

**Kjemisk og biologisk karakterisering
av polysakkarider fra
ville og kultiverte røtter fra
Vernonia kotschyana
Etnofarmakologiske studier i Mali**

Selma Meskini



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juli 2011

**Kjemisk og biologisk karakterisering
av polysakkarider fra
ville og kultiverte røtter fra
Vernonia kotschyana
Etnofarmakologiske studier i Mali**

Selma Meskini

Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juli 2011

Veiledere:

Post doktor Kari Tvette Inngjerdingen

Professor Berit Smestad Paulsen

Professor Drissa Diallo

Professor II Terje E. Michaelsen

Post doktor Marit Inngjerdingen

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, perioden april 2010 til mai 2011. I tillegg ble det utført forsøk ved Folkehelseinstituttet og Rikshospitalet.

Først vil jeg takke min veileder, Kari Tvette Inngjerdingen, for super hjelp og veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Uten deg ville denne oppgaven ikke vært til.

Jeg vil også takke Berit Smestad Paulsen, spesielt for god hjelp med GC-MS resultatene og for alle gode råd.

Takk til Marit Inngjerdingen og Anne Cathrine Vestrheim for veiledning ved henholdsvis Rikshospitalet og Folkehelseinstituttet. Jeg vil også takke Terje E. Michaelsen for samarbeid i forbindelse med den komplementfikserende testen ved Folkehelseinstituttet.

Finn Tønnesen fortjener stor takk for utføring av GC-MS analyser.

Stor takk til min herlige lab-nabo Ingvild Austarheim for all veiledning og godt humør.

Takk til Suthajini Yogarajah for hjelp med praktiske oppgaver på laben.

Ellers vil jeg takke Celine Nguyen og Hao Nhat Tran Le for at turen ble vellykket, og takk til Drissa Diallo for god veiledning og tilrettelegging av oppholdet i Mali.

Til slutt vil jeg takk alle på avdelingen, farmakognosi, i tredje etasje. Dere har klart å skape en familie følelse som jeg fikk være del av.

Takk til familie og venner for all støtte.

Oslo, 13. juli 2011

Selma Meskini

INNHALDSFORTEGNELSE

Forord	II
1. Forkortelser	2
2. Sammendrag	6
3. Innledning	9
3.1. Tradisjonell plantemedisin	9
3.2. Vernonia kotschyana	9
3.2.1. Navn og klassifisering	10
3.2.2. Tradisjonell bruk av Vernonia kotschyana	11
3.2.3. Tidligere studier av Vernonia kotschyana	11
3.3. Polysakkarider	16
3.3.1. Generelt om polysakkarider	16
3.3.2. Polysakkarider i planter	17
3.3.3. Polysakkarider i celleveggen	17
3.3.4. Pektiner med biologisk aktivitet	23
3.4. Sår	25
3.4.1. Mage-tarm sår	25
3.4.2. Sårheling	25
3.5. Immunmodulerende aktivitet	26
3.5.1. Komplementsystemet	26
3.5.2. Makrofagaktivering	28
3.6. Oppgavens mål	31
4. Metoder	33
4.1. Generelle metoder	33
4.1.1. Vannkvalitet	33
4.1.2. Innveing	33
4.1.3. Tørking av karbohydrat-materiale	33
4.1.4. Avgassing av væsker	33
4.1.5. Filtrering	33
4.1.6. Tørking med N ₂ -gass	34
4.1.7. Volumreduksjon	34
4.1.8. Blanding av løsninger	34
4.1.9. Sentrifugering	34

4.1.10. Måling av pH.....	34
4.1.11. Vasking av dialyseslanger	35
4.1.12. Dialyse.....	36
4.1.13. Vasking av glassutstyr.....	38
4.1.14. Frysetørrking.....	39
4.1.15. Absorbansmåling.....	39
4.2. Isolering av polysakkarider	40
4.2.1. Enzymatisk degradering med exo- og endoinulinase	40
4.2.2. Ionebytterkromatografi.....	41
4.3. Kvantitativ og kvalitativ monosakkaridbestemmelse.....	44
4.3.1. Fenol-svovelsyretesten	44
4.3.1. Metanolyse	46
4.3.3. TMS-derivatisering	48
4.3.4. Gasskromatografi	49
4.3.5. Kvantitativ bestemmelse av fruktose, PABR-testen.....	52
4.4. Strukturell analyse.....	53
4.4.1. Bestemmelse av bindingsmønstre	53
4.4.2. Bestemmelse av arabinogalaktan type II.....	64
4.4.3. Enzymatisk degradering med α -L-arabinofuranosidase.....	66
4.4.4. Kvantitativ bestemmelse av fenol-innhold.....	69
4.5. Biologisk aktivitet	73
4.5.1. Komplementfikseringstesten	73
4.5.2. Måling av NO-frigjøring fra makrofager.....	78
4.6. Feltarbeid i Mali	80
5. Resultater og diskusjon	82
5.1. Plantemateriale	82
5.2. Ekstraksjon og fraksjonering.....	82
5.3. Kjemisk karakterisering	84
5.3.1. Kjemisk karakterisering, Vk 100	84
5.3.2. Kjemisk karakterisering, Vk I	86
5.3.3. Kjemisk karakterisering, Vk I 1	91
5.3.4. Kjemisk karakterisering, Vk II.....	92
5.3.5. Kjemisk karakterisering, Vk III.....	92
5.4. Biologiske studier.....	97
5.4.1. Komplementfiksering.....	97

5.4.2. Aktivering av makrofager.....	103
5.5. Etnofarmakologiske studier i Mali	106
5.1.1. Etnofarmakologi	106
5.5.2. Mali	106
5.5.3. Tradisjonell medisin i Mali	107
5.5.4. Feltarbeid.....	108
6. Konklusjon.....	112
7. Referanseliste.....	116

1. FORKORTELSER

α : Alfaposisjon, hydroksylgruppen på karbonatom nr. 1 befinner seg i aksial posisjon, peker oppover i planet

Abs: Absorpsjon

AG I: Arabinogalaktan type I

AG II: Arabinogalaktan type II

AGP: Arabinogalaktanprotein

Ara: Arabinose

β : Betaposisjon, hydroksylgruppen på karbonatom nr. 1 befinner seg i vertikal posisjon, peker ned i planet

BP II: *Biophytum petersianum* II, pektinfraksjon

BSA: Bovint serum albumin

BuOH: Butanol

COX-1: Cyclooxygenase-1

C1: Karbonatom nummer 1 i et monosakkarid

C3: Karbonatom nummer 3 i et monosakkarid

C4: Karbonatom nummer 4 i et monosakkarid

C6: Karbonatom nummer 3 i et monosakkarid

CMC: Carbodiimide

D: D-sukker, når hydroksylgruppen ved det kirale karbonatomet lengst fra karbonylgruppen peker mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer projeksjon

Da: Dalton

DHA: 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarsyre

DMT: Département de Médecines Traditionnelles, Instituttet for tradisjonell medisin

DP: polymeriseringsgrad

f: furanose, femringet monosakkarid

FCR: Folin-Ciocalteu reagenset

FID: Flammeionisasjonsdetektor

Fuc: Fucose

Gal: Galaktose

GalA: Galakturonsyre

GC: Gasskromatografi

GC-MS: Gasskromatografi-massespektrometri

Glc: Glukose

GlcA: Glukuronsyre

HGA: Homogalakturonan

He: Helium

1 hektar: 10 000 m²

Vk I: Fraksjonene med høyest molekylvekt av *Vernonia kotschyana*, ble eluert ut først med Superdex 200

Vk II: Mellomfraksjonene mellom I og III ved eluering av *V. kotschyana* på Superdex 200

Vk III: Fraksjonene med lavest molekylvekt av *V. kotschyana*, ble eluert ut sist med Superdex 200

Vk I 1: Fraksjonene oppnådd etter degradering av Vk I fraksjonene med α -L-arabinofuranosidase

Vk III 1: Fraksjonene oppnådd etter degradering av Vk III fraksjonene med *exo*- og *endo*inulinase

IC₅₀: Konsentrasjon av prøve som gir 50 % hemming av hemolyse i komplementfikseringstesten

IgM: Immunoglobulin M

IgG: Immunoglobulin G

INF- γ : Interferon γ

IL: Interleukin

kDa: kilo Dalton

KDO: 2-keto-3-D-manno-oktulosonsyre

L: L-sukker, når hydroksylgruppen ved det kirale karbonatomet lengst fra karbonylgruppen peker mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer projeksjon

LPS: Lipopolysakkarid

MeOH: Metanol

MWCO: Molecular weight cut off, grensen for molekylvekt som passerer gjennom dialyseslangemembranen

N₂: Nitrogengass

NK-celle: Natural killer celler

NO: Nitrogenoksid

NO₂⁻: Nitritt

NSAIDs: Non steroidal anti-inflammatory drugs

OH: Hydroksylgruppe

PABR: Fenol-Aceton-Borsyre Reagenset

PBS: Fosfatbuffer

PM II: *Plantago major* II, pektinfraksjon

RG I: Rhamnogalakturonan I

RG II: Rhamnogalakturonan II

Rha: Rhamnose

rpm: Antall rotasjoner per minutt

T: Terminal

TFA: Trifloreddiksyre

TMS: Blanding av pyridin, trimetylklorasilan og heksametyldisilasan

UV: Ultraviolett

Vk 100: Råekstraktet av *V. kotschyana* isolert ved vannekstraksjon ved 100 °C

Vko: *V. kotschyana* ”gamle” røtter, 2 år gamle

Vky: *V. kotschyana* ”unge” røtter, 2 måneder gamle

Vkw: *V. kotschyana* ”ville” røtter

Xyl: Xylose

2. SAMMENDRAG

Tradisjonell medisin benyttes av omtrent 80 % av befolkningen i utviklingsland. I tillegg har etterspørselen etter plantemedisin i industriland blitt stor. Råvarene er i all hovedsak ville planter, noe som har ført til at tilgjengeligheten har blitt redusert. Overforbruket av ville planter har videre ført til flere utrydningstruede planter, blant annet *Arcostaphylos uva-ursa* (melbær) og *Glycyrrhiza glabra* (lakrisrot).

