu saman að þessu verkefni. Ástæðan fyrir verkefninu var að á Rf er unnið að nokkrum verkefnum þar sem stefnan er að kanna svonefnda lífvirkni (heislusamleg/heilsuþætandi) sjávarafurða. Lífvirkni er forsenda þess að mögulegt sé að markaðssetja vörur sem markfæði (functional food). Háskólinn í LaRochelle hefur sérhæft sig í mælingum á ACE-hindrandi áhrifum peptíða úr alls konar hráefni. Þessar mælingar hafa ekki verið gerðar á Íslandi. Stór hluti verkefnisins var unnin sem lokaverkefni í M.Sc. námi í lyfjafræði við Háskóla Íslands. Byggir skýrsla þessi að mestu leyti að mastersritgerð Lárusar Freys Þórhallssonar vorið 2007.</p> <p>Sett var upp og þróuð mæliaðferð til að mæla ACE hindrun sem virkar til ákvörðunar á IC50 gildum samkvæmt gildingu með enalapríl. Einnig gefa niðurstöður til kynna að einhverja ACE hindrandi virkni er að finna í þorskhýdrólýsati og var mesta virknin í hýdrólýsati sem síað var með 1 kDa síu.</p> <p>Afrakstur verkefnisins er því mæliaðferð sem nýtt verður í fjölmörgum verkefnum um lífvirkni í íslensku sjávarfangi. Verkefnið hefur óbein áhrif á verðmæti íslensks sjávarfangs með því að stuðla að þróun á vörum til notkunar í sérfæði, fæðubótarefni og markfæði</p>		
Lykilorð á íslensku:	Blóðþrýstingslækkandi áhrif, sjávarfang, uppsetning mæliaðferða		

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	1
1.1 Markmið verkefnisins	1
1.2. Renín-angíótensín kerfið og ACE	2
1.2.1.ACE hindrar og uppgötvun þeirra.....	4
2. UPPSETNING Á MÆLIÐFERÐUM.....	6
2.1. Efni og mælitæki.....	8
2.2. Mæling á ACE hindrun.....	9
2.2.1. Aðferð Holmquist með kanínulungna asetón extrakt.....	9
2.2.2. Aðferð Holmquist með kanínulungna ACE.....	10
2.2.3 Aðferð Cushman og Cheung.....	10
3. SANNPRÓFUN Á MÆLIÐFERÐ	12
4. ÁLYKTANIR	13
5. HEIMILDIR.....	14

1. INNGANGUR

1.1 Markmið verkefnisins

Meginmarkmið verkefnisins var að setja upp mælingar á ACE-hindravirkni á Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins (Matís ohf). Það er ásetningur Matís ohf að nýta þessar mæliaðferðir til að auka verðmæti íslensks sjávarfangs með því að kanna í hvaða afurðum þessi virkni finnst og þar með verði mögulegt að þróa nýjar afurðir og afla nýrra markaða fyrir íslenskt sjávarfang. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, Háskólinn í LaRochelle í Frakklandi og Lyfjafræðideild Háskóla Íslands unnu saman að þessu verkefni. Ástæðan fyrir verkefninu var að á Rf er unnið að nokkrum verkefnum þar sem stefnan er að kanna svonefnda lífvirkni (heilsusamleg/heilsubætandi) sjávarafurða. Lífvirkni er forsenda þess að mögulegt sé að markaðssetja vörur sem markfæði (functional food). Háskólinn í LaRochelle hefur sérhæft sig í mælingum á ACE-hindrandi áhrifum peptíða úr alls konar hráefni. Þessar mælingar hafa ekki verið gerðar á Íslandi. Stór hluti verkefnisins var unnin sem lokaverkefni í M.Sc. námi í lyfjafræði við Háskóla Íslands. Byggir skýrsla þessi að mestu leyti á mastersritgerð Lárusar Freys Þórhallssonar (Lárus Freyr Þórhallsson, 2007).

Alþjóðlega heilbrigðisstofnunin (WHO) spáir því að áður en árið 2020 gengur í garð munu hjarta og æðasjúkdómar vera algengasta dánarorsökin á heimsvísu. En háþrýstingur er stór áhættuþáttur fyrir aðra hjarta- og æðasjúkdóma eins og heilablóðfall, hjartadrep og hjartabilun (Danilczyk o.fl., 2003). Niðurstöður nýlegrar rannsóknar sem gerð var í fimm Evrópulöndum sýndu fram á að 35 % fullorðinna einstaklinga í þessum löndum hafi háþrýsting. Talið er að háþrýstingur herji á 25 -35 % fullorðinna manna í bæði þróuðum ríkjum og þróunarríkjunum (Staessen o.fl., 2003; Vermeirssen o.fl., 2003).