I Mali benyttes vannekstrakt av *Vernonia kotschyana* i tradisjonell medisin for behandling av blant annet magesår og gastritt. I tillegg benyttes planten i produksjon av det tradisjonelle naturlegemiddelet ”Gastrosedal”. I 2006 ble det benyttet 9000 kg røtter av *V. kotschyana* til produksjon av ”Gastrosedal”, men denne mengden var utilstrekkelig. Mange kvinner og menn lider av magesår i Mali med en prevalens på henholdsvis 2,4 % og 4,19 %.

V. kotschyana er blant mange utrydningstruede planter på grunn av blant annet overplukk. Dette problemet har instituttet for tradisjonell medisin (DMT) i Mali vært klar over, og dermed organisert dyrkningsforsøk av planten ved uavhengige plantasjer. Plantasjeeiere oppmuntres til videre samarbeid med DMT ved at de selv beholder utbyttet av salget.

Ville røtter av *V. kotschyana* har tidligere blitt studert, og da blant annet et vandig råkstrakt med innhold av sure polysakkarider. Isolerte fraksjoner fra råkstraktet ble funnet å inneholde pektiner av homogalakturonan typen, samt rhamnogalakturonan I med arabinogalaktan type I (AG I), II (AG II) og arabinaner som sidekjeder. Struktur- og aktivitetsstudier ble utført på en rekke fraksjoner og det ble oppdaget at fraksjonen Vk100A2a med innhold av arabinogalaktan type I og II viste best komplementfikserende aktivitet.

Det har derfor vært av interesse å sammenligne forskjeller mellom kultiverte og ville røtter i forhold til polysakkaridsammensetning og biologisk aktivitet.

I denne studien ble det isolert sure pektintype-polysakkarider fra *V. kotschyana* fra både kultiverte og ville røtter. En av fraksjonene, Vk I, viste seg å inneholde pektinet rhamnogalakturonan type I med AG I, AG II, samt arabinansidekjeder. Vk I fraksjonene viste

positivt resultat for innhold av arabinogalaktan type II med Yariv-reagens. Fraksjonene viste lavt glukose- og fruktoseinnhold, noe som tyder på lavt inulininnhold.

En annen av de isolerte fraksjonene, Vk III 1, viste seg å være rene homogalakturonanfraksjoner. De inneholdt hovedsakelig 1 → 4 bundet galakturonsyre, samt terminal galakturonsyre.

På bakgrunn av karbohydrat- og bindingsanalyser ble det funnet at fraksjonene isolert fra kultiverte og ville røtter var tilnærmet like. Alle fraksjonene ble testet for makrofag- og komplementfikserende aktivitet. Alle fraksjonene viste doseavhengig komplementfikserende aktivitet, men Vk I viste best aktivitet. Vko I, fra gamle, kultiverte røtter, gav lavest IC_{50} verdi på 9,5 $\mu\text{g/ml}$ i forhold til positiv kontroll med en IC_{50} -verdi på 20,2 $\mu\text{g/ml}$. Ingen av fraksjonene viste signifikant makrofag aktiverende effekt, men dog viste Vk I fraksjonene en doseavhengig aktivering.

Det konkluderes med at de kultiverte røttene viste biologisk aktivitet på lik linje med de ville røttene.

3. INNLEDNING

3.1. Tradisjonell plantemedisin

En stor del av verdens befolkning benytter seg av plantemedisin som primærmedisin. Verdens helseorganisasjon har estimert at ca 80 % av befolkningen i utviklingsland er avhengig av tradisjonell medisin til medisinsk behandling. Dette skyldes lavere kostnader og større utbredelse av tradisjonell medisin i forhold til konvensjonell medisin. I mange land er det i tillegg mindre tilgang til sykehus, og det eneste tilgjengelige helsetilbudet er medisinmenn. Plantemedisin blir også benyttet i industriland og med økende etterspørsel. I Storbritannia bruker 25 % av befolkningen plantemedisin på regulær basis. I tillegg til behandlende effekt har plantemedisin også kommersiell betydning, i 2003-2004 ble det solgt for 5 milliarder amerikanske dollar i det vestlige markedet, (WHO, 2008).

Råvarene til plantemedisin er i all hovedsak ville planter, og med dagens økende etterspørsel vil det føre til tap av genetisk mangfold og ødeleggelse av deres habitat. I Europa finnes det 1300 medisinske planter som benyttes kommersielt og hvor 90 % er ville planter. På verdensbasis er 2/3 av all innhøstede medisinplanter ville, og flere av plantene er nå utrydningstruet. Dette gjelder blant annet *Arcostaphylos uva-ursa* (melbær) og *Glycyrrhiza glabra* (lakrisrot) (Plantlife, 2004).

3.2. *Vernonia kotschyana*



Figur 3.1 *Vernonia kotschyana*

Vernonia kotschyana Sch. Bip. ex Walp, er i litteraturen også kalt *Vernonia adoensis* Sch. Bip. eller *Baccharoides adoensis* var. *Kotschyana* Sch. Bip. ex Walp, (Isawumi et al., 1996).

Planten tilhører kurvplantefamilien (Asteraceae) med sine 25 000 arter, (Mbatudde et al., 2007).

V. kotschyana er en robust buskaktig plante som kan bli rundt 2 m høy.

Stenglene: Den treaktige, flerårige rotstokken er opphav til flere stengler med videre forgreninger ved endene. Stenglene er brune og fint behåret.

Blader: Bladene er elipseformet (10-15 cm x 25-50 mm), alternerende med matt mørke grønnfarge på oversiden og lysere under.

Blomster: Ved blomstring pyntes toppen av stammen med noen få blomster. Fargen på blomstene er variasjoner av lilla nyanser. På lang avstand kan den minne om tistel.

Habitat: Planten kan bli funnet i blandet skogområde hvor de vokser i skyggen av store trær eller i frodig vegetasjon langs elver og dreneringskanaler, (Sogn, 1998).

Distribusjon: *V. kotschyana* vokser i mange vestafrikanske land (Senegal, Mali, Nigeria og Kamerun), østafrikanske land (Sudan, Etiopia), samt Rwanda, Zambia og Sør-Afrika, (Pope, 1988). I Mali vokser denne planten hovedsakelig i Kolokani, i Koulikoro området, som er 140 km fra hovedstaden Bamako, (Sogn, 1998).



Figur 3.2 Utbredelse av *V. kotschyana* i Afrika.

3.2.1. Navn og klassifisering

Rike: Plantae (planteriket)

Divisjon: Magnoliophyta (Antophyta, dekkfrøete)

Klasse: Magnoliopsida (Dicotyledonae, tofrøbladete)

Underklasse: Asteridae

Familie: Asteraceae (Compositae)

Slekt: Vernonia

Art: *Kotschyana* (Sogn, 1998)

Tradisjonelle navn:

Mali (Bambara): Buaye

Nigeria (Hausa): Domashi (Sogn, 1998)

3.2.2. Tradisjonell bruk av *Vernonia kotschyana*

Vernonia kotschyana benyttes blant annet i Mali til helbredelse av indre- og ytresår, samt gastritt. Planten er en av ingrediensene i et godkjent naturlegemiddel, ”Gastroedal”, til behandling av mage-tarm sår. I 2006 ble det gjort en undersøkelse hvor det ble funnet at de ville plantene utgjorde 9000 kg råmateriale, og av disse ble det laget ca 40 000 medisinposer. Hver pose inneholder 45 doser à 5 g/dose. Doseringen er 3 doser daglig i 45 dager. Denne mengden er ikke nok for behandling av den maliske befolkningen, det er derfor behov for kultivering av planten. I tillegg er planten utrydningstruet noe som er et generelt problem for ville medisinplanter. Det gjøres nå ulike studier, i samarbeid med DMT, for å øke utbyttet av kultiverte *V. kotschyana*-planter ved forskjellige plantasjer. Det er flere problemer i tilknytning til kultivering av *V. kotschyana*, de trenger mye sol og vann, mange av frøene er ikke fruktbare og innhøstningen er vanskelig. Det er derfor mye som kan bedres for å øke utbyttet.

Planten benyttes også i andre land, blant annet Kenya, hvor bladene knuses i kaldt vann og appliseres på kvegsår. I Nord-Nigeria brukes røttene som fordøyelsesfremmende og appetitt vekkende midler, samt mot mavesmerter. I Tanzania benyttes rotekstrakt i behandling av magesmerter og tuberkulose. Her blir også gonoré behandlet med friske røtter kokt i melk og mel, (Burkhill, 1985).

3.2.3. Tidligere studier av *Vernonia kotschyana*

3.2.3.1. Antimikrobiell aktivitet

Bladekstrakt av *V. kotschyana* ble på slutten av 80-tallet testet for antimikrobiell aktivitet av Deeni og Hussain (1994). De testet fem fraksjoner på en rekke gram-positive og gram-negative bakterier, samt noen sopptyper. Fraksjonene ble også testet for innhold av alkaloider. De samme fraksjonene som inneholdt alkaloider viste seg å ha antimikrobiell aktivitet, (Deeni og Hussain, 1994).

3.2.3.2. Antioksidant og molluscicidal aktivitet

78 forskjellige fraksjoner fra 20 forskjellige planter fra Mali ble testet for ulike effekter, blant annet antioksidant, antimalaria og molluscicidal aktivitet. I denne testen ble diklormetan-, metanol- og vannekstrakter av både blader og røtter av *V. kotschyana* benyttet. I denne undersøkelsen viste planten effekt i fire av testene. Den hadde både antioksidant aktivitet og antimalarial effekt, men den utmerket seg i testen mot schistosomiasis. Metanolekstraktet av bladene viste seg å være den mest aktive av alle fraksjonene, (Diallo et al., 2001).