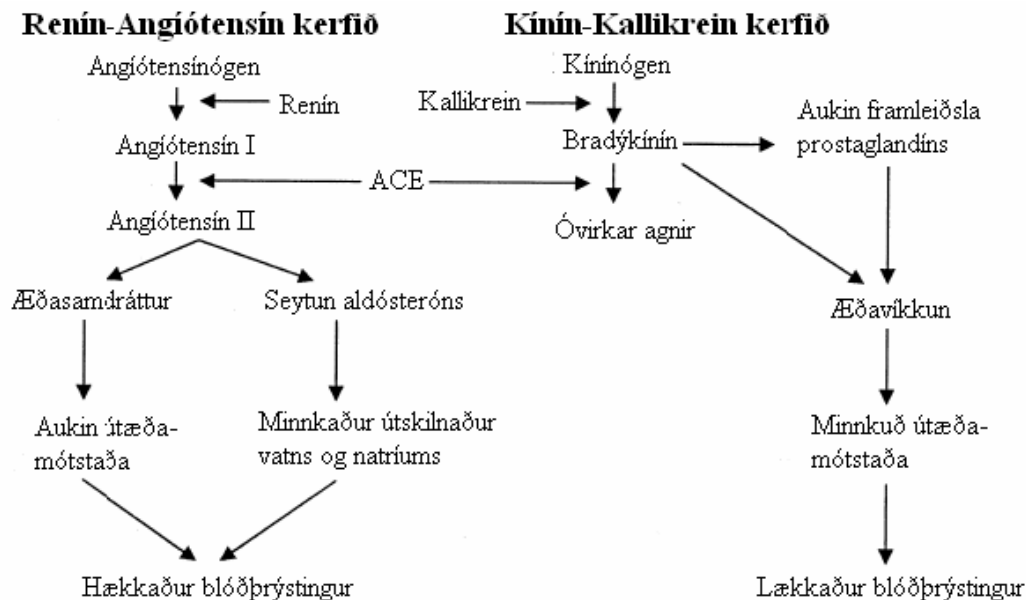
Talið er líklegt að það sé orsakasamhengi á milli innihalds fæðunnar og háþrýstings og því sé hugsanlega hægt að nota blóðþrýstingslækkandi peptíð í baráttunni við sjúkdóminn. Aukin próteinneysla virðist hafa jákvæð áhrif á blóðþrýstinginn hjá þeim sem eru með háþrýsting og einnig er það talið líklegt til árangurs að neyta fæðis sem samanstendur af auknu magni af ávöxtum, grænmeti og fitulitlum mjólkurvörum. Þó aðrir lífsferlar geti átt hlut að máli þá er talið að ACE hindrun lífvirkra peptíða í fæðunni valdi

blóðþrýstingslækkuninni (Vermeirssen o.fl., 2005). Mörg peptíð með hugsanlega ACE hindrandi eiginleika hafa verið einangruð úr ýmsum matvælum á undanförunum árum. Sem dæmi má nefna mysu, kasein, glúten, fiskprótein, hænuegg, svína- og kjúklingavöðva, nautakjöt, nýrnabaunir, þörungur, sveppi, hvítlauk og sojabauur (Li et al. 2004; Jung o.fl., 2006; Lam o.fl., 2007). Þessi peptíð eru ekki jafn virk og efnasmíðaðir hindrar en á móti kemur að þau valda ekki neinum aukaverkunum svo vitað sé (Jung o.fl., 2006).

Notkun markfæðis í baráttunni gegn háþrýstingi er frekar ný af nálinni sérstaklega hér á landi en mun eflaust færast enn frekar í aukana á næstu árum. Blóðþrýstingslækkandi áhrif slíks fæðis er að mestu rakin til lífvirkra peptíða sem hafa þá eiginleika að geta hindrað ACE sem er eitt aðalstýriensímið í renín-angiótensín kerfinu.

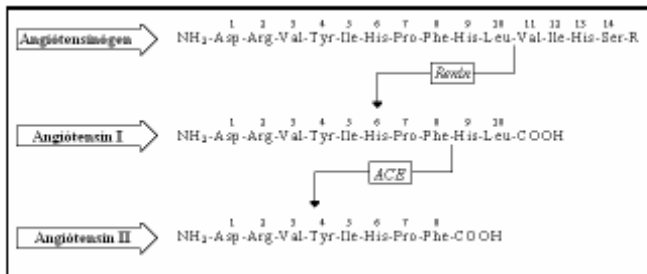
1.2. Renín-angiótensín kerfið og ACE

Renín-Angiótensín kerfið (RAK) er flókið líffræðilegt stjórnunarkerfi sem spilar lykilhlutverk í að stýra samvægi blóðþrýstings og salt- og vökvajafnvægi í spendýrum (mynd 1). Kerfið gengur út á ensímferli sem líkur með myndun oktapeptíðsins angiótensín II (Eriksson o.fl., 2002).



Mynd 1. Yfirlitsskema fyrir Renín-Angiótensín kerfið og Kínín-Kallikrein kerfið.

Ferlið hefst á því að próteasanum renín sem seytt er af nándargaukulfrumum (juxtoglomerular cells) í aðlægum nýrnslagæðlingum klýfur peptíðið angíótensínógen í dekaeptíðið angótensín I. Angíótensín I er síðan vatnsrofið af ACE í angíótensín II sem er átta amínósýrur að lengd (mynd 2).