3.2.3.3. Gastrobekyttende aktivitet

V. kotschyana har vist beskyttende effekt på magesår forårsaket av etanol, stress og indometacin i en dyremodell. Vandig ekstrakt av røttene viste en dose-avhengig beskyttelse, samt sår reduksjon ved etanolindusert magesår hos rotter. Sårene ble vurdert på en 0-6 poengskala etter skjønnsmessig vurdering, (Tabell 1). Den samlede poengsummen ble beregnet og uttrykt som ulcerindeks. Ulcerindeksen var 5,5 i kontroll gruppen, 5,0 ved 0,5 g/kg og 2,7 ved 1,0 g/kg. Ved stressindusert magesår viste planten økt beskyttelse i forhold til ranitidin hvor *V. kotschyana* dose på 1,0 g/kg hadde en ulcerindeks på 0,8, men 1,25 ved 50 mg/kg ranitidin. Verken ranitidin eller *V. kotschyana* påvirket mucus sekresjonen eller proteinkonsentrasjonen. Ved indometacin indusert magesår ble MeOH, BuOH og vannekstrakter testet. Resultatet viste at alle *V. kotschyana*-fraksjonene og ranitidin reduserte ulcer indeksen. Vannekstraktet viste den høyeste reduksjonen. Ingen av fraksjonene hadde effekt på andre testede parametre, blant annet syreproduksjonen og syrevolumet. Det var kun BuOH-fraksjonen som ga reduksjon i pepsin produksjonen, og totalt hadde denne fraksjonen best gastrobekyttende aktivitet, (Sanogo et al., 1996).

Tabell 1 Poengskala for magesår, (Germanó et al., 1996).

0	Ingen sår
1	1-3 små sår (≤ 10 mm i lengde)
2	1-3 store sår (> 10 mm i lengde)
3	1-3 fortykkede sår
4	Flere enn 3 små sår
5	Flere enn 3 store sår
6	Flere enn 3 fortykkede sår

3.2.3.4. Immunomodulerende aktivitet

Det har blitt utført studier av polysakkarider fra de ville røttene av *V. kotschyana*. Røtter av *V. kotschyana* ble ekstrahert med vann ved 50 °C og 100 °C. Videre ble det benyttet en ionebytterkolonne som ga opphav til seks fraksjoner, to nøytrale og fire med sure polysakkarider.

En av de sure fraksjonene, Vk100A2, ble fraksjonert ytterligere til Vk100A2a og Vk100A2b med en gelfiltreringskolonne. Vk100A2a viste seg å inneholde et rhamnogalakturonan type I (RG I) med sidekjeder av AG I og AG II typen med en molekylvekt på 1150 kDa.

Pektinfraksjonen Vk100A2b var et homogalakturonan på 20 kDa. Vk100A2b viste lav komplementfikserende aktivitet, mens Vk100A2a fraksjonen viste høy aktivitet.

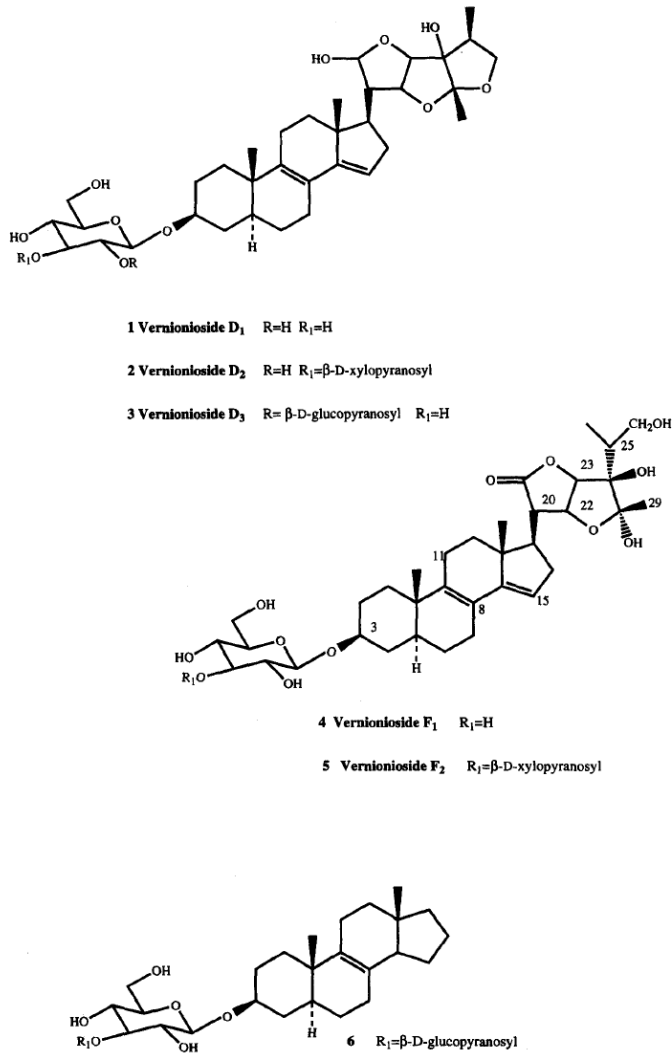
Pektinfraksjonen Vk100A2b viste ingen effekt på B-celle proliferering, mens Vk100A2a viste T-celle uavhengig induksjon av B-celler. Forskjellene i bioaktivitet mellom fraksjonene skyldes antageligvis den store forskjellen mellom molekylvektene, 20kDa versus 1150 kDa, samt forskjellen i sammensetning av pektinet. Vk100A2a inneholder RG I med sidekjeder av AG I og AG II, mens Vk100A2b er et homogalakturonan.

Mange arabinogalaktan II pektiner har vist komplementfikserende aktivitet, men det er også rapportert flere arabinogalaktaner uten biologisk aktivitet. Dette var grunnlaget for videre undersøkelse av Vk100A2a. Fraksjonen ble videre behandlet med endo- α -D-1,4-polygalakturonase etter deesterifisering for å fjerne homogalakturonan-kjedene. Fraksjonen

Vk2a-HR ble samlet etter gelfiltrering, og en 40 % reduksjon av GalA i forhold til Vk100A2a ble vist. Innholdet av GalA og Rha i fraksjonen var 1:1, dette tyder på et RG I (hairy region). Test på om fraksjonen inneholdt rhamnogalakturonan II (RG II) var negativ. Vk2a-HR hadde lavere komplementfikseringsaktivitet enn Vk100A2a, noe som kan bety at polygalakturonanenheten er viktig for effekten. Det kan også skyldes konformasjonsendringer på polysakkaridet og dermed mindre affinitet for komplementproteinene. Ved videre degradering med ulike enzymer ble det opparbeidet en fraksjon med ekstremt høy komplementfikserende aktivitet. Denne fraksjonen, AF-GN-1, hadde fått redusert både arabinan- og arabinogalaktansidekjedene, samt deler av RG I området. Det som gjensto var en åpen struktur med sannsynligvis bedre tilgang til de bioaktive setene, (Nergard et al., 2004, 2005a og 2005b).

3.2.3.5. Lav-molekulære substanser

V. kotschyana inneholder i tillegg til polysakkarider også et antall vernoniosider, stigmastan-liknende glykosider. Det er glykosider bestående av en steroidenhet og sukkerenheter. (Sanogo et al., 1998)

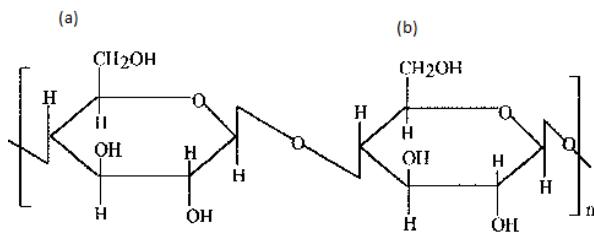


Figur 3.3 *Strukturer av lavmolekulære substanser i V. kotschyana*

3.3. Polysakkarider

3.3.1. Generelt om polysakkarider

Polysakkarider er sukkerpolymere som består av flere enn ti monosakkarider. Bindingene mellom enkeltenhetene kalles glykosidbindinger, disse oppstår når en hemiacetal på enhet (a) reagerer med en hydroksylgruppe på enhet (b).



Figur 3.4 Bindingen mellom monosakkaridene kalles glykosidbinding.

De fleste sukkerer har mange frie hydroksylgrupper, og det vil derfor være mulig å danne mange kombinasjoner. Det er ikke bare bindingstype som avgjør det store mangfoldet, men også den store variasjonen av monosakkarideneheter. Det vil si at i teorien er det mulig med mange kombinasjoner, men i naturen er det likevel begrenset hva som finnes av ulike polysakkarider. Enkeltenhetene i polysakkarider er alltid enten 5- eller 6-ringede forbindelser som henholdsvis kalles furanoser eller pyranoser.

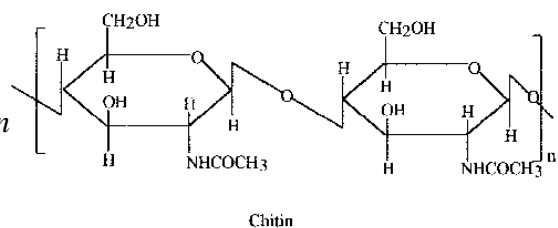
Polysakkarider kan være enkle, lineære, eller mer komplekse, forgreinede. Disse kan inndeles i to kategorier:

Homopolysakkarider: består av kun én type monosakkarid.

Heteropolysakkarider: består av to eller flere ulike monosakkarider. Denne kategorien kan inndeles videre avhengig av monosakkaridmønsteret i polymeren. Det finnes blant annet de med blokkvis konformasjon, (Cui, 2005).