Mynd 2. Myndun angíótensín II útfrá angíótensínógen.

Angíótensín II er ekki eingöngu öflugt æðapregjandi peptíð heldur stýrir það einnig breiðu sviði lífeðlisfræðilegra og meínfræðilegra atburða með því að bindast viðtökum á yfirborði frumna.

ACE hefur lengi verið talið megin ensímið í stjórnun á RAK og með því tilliti spilar það lykilhlutverk sem eitt aðalskotmarkið við meðferð gegn háþrýstingi. Auk þess að brjóta niður angíótensín I í angíótensín II sér ACE um að brjóta niður og óvirkja æðavíkkandi peptíðið bradykínin. Þannig að virkjun á RAK leiðir aðallega til útbreiddar æðapregingar með því að hindra blóðþrýstingslækkandi kínín-kallikrein ferlið og með því að mynda angíótensín II (Eriksson o.fl., 2002).

ACE er með stórt N-enda utanfrumusvæði og stutt C-enda innanfrumusvæði og vatnsfælið 17 amínósýra svæði sem fer í gegnum frumuhimnuna. ACE getur losnað af frumuhimnum fyrir tilstuðlan sekretasa. Slíkt leysanlegt form af ACE er bæði til staðar í sermi og öðrum líkamsvessum. En það er þó vefjabundna formið sem stýrir bæði blóðþrýsting og nýrnastarfsemi. ACE verkar bæði sem peptidyl dípeptíðasi sem fjarlægir C-enda dípeptíð af hvarfefninu og sem endópeptíðasi á önnur hvarfefni eins og substance P og gulbúsvakalosandi hormón (luteneizing hormone releasing hormone, LHRH). Ensímið er frekar ósérhæft og klýfur dípeptíð frá hvarfefnum með misjafna amínósýruröð. Þau hvarfefni sem það velur þó fremur hafa aðeins einn frían karboxýlhóp á C-enda amínósýrunni og prólín má ekki vera í stöðunni þar við hliðina. Þess vegna

klýfur ensímið ekki angíótensín II (Goodman o.fl., 2001; Danilczyk o.fl., 2003). Sú uppgötvun að ACE hvati niðurbroti angíótensíns I í angíótensín II, ásamt byggingarákvörðun ensímsins leiddi til þróunar á ACE-sérhæfum hindrum. Hindrun á ACE leiðir til lækkunar á blóðþrýsting og eykur batahorfur og slær á einkenni fólks með hjartabilun. Út frá þessari þekkingu hafa verið hannaðir fjölmargir ACE-hindrar og virkni þeirra metin í klínískum rannsóknum (Danilczyk o.fl., 2003).

1.2.1.ACE hindrar og uppgötvun þeirra

Náttúruleg ACE hindrandi peptíð fundust fyrst í snákaeitri en þessir hindrar voru 5-13 amínósýrur að lengd og höfðu flestir þeirra C-enda amínósýruraðirnar Ala-Pro eða Pro-Pro. Af þeim var það peptíðið SQ 20.881 (Tiprotide, Pyr-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro) sem hafði mestu blóðþrýstingslækkandi áhrifin (Li o.fl., 2004).

Allt frá því að ACE hindrandi peptíðin úr snákaeitri uppgötvuðust hafa verið búnir til fjölmargir ACE hindrar og eru margir þeirra notaðir sem lyf við háþrýsting (Ariyoshi 1993). Dæmi um nokkra ACE hindra sem hafa verið smíðaðir og notaðir sem lyf eru: kaptópríl, ramipríl, enalapríl, fusinopríl, cilazapríl, pentopríl, trandolapríl, perindopríl, lisinopríl, alacepríl og imidaprílat. Þessi lyf geta valdið hvítleiðum aukaverkunum eins og hósta, bragðtruflunum, húðútbrotum, kalíumlækkun, minnkaðri nýrnastarfsemi og ofnæmisviðbrögðum. Af þessum orsökum, hafa vísindamenn mikinn áhuga á náttúrulegum efnum með ACE hindrandi eiginleika sem hafa minni aukaverkanir (Lopez-Fandino o.fl., 2006; Lam o.fl., 2007). Ein mesta blóðþrýstingslækkandi verkunin sem hefur náðst í mönnum með neyslu markfæðis er með gerjuðum mjólkuvörum sem innihalda ACE hindrandi peptíðin IPP og VPP sem hafa IC_{50} gildin 5 og 9 μM (Fitzgerald og Murray 2006; Lopez-Fandino o.fl., 2006)

Fyrsti mjólkurdrykkurinn með blóðþrýstingslækkandi verkun er Ameal S[®] sem var markaðsett af japanska fyrirtækinu Calpis en fyrsti Evrópski mjólkurdrykkurinn með slíka verkun er Evolus[®] sem er framleiddur af finnska fyrirtækinu Valio. Báðir þessir drykkir innihalda Ile-Pro-Pro og Val-Pro-Pro og eru framleiddir með gerjun mismunandi

Lactobacillus helveticus stofnum (Fitzgerald og Murray, 2006; Korhonen og Pihlanto, 2006).

Sýnt hefur verið fram á blóðþrýstingslækkandi áhrif Evolus[®] í rottulíkönunum. Tvær aðskildar rannsóknir sem gerðar voru á fólki með vægan háþrýsting sýndu tölfræðilega marktæka blóðþrýstingslækkun upp á 10 mmHg og 6,7 mmHg eftir 8 og 12 vikna inntöku á 150 mL af Evolus[®]. En þó sýndi ein nýleg rannsókn enga tölfræðilega marktæka lækkun á blóðþrýsting eftir 21 vikna daglega neyslu á 150 mL af Evolus[®] (Fitzgerald og Murray, 2006).

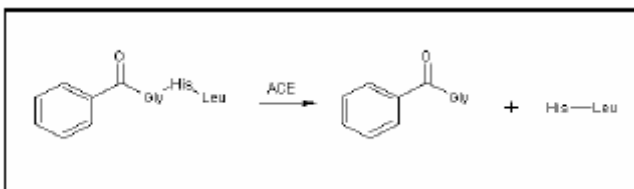
Hér á Íslandi er á markaði mjólkurdrykkurinn LH sem framleiddur er af MS (Mjólkursamsölunni). LH[®] er íslenskt afbrigði af Evolus[®] og Ameal S[®] og inniheldur hann líkt og þeir trípeptíðin Ile-Pro-Pro og Val-Pro-Pro (Heimasíða Mjólkursamsölnnar, 2007). Önnur efni en IPP og VPP í þessum gerjuðu mjólkurafurðum leggja sitt af mörkum til blóðþrýstingslækkunar, t.d. kalsíum, magnesíum og kalíum hafa sjálfstæð áhrif á blóðþrýstinginn og magna því þau áhrif sem koma til vegna peptíðana (Lopez-Fandino o.fl., 2006).

Fæðupeptíð með ACE hindrandi eiginleika hafa nokkra kosti umfram smíðuðu ACE hindrana sem notaðir eru sem lyf. Þar má helst nefna lægri kostnað, afurðin er náttúruleg og örugg að mati neytandans og svo falla fæðuaflað peptíð vel að þeim áherslum sem falla að markfæði og hlutverki þess. ACE hindrarnir sem notaðir eru sem lyf hafa þó sannað notagildi sitt við meðhöndlun háþrýstings og er það ekki ætlunin að ACE hindra peptíðin komi í staðinn fyrir lyfin. Öllu heldur er það ætlunin að þau geti komið í veg fyrir háþrýsting og að hægt sé að nota þau sem upphafsmeðferð hjá þeim sem eru með mildan háþrýsting. Einnig eru þau hugsuð sem viðbótarmeðferð hjá öðrum sjúklingum sem þegar eru á annari meðferð (Vermeirssen o.fl., 2004).

2. UPPSETNING Á MÆLIÐFERÐUM

Grundvöllurinn fyrir því að kanna það hvort peptíð hafi ACE hindrandi áhrif *in vivo* þurfa þau að hafa sýnt ACE hindrunar virkni *in vitro*. Best er að notast við einfalda, næma og áreiðanlega *in vitro* ACE hindrunar mæliðferð. Hingað til hafa verið settar fram nokkuð margar mögulegar *in vitro* greiningaraðferðir fyrir ACE hindravirkni sem byggjast t.d. á ljósmælingum, geislamerkingum, HPLC og hárpípurafdrætti (capillary electrophoresis, CE). Þessar aðferðir hafa aðallega verið notaðar vegna þess að þær eru frekar einfaldar og tækjabúnaðurinn sem þarf til þess að framkvæma þær er yfirleitt til staðar á öllum betri rannsóknastofum. Sumar þessar aðferðir fela þó í sér úrdráttarskref með lífrænum leysum, notkun dýrs tækjabúnaðar og meðhöndlunar á geislavirkum efnum sem gerir þær óæskilegri en aðrar aðferðir (Lam o.fl., 2007).

Tvær algengustu mæliðferðirnar byggja á ljósmælingu og þær eiga báðar það sameiginlegt að byggja á vatnsrofi ACE á efnasmíðuðum peptíðum og í kjölfarið magngreiningu á losun N-enda amínósýru sem inniheldur chromoforinn. Þessar aðferðir eru yfirleitt nefndar: aðferð Cushman og Cheung annars vegar og aðferð Holmquist hins vegar. Þessar aðferðir voru upphaflega þróaðar til að kanna ACE virkni en þeim hefur verið breytt lítillega til að mæla ACE hindrunarvirkni. Aðferð Cushman og Cheung byggist á klofnun Hippuryl Histidyl Leucine (HHL) í hippurín sýru og histidyl leusín (mynd 3).