I naturen har polysakkarider varierende funksjoner som skyldes at de har ulike egenskaper som igjen bestemmes av deres oppbygning. Noen polysakkarider opptrer som energilagre i form av glykogen i dyr og mennesker, og som stivelse i planter. Andre polysakkarider som cellulose og kitin i henholdsvis planter, og skalldyr/insekter er viktige bestandeler i deres form for skjelett, (Kumar, 2000).

Figur 3.5 Den repeterende enheten i chitin-polymeren



3.3.2. Polysakkarider i planter

Planter har til forskjell fra dyreceller en rigid cellevegg som fastsetter dens form. Etter en celledeling dannes det nye primærcelevegger. Disse er separert fra nabocellene med en ”midt lamella”, bestående hovedsakelig av pektiner. Primærceleveggen er et tynt lag med stort innhold av cellulose, hemicellulose, pektin og protein. Det spesielle med primærcelevegger er deres evne til å vokse og ekspandere. Noen planteceller vil komme til den fasen hvor de ikke lenger skal vokse og bli større. De vil da legge på et nytt lag med cellevegg, alltid mellom primærceleveggen og cytoplasma. Dette laget kalles sekundærcelevegg og likner mye på primærceleveggen, men med mindre innhold av pektin og protein, og i stedet mer cellulose og lignin. Sekundærceleveggen kan være forskjellig fra plante til plante i forhold til funksjon og sammensetning, men er som regel tykkere enn primærceleveggen. I noen planter benyttes denne til lagring av karbohydrater, (Lerouxel, et al., 2006, Buchanan et al., 2000 og Albersheim et al., 2011).

3.3.3. Polysakkarider i celleveggen

3.3.3.1. Cellulose

Cellulose er det polysakkaridet som det finnes mest av i planten og på jorda generelt. Polymeren er lineær, sammensatt av (1→4)β-D-glukopyranoseenheter. I planten befinner cellulose seg som mikrofibriller, hvor hver slik mikrofibrill består av gjennomsnittlig 36 parallelle kjeder. Kjedene kan ha opptil flere tusen enheter, og disse holdes sammen av en rekke hydrogenbindinger. Denne formasjonen av glukose gir et veldig sterkt materiale som er uløselig og kjemisk stabilt. Primærceleveggen består av 20-30 %, mens sekundærceleveggen inneholder opptil 50 % cellulose, (Buchanan et al., 2000 og Albersheim et al., 2011)

3.3.3.2. Hemicellulose

Hemicellulose er en betegnelse som ble foreslått av Schulze i 1891, og skulle benyttes for polysakkarider som kunne ekstraheres fra planten med basiske løsninger, (Miller, 1973). De fleste hemicellulosene består av ulike sukkerenheter, blant annet xylose, mannose, glukose, galaktose, og arabinose. Hemicellulose kan deles inn i flere klasser, blant annet:

1. Xyloglukaner, med en hovedkjede bestående av (1→4)β-D-Glc med et antall α-D-Xyl enheter som sidegrupper. Noen Xyl-enheter har bundet til seg β-D-Gal- eller α-L-Fuc-enheter.
2. Glukuronarabinoxylaner består av (1→4)β-D-Xyl med sidegrupper av α-L-Ara og α-D-GlcA

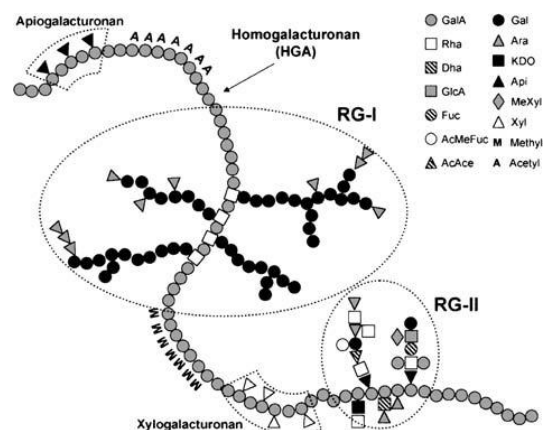
Andre typer med mindre forekomst er glukomannaner, galaktoglukomannaner og galaktomannaner.

Hemicellulosen fungerer som bindeledd mellom mikrofibrillene i celleveggen, og reduserer aggregering av mikrofibriller til store fibriller. Dette nettverket er med på å stabilisere andre makromolekyler i celleveggen. Det er hovedsakelig hemicellulose av xyloglukan typen som bindes til cellulosen, (Buchanan et al., 2000)

3.3.3.3. Pektiner

Pektiner er en gruppe polysakkarider rike på sure sukkere, i hovedsak galakturonsyre (GalA). De befinner seg stort sett i primærceleveggen og ”midt-lamella” hvor de deltar i mange oppgaver. De bidrar blant annet til celleveggens porøsitet, som igjen påvirker celleveksten. Pektiner er med på regulering av pH og ionebalansen, og fungerer også som et alarmsystem ved ytre angrep av patogener. Pektiner i ”midt-lamella” er viktige for celle-celle kontakt, og fungerer som limet som holder dem sammen.

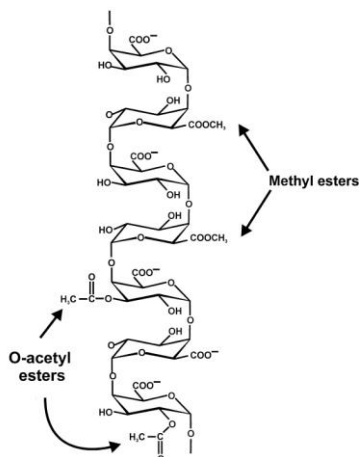
Pektiner har tydelige strukturelle kjennetegn, men med variasjoner innenfor opphavskilden. De består av tre enheter, homogalakturonan (HGA), rhamnogalakturonan I (RG I) og rhamnogalakturonan II (RG II). En teori er at disse tre delene er koblet sammen via glykosidbinding, hvor HGA er hovedkjeden, (Albersheim et al., 2011).



Figur 3.6 Foreslått struktur for struktur av pektiner (Perez et al., 2003)

3.3.3.3.1. Homogalakturonan (HGA)

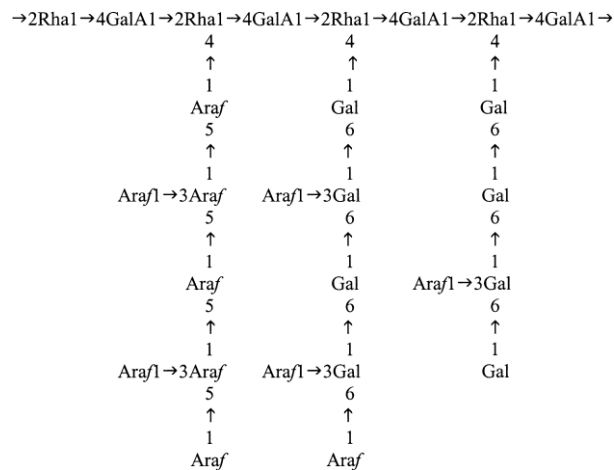
Dette er en homopolymer bestående av (1→4) α -D-GalA, og kalles "smooth region" pga mangel på forgreininger. Dette området kan inneholde så mange som 200 GalA-enheter, og være opptil 100 nm lang. Karboksylsyrene på GalA kan være metylforestret og graden av dette kan variere. Uesterifiserte områder av HGA deltar i dannelsen av geler i celleveggen via Ca^{2+} kryssbinding med andre liknende HGA områder. Geldannelse kan også oppstå uten uesterifiserte GalA-enheter, men da via hydrogenbindinger. Disse gelene bidrar blant annet til å styrke cellulose-hemicellulose nettverket. Noen plantetyper har xylose eller apiose bundet til GalA og heter henholdsvis xylogalakturonan eller apigalakturonan.



Figur 3.7 Homogalakturonan bestående av 1→4 bundet GalA-enheter. Karboksylsyrene kan enten være forrestrede eller frie, (Ridley et al., 2001).

3.3.3.3.2. Rhamnogalakturonan I (RG I)

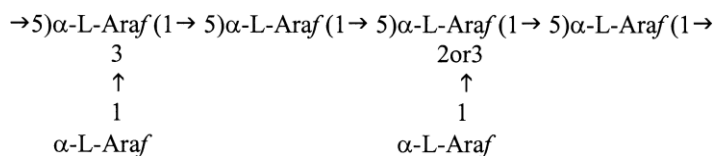
I tillegg til HGA består pektiner også av RG I, hvilket er en hovedkjede med repeterende disakkarid av rhamnose og galakturonsyre, (1→2) α -L-Rha-(1→4) α -D-GalA. På ca 25-80% av alle rhamnose-enhetene sitter det sidekjedder av nøytrale sukkerer, med C4 som forgreiningspunkt. De mange sidegruppene på dette området er årsaken til at det har fått navnet "hairy region", (Albersheim, et al., 2011 og Heinze, 2005).



Figur 3.8 Rhamnogalakturonan hovedkjede med alternerende Rha- og GalA-enheter med ulike sidekjedder, arabinaner og arabinogalaktaner.

Det finnes mange forskjellige sidekjedder, ca 40 ulike, men de vanligste er av disse: (Albersheim et al., 2011):

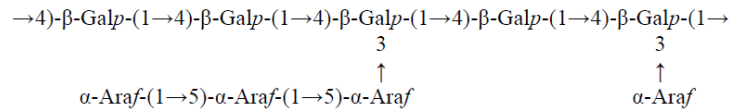
1. Arabinaner: polymere bestående av (1→5)- α -L-Ara, disse kan igjen være forgreinet på 2 eller 3 posisjonen av andre arabinose-enheter.