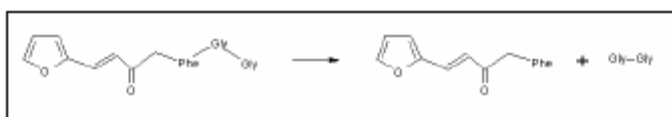


Mynd 3. Vatnsrof Hip-His-Leu í hippurín sýru og His-Leu.

En histidyl leusín er einmitt það dípeptíð sem losnar frá angíótensín I þegar það klofnar í angíótensín II. Hippurín sýran sem losnar er úrhlotuð með etýl asetati og magngreind með ljósgleypnimælingu við 228 nm. Einn helsti ókostur þessarar aðferðar er sá að við úrdráttinn getur óhvarfað HHL sem líkt og hippurín sýra gleypir sterklega við 228 nm, farið með í etýl asetat fasann sem leiðir til ofmats á hippurín sýru og þar með á ACE

virkninni (Cushman og Cheung, 1971). Í sumum nýlegum aðferðum eru hvarfafurðirnar aðskildar með CE eða rp-HPLC til að fá nákvæmari greiningu á hippurín sýrunni (Shalaby o.fl., 2006). Aðferð Cushman og Cheung innheldur nokkuð mörg skref sem leiðir til þess að aðferðin er tímaflek eins og útdrátturinn með etýl asetati, uppgufun á etýl asetati, endurupplausn með vatni og gleypnimæling á hippurín sýru við 228 nm (Li o.fl., 2005).

Aðferðir sem byggjast á aðferð Holmquist ganga út á ACE hvataða hýdrólýsu á fúranakrýloyl-fenýlalanýl-glycýlglycín (FAPGG). Undirstöðuatriði þessarar mæliaðferðar byggist á blárrí hliðrun (blue shift) sem verður í gleypnirófinu þegar efnið er vatnsrofið í FAP og GG (sjá mynd 4). Þegar þetta hvarf á sér stað minnkar gleypnin sem er mæld við 340 nm og er ensímvirknin mæld með því að meta gleypniminnkunina sem á sér stað á ákveðnu tímabili. Því þarf ekki að aðskilja hvarf og myndefni og ákveða síðan hvert magn annars myndefnisins er. FAPGG hefur mikla leysni í vatnslausnum og er mjög stöðugt. Með því að útbúa FAPGG stofnlausnir og geyma þær í kæli má nota þær upp í allt að ár án nokkurra vandkvæða. FAPGG hefur hagstæða hraðafraðilega stuðla sem gera það kleyft að gera næmar greiningar með því að nota hvarfefnisstyrk sem er hærrí en K_m til að gefa 0. gráðu hvarf og lægri en K_m til að gefa 1.gráðu hvarf. Hraðafraðilegir stuðlar FAPGG eru betri en fyrir HHL en FAPGG er með $K_m = 3 * 10^{-4} M$ og $k_{cat} = 19000 \text{ min}^{-1}$ samanborið við $2,4 * 10^{-3} M$ og 15600 min^{-1} hjá HHL (Holmquist o.fl., 1979; Vermeirssen o.fl., 2002). Þessir þættir gera það að verkum að FAPGG er mjög hentugt hvarfefni í ACE hindrunar mæliaðferðir og betra en HHL. Enn fremur hindrar dípeptíðið sem losnar við þetta hvarf ekki ACE í miklum mæli. Með það í huga að ACE mæliaðferðin með FAPGG tekur styttri tíma, minni vinnu og færri efni þarf til að framkvæma hana þá hlýtur það að vera hentugri með tilliti til tíma og kostnaðar. Svo lengi sem verið er að mæla hindrasýni sem eru mjög tær og hafa enga augljósa gleypni (Holmquist o.fl., 1979; Shalaby o.fl., 2006).



Mynd 4 Vatnsrof FAPGG í FAP og GG.

ACE hindravirkni í báðum aðferðunum er metin útfrá svokölluðum IC₅₀ gildum en IC₅₀ er sá styrkur sem þarf af hindra til að ná 50 % af hámarkshindrun. ACE hindrunaraðferðir eru gildar með því að mæla IC₅₀ gildi þekkts hindra en þeir hindrar sem oftast eru notaðir til þess eru kaptópríl og enalapríl. Báðir þessir hindrar eru lyf og er kaptópríl til að mynda mjög kröftugur hindri meðan enalapríl er í raun og veru forlyf fyrir enalaprílat sem hemur ACE betur en enalapril. Þekkt IC₅₀ gildi fyrir kaptópríl eru $7,5 \cdot 10^{-10} - 2,2 \cdot 10^{-8}$ M en þekkt IC₅₀ gildi fyrir enalapríl eru $2,1 \cdot 10^{-7} - 7 \cdot 10^{-5}$ M (Vermeirssen o.fl., 2002). IC₅₀ gildi eru ekki þau sömu á milli aðferða og geta einnig verið mismunandi þó sama aðferð sé notuð til að fá þau. Munurinn getur verið vegna þess að hvarfaðstæðurnar eru mismunandi, notaðar eru mismunandi aðferðir við útreikning á IC₅₀ eða að notuð er mismunandi hvarfefni og mismunandi ensím með tilliti til uppruna, framleiðanda o.s.frv. ACE ensímin sem notuð eru í *in vitro* mæliaðferðirnar eru misjöfn að uppruna, yfirleitt eru þau þó úr lungum kanína en einnig hefur verið notast við ensím úr grísanýrum. Ensím sem eru úr kanínulungum eru annaðhvort keypt og notuð á hreinu formi eða þá að notast sé við kanínulungna asetónduft. Duftið er síðan úrhautað með stuðpúðalausn til þess að ná úr því ensímvirkum efnunum. Slíkur útdráttur (extract) hefur hámarksensímvirkni við pH á bilinu 8,1 – 8,3 og þegar styrkur NaCl í hvarfefnablöndunni er 300 mM. Þegar hreinsað ACE úr kanínulunga er notað til að ákvarða hýdrólýseringu FAPGG er mesta virknin við pH 7,5 og 300 mM NaCl styrk (Vermeirssen o.fl., 2002).

2.1. Efni og mælitæki

Efni

ACE viðmið E	Trinity Biotech
Etýl asetat	Merck
Lungna asetónduft úr kanínu	Sigma
N-Hippuryl-His-Leu tetrahýdrat	Sigma
N-[3-(2-Fúrýl)acrýlól]-Phe-Gly-Gly	Sigma
Kaptópríl	Sigma-Aldrich
Enalapríl maleate salt	Sigma
ACE úr kanínulunga 1UN	Sigma
Saltsýra fuming 37%	Merck

Tæki

Sveip blandari (Stuart Vortex Mixer)	Bibby Sterlin Ltd.
Ljósmaelir (Ultrospec 300 Pro)	Amersham Pharmacia Biotech
Hitabað EC 5M	Julabo
Plast kúvettur (10x4x45mm)	Sarstedt

2.2. Mæling á ACE hindrun

2.2.1. Aðferð Holmquist með kanínulungna asetón extrakt

Blöndun á kanínulungna asetón extrakt

1 g vegið af kanínulungna asetónpúðri, út í það er bætt 10 mL af 50 mM kalíumfosfatbuffer, pH 8.3. Blandan er sett á hræringu yfir nótt í kæli. Daginn eftir er blandan skilvinduð í 40 mínútur við 40.000 x g. Rauðleita flotið er aðskilið frá fasta efninu og geymt í kæli. Fyrir virknipróf er flotið þynnt 10 falt með 50 mM kalíum fosfat buffer pH 8,3.

Útbúin er 1 mM FAPGG hvarfefnislausn með því að leysa viðeigandi magn í 50 mM Tris HCl, pH 8.3, 400 mM NaCl. Hvarfblandan er útbúin í tilraunaglassi og inniheldur hún eftirfarandi:

- 500 µL af FAPGG hvarfefnislausn
- 300 µL af afjónuðu vatni (blankur) eða hindralausn
- 300 µL af 10 falt þynntu kanínulungna asetón extraktinu.

Hvarfblanda er látin standa í 5 mínútur í hitabaði við 37°C. Síðan er hvarflausnin flutt með pípettu yfir í tóma kúvettu sem búið er að koma fyrir í ljósgleypnimælinum. Gleypnin er mæld með afjónað vatn sem viðmið í hituðum kúvettuhaldara (37°C) við 340 nm á 5 mínútna tímabili. Gleypniminnkunin sem á sér stað samsvarar ensímvirkninni. Erfitt er að fá nægilega góða ensímvirkni út úr kanínulungna asetónextrakti. Mynd 5 sýnir hvernig uppsetning var við mælingu á ACE hindrun: ljósmaelir, hitabað og sveipblandari.

2.2.2. Aðferð Holmquist með kanínulungna ACE

Kanínulungna ACE 1 UN frá Sigma er leyst upp í 5 mL af afjónuðu vatni og skipt í nokkra skammta sem hafa þá styrkleikann 0,2 U/mL. Uppléyst ensímið er síðan geymt í frysti þar til það er notað í virknipróf. Útbúin er 0,5 mM FAPGG hvarfefnislausn í 50 mM Tris HCl pH 7,5, 300 mM NaCl. Upphaflega er sett 100 µL af vatni (blankur) eða hindra í tilraunaglas og bætt við það 25 µL (5mU) af ACE lausn. Þessi blanda er hituð við 37°C í 2 mínútur í hitabaði. Síðan er bætt við 900 µL af FAPGG lausn og blandað með sveip (vortex) blandara, tilraunaglassið er sett aftur í hitabaðið og látið standa þar í 2 mínútur. Síðan er hvarflausnin flutt með pípettu yfir í tóma kúvettu sem búið er að koma fyrir í ljósmælinum. Gleypnin er mæld með afjónað vatn sem viðmið í hituðum kúvettu haldara (37°) á 5 mínútna kafla. Settur er 30 sekúndna lag-tími á keyrsluna. Gleypniminnkunin sem á sér stað samsvarar ensímvirkninni. Gerðar eru 4 keyrslur fyrir hvert sýni. Hallatalan sem fæst útfra gleypniminnkuninni samsvarar gleypniminnkun á mínútu. Meðaltal hallatalnanna fjögurra er sett inn í eftirfarandi jöfnu til þess að reikna ACE hindrunina:

$$\% \text{ ACE hindrun} = (1 - (\Delta A_{\text{test}} - \Delta A_{\text{blank}})) \times 100 \%$$