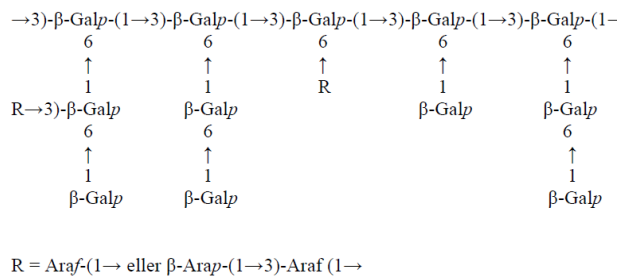
Figur 3.9 Skisse av et arabinan

2. Arabinogalaktan type I og II (AG I og AG II): AG I har en hovedkjede bestående av (1→4) β -D-Gal med sidekjedder av arabinaner bundet på Gal-enhetenes C3. AG II er bygget opp av en hovedkjede (1→3) β -D-Gal-enheter, med sidekjedder av (1→6) β -D-Gal-enheter med forgreninger av galaktose- og arabinoseenheter.

Tilstedeværelse av AG II i pektiner kan bestemmes ved å benytte Yariv reagens. AG II vil felles ut og danne et rødbrunt farget bunnfall.



Figur 3.10 Arabinogalaktan type I, (Sagberg, 2006).

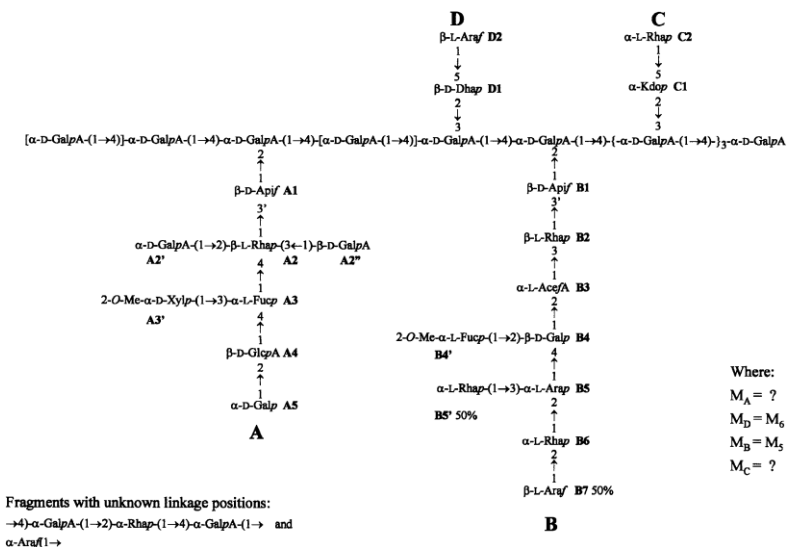


Figur 3.11 Arabinogalaktan type II, (Sagberg, 2006).

- Galaktaner: Består av (1→4) β -D-Gal. I noen tilfeller kan det forekomme andre galaktanenheter bundet (1→3) på hovedkjeden.

3.3.3.3.3. Rhamnogalakturonan II (RG II)

RG II er et meget spesielt pektin pga dens innhold av sjeldne sukkertyper. Det har en hovedkjede på 9-10 enheter av (1→4) α -D-GalA med fire forskjellige sidekjeder koblet via C3 eller C4. Det er sidekjedene som står for det spesielle, de inneholder sukkerenheter som 2-O-metylfucose, 2-O-metylxylose, apiose, asersyre, 2-keto-3-D-manno-oktulosonsyre (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarsyre (DHA), men de inneholder også vanlig monosakkarider som rhamnose, galaktose, mannose, arabinose, xylose, glukose, fucose og glukuronsyre. I celleveggen kan RG II enten være i en monomer- eller dimerform. Dimeren er koblet sammen av borat-ioner, og denne formen er viktig for plantens vekst, (Albersheim et al., 2011 og Heinze, 2005).



Figur 3.12 Foreslått struktur av rhamnogalakturonan II.

3.3.3.4. Inulin

Inulin er en lineær polymer som er satt sammen α -D-Glc (1→2)(β -D-fruktofuranose)_n (2→1) β -D-fruktoseenheter med en polymeriseringsgrad* (DP) på opptil 100. Inulin fungerer som karbohydratreserve, osmoseregulator og beskytter planten mot tørke og kulde. Inulin finnes spesielt i planter som tilhører Asteraceae familien. Inulinlagrene opparbeides i løpet av sommer- og høstmånedene og benyttes på våren. Inulin fordøyes ikke av mennesket, men brytes ned av bifidobakterier i tykktarmen og stimulerer deres vekst. Polymeren er svært interessant pga effekt på kolonkreft og kolesterolreduksjon, (Cui, 2005 og Nergard, et al., 2004).

* Polymeriseringsgraden er antall sukkerenheter i polymeren

3.3.4. Pektiner med biologisk aktivitet

Plantemedisin består ikke kun av lavmolekylære substanser som, blant annet alkaloider, terpenoider og flavonoider, men også polysakkarider, proteiner og tanniner, substanser med høy molekylvekt. Mange substanser av lavmolekylær art har vist å ha biologisk aktivitet, men disse har ikke kunnet forklare hele den effekten plantemedisinen utøver. Flere høymolekylære substanser har vist å ha farmakologiske effekter.

Angelica acutiloba

Vannekstrakt av røttene ble tidlig på 80-tallet studert, hvor to av ekstraktene inneholdt pektiner av arabinogalaktan II typen, AGIIa og AGIIb-I, med innhold av arabino- β -3,6-galaktaner. Resterende fraksjoner, AR-2IIa, 2IIb, 2IIc og IId, ble klassifisert som pektiner. Ekstraktene AR-2IIa, 2IIb, 2IIc viste seg å aktivere komplementsystemet via klassisk vei. Kun AR-2IId aktiverte komplementsystemet via klassisk- og alternativ vei. Pektinene viste seg å bestå av 90 % homogalakturonan med liten andel forgrenede områder. De forgrenede områdene bestod hovedsakelig av hovedkjede av RG I typen med forgreninger via Rha. Forgreningene viste seg å være arabinogalaktan I og II, galaktaner, samt arabinaner. Degradering av homogalakturonan med *endo*- α -(1 \rightarrow 4)polygalakturonase ga forgrenede områder og (1 \rightarrow 4) bundet oligogalakturonider. De forgrenede områdene viste bedre komplementfikserende aktivitet enn de originale pektinene, mens oligogalakturonidene viste svak eller ingen aktivitet. Det ble derfor antatt at de forgrenede områdene var ansvarlige for den komplementfikserende aktiviteten. Den komplementfikserende effekten ble ikke redusert ved reduksjon av arabinaner, (Yamada, 1994).

Glinus oppositifolius

Planten er blitt benyttet i Vest-Afrika til behandling av blant annet sår, malaria og feber. Det er blitt isolert to sure polysakkarid fraksjoner, GOA 1 og GOA 2, med effekt på komplementsystemet. GOA 1 antas å inneholde AG I og II på grunn av tilstedeværelse av 1,3- og 1,5 bundet Ara og 1,4-, 1,3 og 1,3,6-bundet Gal. GOA 2 antas å bestå av pektiner av RG I-typen, med sidekjedder av AG II bundet via Rha. Begge fraksjonene har vist immunmodulerende aktivitet, blant annet komplementfikserende aktivitet og effekter på makrofag, T-celler, samt B-celler, (Inngjerdingen et al., 2005).

Glycyrrhiza uralensis

Glycyrrhiza uralensis røtter har lenge blitt benyttet i japansk plantemedisin for behandling av, blant annet betennelse, allergi og mage-tarm sår.

Røttene fra *Glycyrrhiza uralensis* har etter bearbeidelse gitt opphav til to pektinfraksjoner, GU-3IIa-2 og 3IIb-I, med høyt biologisk aktivitet. Pektinet GU-3IIa-2 består hovedsakelig av Ara- og Gal-, samt GalA-enheter. Polymeren viste seg å bestå av blant annet arabinogalaktan type II på grunn av utfelling med Yariv reagens. GU-3IIa-2 har vist seg å fremme proliferering av beinmargsceller, mens 3IIb-I fremmet NK-celle mediert tumor cytotoxisk aktivitet.

Til forskjell fra GU-3IIa-2 ga 3IIb-I pektinet ingen utfelling med Yariv-reagens, men inneholdt store mengder 1→4 bundet Gal-enheter, noe som er typisk for arabinogalaktan type I, (Heinze, 2005).

Plantago major

Planten er bedre kjent som groblad og har lenge blitt brukt i europeisk tradisjonell medisin til behandling av blant annet skrubbsår, brannsår og vepsestikk. I en undersøkelse av planten ble flere polysakkaridfraksjoner isolert. Et av disse, PMII, består av sure polysakkarider og arabinogalaktan II, og viste høy aktivering av komplementsystemet. PMII målte 84 % hemming av hemolyse i forhold til kontrollen (*Angelica acutiloba*) med 94 %, (Samulesen et al., 1995).

Piper nigrum

Et polysakkarid i svart pepper har vist å inneha en meget potent komplementfikserende aktivitet. Polysakkaridet som var et AG II bestående hovedsakelig av Rha-, Ara-, Gal-, og GalA-enheter, og gav utfelling med Yariv reagens, (Heinze, 2005).

Echinacea purpurea

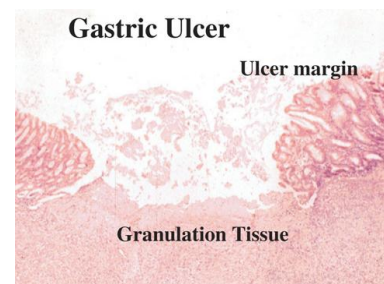
Echinacea slekten har lenge blitt benyttet i tradisjonell medisin for en rekke lidelser, blant annet behandling av sår, slangebitt, hodepine, samt forkjølelse. Polysakkarider (PS I og PS II) isolert fra vandige fraksjoner av *Echinacea purpurea* viste seg å stimulere fagocytose både *in vivo* og *in vitro*, samt å aktivere makrofager. Analyser av polysakkaridene viste at PS I var et

4-O-metyl-glukuronarabinoxylan, mens PS II var en sur arabinogalaktan med arabino-3,6-galaktan og arabinaner, (Lawson og Bauer, 1998 og Inngjerdingen, K. T., 2000).

3.4. Sår

3.4.1. Mage-tarm sår

Det er omtrent 14,5 millioner mennesker som har mage-tarm sår og det antas at 4,08 millioner dør av dette, (Srikanta et al., 2007). Prevalensen i Mali er på 4,19 % blant menn og 2,4 % blant kvinner, (Maïga et al., 1995). Sykdommen skyldes flere faktorer, blant annet stress, *Helicobacter pylori*-bakterien, NSAIDs, COX-1 hemmere. Mage-tarm sår oppstår ved ubalanse mellom sårfremmende faktorer som økt syre og *H. pylori*, og beskyttende faktorer som mucus og bikarbonatutskillelse, (Srikanta et al., 2007).



Figur 3.13 Sår dannelse i gastro-intestinal traktus.

3.4.2. Sårheling

Når sår heles er det en rekke celler involvert, blant annet makrofager, endotelceller og fibroblaster. Makrofager fagocytterer dødt vev og skiller ut vekstfaktorer som er essensielt for sårheling. Mage-tarm sår heles slik som andre hudsår, og denne gjennomgår tre faser.

Rengjørings/inflammasjonsfasen: Det første som skjer er at skadede blodårer tettes igjen ved hjelp av blodplater og koagulasjon. Blodkarene trekker seg sammen og blodklotting oppstår. Dette er til for å redusere blødningen. Etterfulgt av redusert gjennomblødning utvikles det en oksygenmangel som igjen fører til en rekke kjemiske prosesser. Ved fravær av oksygen vil forbrenningen likevel fortsette og det vil oppstå dannelse av syrer. Det lave oksygenivået og det sure miljøet setter i gang produksjon av en rekke vekstfaktorer. I denne fasen dannes det også nye blodkar som er viktig for nydannelse av bindevev. Makrofagene har her rolle som ”renholdsarbeider”.

Nydannelsesfasen: Makrofager i denne fasen fortsetter med å fjerne dødt vev, og stimulerer dannelsen av fibroblaster. Bindevev dannes og brytes ned i denne fasen med ulike styrker og funksjon som blant annet bakteriehemmende og fuktighetsbevarende.

Modningsfasen: Mengden av fibroblaster og makrofager reduseres. Bindevevet har økende styrke og huden tåler mer, (Langøen, 1994)

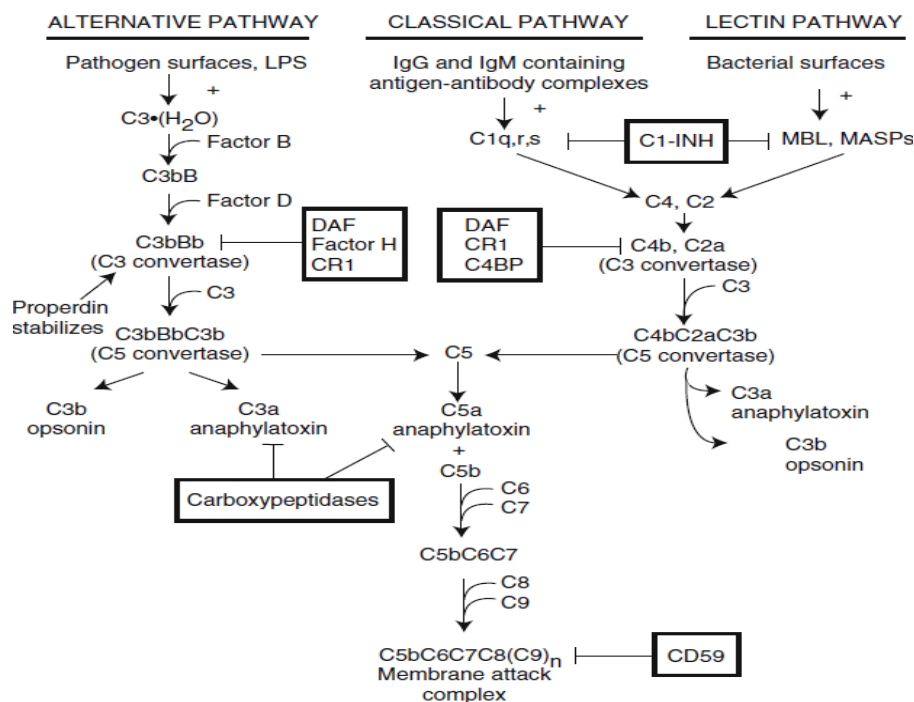
3.5. Immunmodulerende aktivitet

3.5.1. Komplementsystemet

Komplementsystemet er et kaskade-system bestående av flere enn 30 proteiner. Disse befinner seg i inaktiv form i blodet eller bundet til membraner. Aktivering av kaskaden kan utløses via tre forskjellige veier: klassisk-, alternativ- og lektinvei med henholdsvis C1, C3 og C4 som startproteiner.

Klassisk vei aktiveres når IgM eller IgG interagerer med C1, mens for aktivering av alternativ vei kreves det karbohydrater, lipider eller proteiner funnet på eksogene overflater. Lektinvei aktiveres når karbohydratenheter på patogene mikroorganismer bindes til mannan-bindende lektin.

Uansett hvilken rute som aktiveres vil alle ende med aktivering av C3 og dermed aktivere komponentene C3a, C3b, C5a og det membranperforerende komplekset C5b-C9. C3a og C5a er de mest potente komponentene hvor de fremkaller en rekke fysiologiske responser, blant annet økt vaskulær permeabilitet, modulering av antistoffproduksjon, frisetting av histamin og apoptose.



Figur 3.14 Oversikt over komplementsystemets mange proteiner og kaskadeveier.

Det er ingen hemmelighet at dagens skolemedisin har mange uønskede bivirkninger. Det er derfor stor interesse for å finne nye metoder og substanser for behandling av ulike lidelser. De fleste polysakkarider fra planter er relativt ufarlige, og med lite eller ingen bivirkninger. For å undersøke polysakkariders evne til immunmodulering benyttes ofte komplementfikseringstesten. Det er vanskelig å vite etter bruk av denne metoden om polysakkeridene har aktiverende eller hemmende evne. I denne testen benyttes det antistoff-sensibiliserte saue-erythrocytter inkubert med humane komplementproteiner. Komplementsystemet vil føre til hemolyse av blodcellene, men ved tilsetning av en immunmodulerende substans vil en reduksjon i hemolyse forekomme. Denne reduksjonen kan enten skyldes aktivering av komplementsystemet eller hemming av noen trinn i systemet. Dette betyr at komplementfikserende aktivitet refererer til enten hemming eller aktivering av komplementsystemet, (Sarma og Ward, 2010).

3.5.2. Makrofagaktivering

Makrofager finnes i alle vev, og har tre hovedfunksjoner:

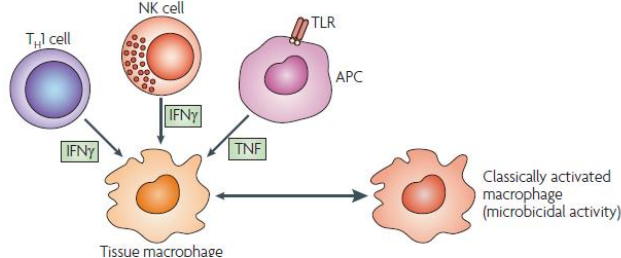
- Bekjempe patogener
- Sårheling
- Immunregulering

Denne celletypen kan aktiveres på to måter, enten via klassisk eller alternativ aktivering.

Klassisk aktivering

Her aktiveres makrofagene via Toll-like reseptorer og interfeon- γ (INF γ). Makrofager som aktiveres på denne måten kan drepe mikroorganismer, øke utskillelse av cytokiner og andre mediatorer.

INF γ er et cytokin som produseres av det adaptive og det medfødte immunsystemets celler. Ved stress eller infeksjoner vil kroppens natural killer (NK)-celler produsere INF γ . Dette vil igjen påvirke makrofager til utskillelse av pro-inflammasjons cytokiner, og øke produksjon av oksygen- og nitrogenradikaler for å eliminere patogener. Denne metoden gir en kortvarig aktivering av makrofagene, men ved produksjon av INF γ av T hjelperciller oppnås lengre aktivering.

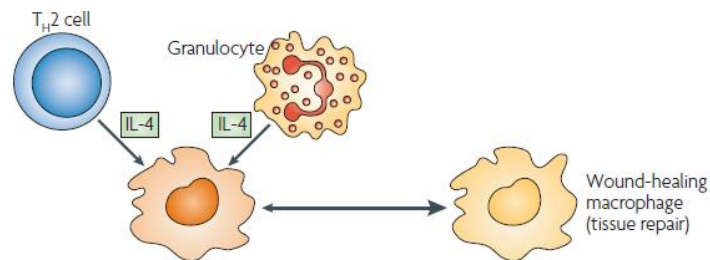


Figur 3.15 Aktivering av makrofager via klassisk vei

Makrofager og sårheling (alternativ aktivering)

Makrofager ved sårheling aktiveres også via signaler fra det adaptive og det medfødte immunsystemet. Man antar at det første signalmolekylet som produseres ved vevskade er IL-4. Det er blant annet basofiler og mastceller som produserer dette. Produksjonen av IL-4 kan også forekomme uten vevskade, via f.eks biopolymeren chitin. Makrofagene som blir stimulert av IL-4 blir til sårhelingsarbeidere. T-hjelpeceller kan ved ubalanse på slimhinner, hovedsakelig tarmen og lunger, produsere IL-4. Makrofagene er mer effektive i å produsere

drepende radikaler enn ved alternativ aktivering. Med denne metoden dannes det komponenter som primært er for sårheling.



Figur 3.16 For aktivering av makrofager via alternativ vei kreves det hjelp fra det medfødte immunsystemet.