Mynd 5. Uppsetning við mælingu á ACE hindrun : ljósmælir, hitabað og sveipblandari

2.2.3 Aðferð Cushman og Cheung

Útbúin er 25 mU/mL ACE lausn með því að blanda 0,25 mL af 0,2 U/ml ACE lausn við 1,75 mL af afjónuðu vatni.

8,3 mM Hip-His-Leu hvarfefnislausn er útbúin með 50 mM natríum bórat buffer pH 8,3 og 0,5 M NaCl

Síðan voru útbúnaðar fjórar eftirtaldar lausnir í glertilraunaglös :

- A : 50 μ L ACE + 50 μ L afjónað vatn (1 fyrir hvert sett)
- B: 100 μ L afjónað vatn (1 fyrir hvert sett)
- C: 50 μ L ACE + 50 μ L hindralausn / hýdrólýsat (4 fyrir hvert sýni)
- D: 50 μ L hindralausn / hýdrólýsat + 50 μ L afjónað vatn (4 fyrir hvert sýni)

Glösin voru látin standa í hitabaði við 37°C í 5 mínútur og því næst bætt við 150 μ L af hvarfefnislausn í hvert glas og látið standa í hitabaðinu í 60 mínútur í viðbót. Hvarfið var stöðvað með því að bæta út í hvert glas 250 μ L 1 M HCl. Í hvert tilraunaglas er síðan bætt 1,5 mL af etýl asetati og blandað með sveipblandara. Allar lausnirnar eru settar í skilvindu við 800 g í 15 mínútur og að því loknu var 1 mL tekinn af etýl asetat fasanum og settur í hreint tilraunaglas. Etýll asetatið var því næst uppgufað í 90°C vatnsbaði með því að geyma glösin í 100°C heitu vatnsbaði. Hippurín sýran sem eftir er í tilraunaglösunum er leyst upp með 3 mL af afjónuðu vatni og gleypnin mæld við 228 nm.

Gleypni sýnanna var sett inn í eftirtalda formúlu sem reiknar ACE hindrun :

$$ACE \text{ hindrun} = 100 - \left(100 \times \frac{C-D}{A-B} \right)$$

3. SANNPRÓFUN Á MÆLIAÐFERÐ

Nákvæm lýsing á sannprófun á mæliaðferðum er í mastersritgerð Lárusar Freys Halldórssonar. Í töflunni eru listaðir upp helstu verkþættir og niðurstaða þeirra.

Verkþáttur	Niðurstaða, ályktun
ACE hindrunar mæling með kanínulungna asetóndufti. Búnar voru til sex lotur af úrdrætti sem framleiddar voru á misjafnan hátt.	Eftir margvíslegar prófanir og mælingar var ályktað að lungnavefurinn væri ekki nógu virkur og ákveðið að hætta að nota hann en nota í hans stað hreint ensím til þess að fá góða og örugga virkni.
ACE hindrunar mæling með hreinu kanínulungna ACE	Niðurstöður á keyrslum með hreinu ensími stóðu ekki undir væntingum, virknin var góð en sambærilegar niðurstöður á milli keyrslna á sömu sýnum var oft ekki mikil. Skýringin reyndist vera plastkúvettan sem notuð var við mælingarnar. Þ.e. ekki mátti nota sömu kúvettuna í margar mælingar.
Gilding á mæliaðferð með Kaptópríl	IC ₅₀ gildið mældist $1,16 \cdot 10^{-6}$ M sem fellur allveg inn á það bil sem er gefið fyrir þekkt gildi $2,1 \cdot 10^{-7} - 7 \cdot 10^{-5}$ M
ACE hindramæling á hreinu þorskhydrolysati	Mælingarnar staðfestu að hindrun er til staðar, því var óhætt að setja af stað þáttun á síuðu hýdrólýsati með örsíun
ACE hindramæling á þáttuðu þorskhydrolysati	1kDa hydrolysát hafði lægsta IC ₅₀ gildið. Það var því valið til gelsíunar til að greina virku þættina enn frekar í sundur.
ACE hindramæling á gelsíuðum þáttum	Allir þættir höfðu einhverja ACE hindrandi verkun. Þó var ekki hægt að ganga út frá þessum niðurstöðum hvaða þáttur hefur mesta virkni, til þess þyrfti að gera IC ₅₀ gildis ákvörðun á hverjum þætti fyrir sig.