Makrofager fungerer også som antigenpresenterende celler for T-lymfocytter som starter en adaptiv immunrespon, (Mosser og Edwards 2008).

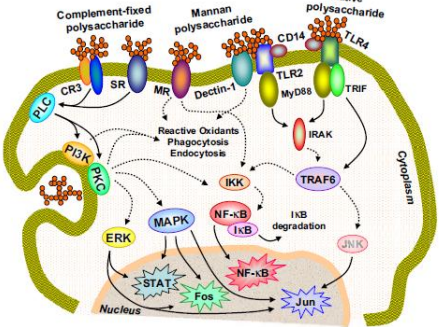
En rekke plantepolysakkarider har utvist farmakologiske effekter pga deres evne til å interferere i makrofagens funksjon. De bidrar til økt produksjon av nitrogen- og oksygenradikaler, utskillelse av cytokiner, samt fagocytterende- og cytotoksiske aktivitet.

En plante som tradisjonelt er blitt benyttet i Europa og Nord-Amerika i behandling av blant annet betennelse er *Arnica montana* L. I en undersøkelse ble det funnet en pektinfraksjon, kalt AI, med immunmodulerende effekt. Denne fraksjonen bestående av RG I viste *in vitro* stimulering av makrofagene ved utskillelse av tumor nekrose faktor selv ved lave konsentrasjoner, (Puhlmann et al., 1991). *Biophytum petersiannum* Klotzsch benyttes i Mali til behandling av blant annet sår, mavesår og inflammasjon. En studie viser at polysakkarider av pektintype isolert fra planten (BP 1002 og BP 1002-I) har aktiverende effekt på makrofager. Dette kan være noe av forklaringen på plantens legende effekt, (Inngjerdingen et al., 2008).

Glukan er en polymer bestående av glukose, og har vist økt biosyntese av kollagen som er effektivt benyttet i behandling av brannsår. Mekanismen bak denne immunmodulerende aktivitet er ukjent, men det er velkjent at glukopolymere aktiverer makrofager. Når polymeren bindes til reseptorer på makrofagene aktiveres en rekke signaleveier og transkripsjonsfaktorer.

Det antas at aktivering av makrofagene via polysakkarider skjer via reseptorer som TLR4, CD14 og mannoserreseptorer. Aktivering av reseptorene fører til produksjon av en rekke

signalmolekyler. Lipopolysakkarider (LPS) som finnes på noen mikroorganismers cellemembran har høy affinitet for CD14 reseptoren, (Schepetkin og Quinn, 2006).



Figur 3.17 Reaksjonskaskaden i makrofagene ved aktivering.

3.6. Oppgavens mål

1. Sammenligne ville og kultiverte røtter av *Vernonia kotschyana* med hensyn på:
 - A: Innhold og sammensetning av polysakkarider i de vandige rækstraktene.
 - B: Biologisk aktivitet av isolerte polysakkaridfraksjoner.

2. Undersøke hvilke metoder som brukes for kultivering av *V. kotschyana* i Mali i dag på ulike plantasjer.

4. METODER

4.1. Generelle metoder

4.1.1. Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann i alle metoder.

4.1.2. Innveiing

Analysevekt:

Sartorius BP 221S, Goettingen, Tyskland

Sartorius ED 224S, Goettingen, Tyskland

4.1.3. Tørking av karbohydrat-materiale

Materiale til tørking ble lagt i en eksikator hvor vakuum ble oppnådd ved hjelp av en pumpe, og fuktigheten ble absorbert av P_2O_5 .

Utstyr

Absorpsjonsmateriale: P_2O_5

Vakuumpumpe: Ilmvac

4.1.4. Avgassing av væsker

For å fjerne luft i løsninger ble en av disse metodene benyttet:

Avgassing med He-gass i ~ 20 min, hvor He-gassen fortrenger oksygenet i væsken.

Avgassing ved bruk av vakuum-pumpe.

4.1.5. Filtrering

Whatman[®] filter paper 41 ashless

Millex[®] GP, sterile, 0,22 μm (Millipore)

PALL[®] Acrodisc[®], sterile, 0,45 μm

4.1.6. Tørring med N₂-gass

Prøvene ble tørket under N₂-gass ved 37 °C og maks 2 PSI i trykk.

Utstyr

Pierce Reacti-Therm III TM, heating module N-18840

4.1.7. Volumreduksjon

Væsker med stort volum ble redusert ved bruk av rotavapor under trykk ved 40 °C.

Utstyr

IKA RV 10 Basic Rotavapor

4.1.8. Blanding av løsninger

Disse ble blandet på:

MS2 Minishaker IKA®

RCT basic IKA laboretechnik

4.1.9. Sentrifugering

Farmasøytisk institutt: Heraeus multifuge 4 KR

Rikshospitalet: Rottina 420R Hettich zentrifugen

Folkehelseinstituttet: Thermo scientific Heraeus multifuge 3SR+ Centrifuge

4.1.10. Måling av pH

Det ble benyttet en av følgende metoder ved pH-målinger:

Seven Easy™ pH Meter S20, Mettler Toledo;

elektrode: Thermo Scientific Orion Ross 8115BN

pH-papir: pH-indicator strips, pH 0-14, Universal indicator, MERCK

4.1.11. Vasking av dialyseslanger

Prinsipp

Dialyseslangene som ble brukt var tørre og ble vasket for klargjøring og fjerning av eventuelle spormengder av cellulose.

Kjemikalier

2 % NaOH (aq), 90 g NaOH pellets løst i 4,5 L vann

0,05 % Na-azid

Springvann og destillert vann

Utstyr

Kjele

Kokeplate

Dialyseslanger: Spectra/Por[®] Molecularporous membrane tubing (Spectrum Laboratories, Inc.) MWCO: 3,500 (d: 29mm)

Glasstav

Husk! Brilller og hansker

Framgangsmåte

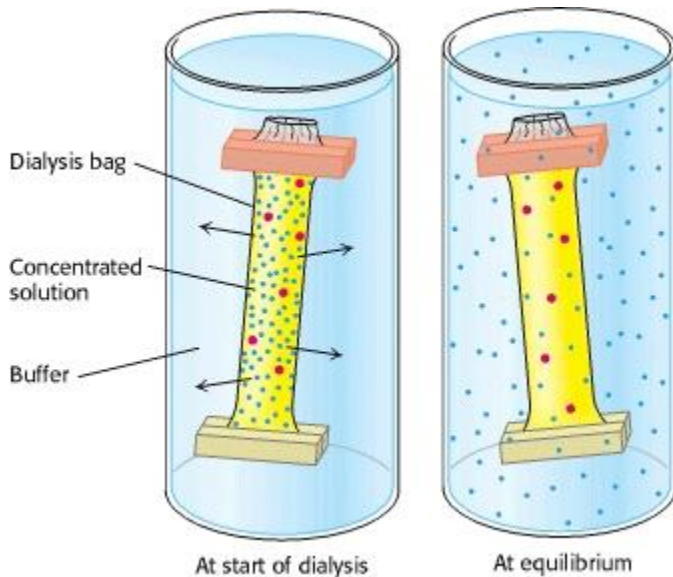
1. 2 % NaOH-løsningen ble kokt opp.
2. Klippet opp dialyseslangene i ~ 60 cm lange remser, kan endres etter behov.
3. Skylte slangene i springvann både utvendig og innvendig.
4. La dem ned i NaOH-løsningen, og fylte dem med noe av løsningen ved hjelp av glasstav.
5. Kokte dem i 10 min med lokket på, slangene ble av og til dyttet ned i løsning da de fløt opp.
6. Slangene ble skylt to ganger med springvann utvendig og innvendig. De ble vasket en tredje gang med destillert vann.
7. Videre ble de kokt i destillert vann i 10 min.
8. Slangene ble vasket godt innvendig og utvendig med destillert vann.

9. Ble så oppbevart i plastbeholder i 0,05 % Na-azid-løsning i kjøleskap som holdt 4 °C.
Dette er viktig for å hindre bakterievekst.

4.1.12. Dialyse

Prinsipp (Aulton, 2007)

Metoden benyttes for å fjerne uønskede molekyler fra prøveløsninger. Ved behandling av karbohydratløsninger ønsker man å kvitte seg med blant annet salter. Dialyseslangene består av små porer som tillater molekyler med molekylstørrelse under slangenes cut-off verdi å diffundere over membranen. Dialysevannet bør skiftes flere ganger for å opprettholde osmosestrykket.



Figur 4.1 Dialysering av prøveløsning fra høykonsentrasjonsgradient (venstre) til likevekt oppnås (høyre). Kraftene bak denne prosessen er osmotiske krefter.

Kjemikalier

Destillert vann

Toluen

Utstyr

Dialyseslanger (se 4.1.11)

Dialyseklyper

Trakt

Plastbøtter

Magnet og magnetrører

Aluminiumsfolie

Glasstaver eller liknende

Saltmeter SSX 210, -ebro[®]

Framgangsmåte

1. Dialyseslangene ble vasket med destillert vann for å fjerne Na-azid
2. En knute ble laget i den ene enden og en dialyseklype ble satt på, sjekk for hull i slangene.
3. Løsningene ble overført til slangene ved hjelp av trakt, ca $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ fulle slanger.
4. En dråpe toluen ble tilsatt for å forhindre bakterievekst.
5. Luft i slangene ble fjernet før de ble lukket ved å lage en knute i den andre enden og påsatt en dialyseklype med løsningens navn.
6. Ferdig fylte slanger ble lagt i en plastbøtte fylt med destillert vann sammen med en magnet og tre glasstaver.
7. Bøtten ble så dekket med aluminiumsfolie og satt på en magnetrører på kjølerom.
8. Dialysevannet ble skiftet 2 ganger i løpet av 24 timer.
9. Saltmeter ble benyttet for å undersøke om det fortsatt foregikk diffusjon av ioner i dialysevannet. Når saltmeteret viste null var dialyseringen ferdig.