Þegar búið er að gera IC₅₀ ákvörðun á öllum þáttum væri það næsta skref að taka út virkustu þættina sem eru til staðar og kanna frekar samsetningu þeirra og ákvarða hvaða efni er þar að finna. Til að greina það hversu mörg efni þátturinn inniheldur væri hægt að keyra hann í gegnum hárpípu rafdrátt. Einnig mætti nota peptíð rafdráttargel til þess að sjá hversu mörg bönd koma út og þar af leiðandi hversu mörg peptíð eru í þætti. Ef að niðurstöður er varða virkni og samsetningu þátta eru áhugaverðar væri næsta skref að raðgreina virka peptíðið eða virku peptíðin. Að þessum skrefum loknum mætti skoða með hvaða hætti hægt væri að nýta þessi efni í mögulega hönnun og framleiðslu markfæðis.

4. ÁLYKTANIR

Niðurstöður verkefnisins gefa til kynna að ACE hindrunar mæliaðferðin sem var þróuð virkar til ákvörðunar á IC_{50} gildum samkvæmt gildingu með enalapríl. Einnig gefa niðurstöður til kynna að einhverja ACE hindrandi virkni er að finna í þorskhydrólýsati og var mesta virknin í hydrólýsati sem síað var með 1 kDa síu. Ekki er þó búið að greina hvaða þættir það eru í hydrólýsatinu sem valda hindruninni. Næsta skref eru því að kanna hvaða þættir eru virkastir og hvaða efni það eru í þáttunum sem eru að valda hindruninni og hvort nýta mætti þau til þróunar á markfæði.

Mæliaðferðin verður nýtt í fjölmörgum verkefnum um lífvirkni í íslensku sjávarfangi. Verkefnið hefur óbein áhrif á verðmæti íslensks sjávarfangs með því að stuðla að þróun á vörum til notkunar í sérþæði, fæðubótarefni og markfæði

5. HEIMILDIR

- Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibitors Derived from Food Proteins. *Trends in Food Science & Technology*. **4**(5), 139-144.
- Cushman, D. W. og Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric Assay and Properties of Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. *Biochemical Pharmacology*. **20**(7), 1637.
- Danilczyk, U., Eriksson, U., Crackower, M. A. og Penninger, J. M. (2003). A story of two ACEs. *Journal of Molecular Medicine-Imm*. **81**(4), 227-234.
- Eriksson, U., Danilczyk, U. og Penninger, J. M. (2002). Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes. *Current Biology*. **12**(21), R745-R752.
- Fitzgerald, R. J. og Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*. **59**(2), 118-125.
- Goodman, L. S., Hardman, J. G., Limbird, L. E. og Gilman, A. G. (2001). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York, McGraw-Hill MedicalPub. Division.
- Heimasíða Mjólkursamsölnunnar (2007). <http://www.ms.is/article.aspx?catID=129&ArtId=155>. Sótt þann 20.4.2007.
- Holmquist, B., Bunning, P. og Riordan, J. F. (1979). Continuous Spectrophotometric Assay for Angiotensin Converting Enzyme. *Analytical Biochemistry*. **95**(2), 540-548.
- Jung, W. K., Mendis, E., Je, J. Y., Park, P. J., Son, B. W., Kim, H. C., Choi, Y. K. og Kim, S. K. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. **94**(1), 26-32.
- Korhonen, H. og Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*. **16**(9), 945-960.
- Lam, L. H., Shimamura, T., Sakaguchi, K., Noguchi, K., Ishiyama, M., Fujimura, Y. Og Ukeda, H. (2007). Assay of Angiotensin I-converting Enzyme Inhibiting Activity Based on The Detection of 3-Hydroxybutyric Acid. *Analytical Biochemistry*. (In Press).
- Lárus Freyr Þórhallsson (2007). Uppsetning á ACE hindrunar mæliaðferð *in vitro* og einangrun blóðþrýstingslækkandi peptíða úr sjávarfangi. Leiðbeinendur: Sesselja S. Ómarsdóttir, lektor, og Guðmundur Óli Hreggviðsson lektor
- Li, G. H., Le, G. W., Shi, Y. H. og Shrestha, S. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects. *Nutrition Research*. **24**(7), 469-486.
- Li, G. H., Liu, H., Shi, Y. H. og Le, G. W. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **37**(2), 219-224.
- Lopez-Fandino, R., Otte, J. og van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE inhibitory activity. *International Dairy Journal*. **16**(11), 1277-1293.

Shalaby, S. M., Zakora, M. og Otte, J. (2006). Performance of two commonly used angiotensin-converting enzyme inhibition assays using FA-PGG and HHL as substrates. *Journal of Dairy Research*. **73**(2), 178-186.

Staessen, J. A., Wang, J. G., Bianchi, G. og Birkenhager, W. H. (2003). Essential hypertension. *Lancet*. **361**(9369), 1629-1641.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Devos, L. og Verstraete, W. (2003). Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during in vitro gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**(19), 5680-5687.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. og Verstraete, W. (2002). Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **51**(1), 75-87.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. og Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*. **92**(3), 357-366.

Vermeirssen, V., Van Camp, J. og Verstraete, W. (2005). Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **85**(3), 399-405.