NB! Det er viktig at dialyseslangene ikke tørker ut! De må derfor alltid være i kontakt med vann.

4.1.13. Vasking av glassutstyr

Prinsipp

Glassutstyr oppbevares ofte utildekket eller i pappemballasje noe som fører til kontaminering av disse med cellulose og andre karbohydrater. Dette kan gi utslag ved ulike tester og glassutsyret må derfor vaskes med konsentrert saltsyre, et middel med evne til degradering av karbohydrater.

Kjemikalier

Konsentrert HCl

Springvann og destillert vann

Utstyr

pH-papir

Varmeskap

SMI-rør, supelcorør, glasspipette

Hansker og briller

Framgangsmåte

1. Glassutstyret ble lagt i et stort begerglass.
2. Utstyret ble dekket med saltsyre i 30 min.
3. Syren ble tilbakført til originalbeholderen for fremtidige vask.
4. Glassutstyret ble vasket med springvann til pH ble målt til å være ca 6 og ble da vasket en siste gang med destillert vann.
5. Utstyret ble satt til tørking i varmeskap.

4.1.14. Frysetørking

Prinsipp (Aulton, 2007)

Metoden benyttes ved tørking av varmesensitive materialer. Prøver som skal tørkes må være i frosset tilstand, og ved lavt trykk vil vannet fjernes ved sublimasjon. Vannet i frosset materiale vil gå direkte fra fast fase til dampfase uten å måtte gå gjennom væskefasen først.

Utstyr

Frysetørker: CHRIST ALPHA 1-4, CHRIST ALPHA 1-4 LD plus

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød, Danmark)

Framgangsmåte

1. Løsningene ble fryst ned enten ved å legge dem i fryseren eller ved hjelp av avkjølt metanolbad. Ved bruk av metanolbadet ble kolbene koblet til en motor som roterte dem i metanolbadet som holdt ca. 40 °C. Rotasjonen økte løsningenes overflate og dermed rask avkjøling.
2. Frosne prøver ble enten koblet til frysetørker via pæreformede rundkolber på utsiden eller plassert på innsiden i supelcorør.
3. Prøvene ble tatt av frysetørkeren når all isen var fordampet.

4.1.15. Absorbansmåling

Alle absorbansmålinger ble utført på følgende instrumenter:

Farmasøytisk institutt: BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader

Wallac Victor³™ 1420 Multilabel counter, PerkinElmer™ precisely

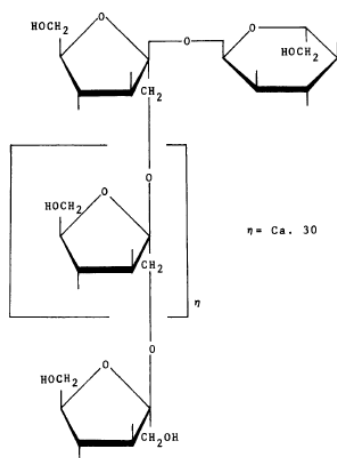
Rikshospitalet: Titertek multiskan

4.2. Isolering av polysakkarider

4.2.1. Enzymatisk degradering med *exo*- og *endo*inulinase

Prinsipp (Ricca et al., 2007)

For å fjerne inulin i prøvene ble det benyttet enzymene *endo*- og *exo*inulinase fra *Aspergillus niger*. Inulinaser er β -fructosidaser som består av to ulike typer som virker på to forskjellige måter på inulin molekylet. *Exo*-inulinase begynner ytterst på molekylet hvor den separerer glukose-enheten fra fruktose-enhetene og arbeider seg så innover på inulinet. *Endo*-inulinase hydrolyserer indre bindinger mellom fruktose-enhetene og danner mindre oligosakkarider.



Figur 4.2 Inulin, α -D-Glc (1 \rightarrow 2)(β -D-fruktofuranose)_n (2 \rightarrow 1) β -D-fruktoseenheter.

Kjemikalier

Na-acetat buffer 10 mM (pH 4,5):

Na-acetat (Merck)

Destillert vann

37 % HCl (Merck)

Exo-inulinase (EC 3.2.1.80) fra *Aspergillus niger* (Megazyme). Innholder 200U/ml.

Endo-inulinase (EC 3.2.1.7) fra *Aspergillus niger* (Megazyme). Inneholder 2000U/ml.

Utstyr

pH-meter (metode 4.1.10.)

Varmeskap

Frysetørker

Filter: PALL[®] Acrodisc[®], sterile, 0,45 μ m

ANX Sepharose 4 Fast Flow (High Sub) (metode 4.2.2.1.)

Framgangsmåte

1. 0,5 g prøve ble løst opp i 75 ml Na-acetat buffer.
2. Løsningen ble tilsatt 150 µl *endo*- og 150 µl *exoinulinase*.
3. Prøven ble satt i varmeskap (40 °C) under omrøring over natt.
4. Løsningen fikk et oppkok på ca 20 sekunder for å denaturere enzymene, og deretter satt til avkjøling.
5. Prøveløsningen ble filtrert 0,45 µm og applisert på ANX Sepharose kolonne (metode 4.2.2.1.)
6. Monosakkaridinnholdet ble analysert ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC.

4.2.2. Ionebytterkromatografi

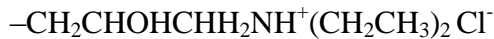
Prinsipp (Greibrokk et al., 1994)

Mange polysakkarider, deriblant pektiner, inneholder monosakkarider med sure grupper. Disse gruppene kan benyttes for å isolere pektiner fra andre komponenter i prøven. Dette kan gjøres ved å bruke ionebytterkolonner.

Ionebytteren består av en uløselig matriks av et polymert materiale eller av silika, med en kovalent bundet ioniserbar eller ionisk gruppe. Til den ioniske funksjonen sitter det et motion (elektrostatisk bundet) med motsatt ladning. Motionet kan byttes ut med andre ioner med større affinitet eller konsentrasjon.

4.2.2.1. ANX Sepharose 4 Fast Flow (High Sub)

ANX Sepharose er en svak anionbytter basert på kryssbundet agarose, noe som gir høy kjemisk og fysisk stabilitet. Den anionbyttende egenskapen skyldes dietylaminopropylgruppen som er bundet til matrixen via en eterbinding. Gruppen har Cl^- som motion (GE Healthcare, 2011).



Figur 4.3 Dietylaminopropyl og motionet klorid

Ved å eluere med vann vil salter og nøytrale sukkere forlate kolonnen uten retardasjon. Eluerer man så med økende ionestyrke av NaCl vil de negative polysakkeridene byttes ut mot Cl^- ionene, og det er dermed mulig å separere polysakkaridene etter deres affinitet på kolonnen.



Utstyr

Kolonne: Pharmacia Biotech

Kolonnevolum: ~200 ml

Matriks: ANX Sepharose

Pumpe: Pump P-1 (Pharmacia Biotech)

Fraksjonssamler: Pharmacia, SuperFrac, Amersham Biosciences

Klargjøring av kolonne

Kjemikalier

Destillert, avgasset vann

Framgangsmåte

1. Ferdigpakket kolonne ligger lagret i 20 % etanol. Dette må vaskes ut før kolonnen kan tas i bruk.
2. Kolonnen ble vasket med 300-400 ml destillert vann med en hastighet på 2 ml/min.

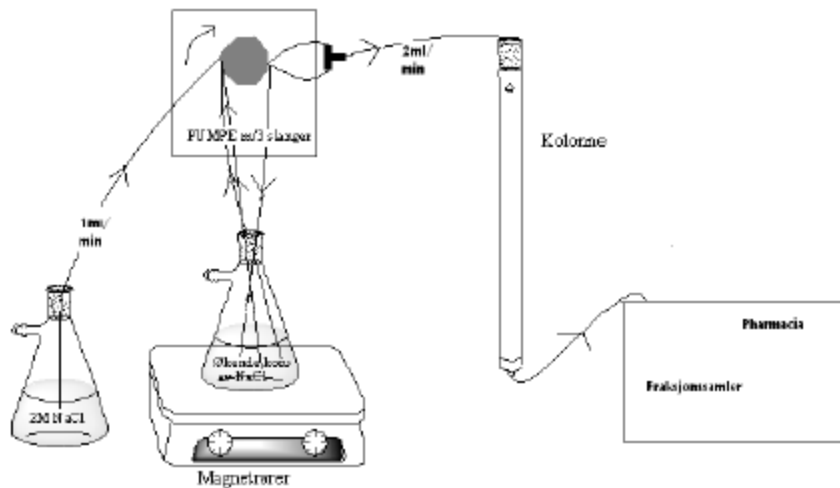
4.2.2.2. Applisering og eluering

Kjemikalier

2 M NaCl(aq)

Destillert, avgasset vann

AgNO₃(aq)



Figur 4.4 Oppsett av eluering av polysakkarider med NaCl-gradient

Framgangsmåte

1. Prøven ble applisert på kolonnen (70-100 ml) med en hastighet på 1 ml/min.
2. Den nøytrale fraksjonen ble eluert ut med destillert vann, ca 1,5 kolonnevolum, med elueringshastighet på 1 ml/min.
3. Gjenværende sukker ble eluert med en gradienteluering av NaCl med konsentrasjon fra 0-1,5 M. Pumpehastigheten var på 2 ml/min.
4. Tilsammen ble det samlet 120 rør à 5 ml per rør ved bruk av fraksjonssamler. Det ble beregnet at ved rør 80 skulle det være en NaCl konsentrasjon på 1 M.
5. Fraksjonene ble testet for karbohydratinhold med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.1.). Basert på elueringsprofilen som framkom ble flere rør slått sammen og dialysert (metode 4.1.12). Store volum ble redusert før dialyse (metode 4.1.7)
6. Prøvene ble frysetørket (metode 4.1.14.)

4.2.2.3. Regenerering av kolonne

Etter bruk av kolonnen og før den ble lagt bort for lagring ble den regenerert og lagret i etanol.

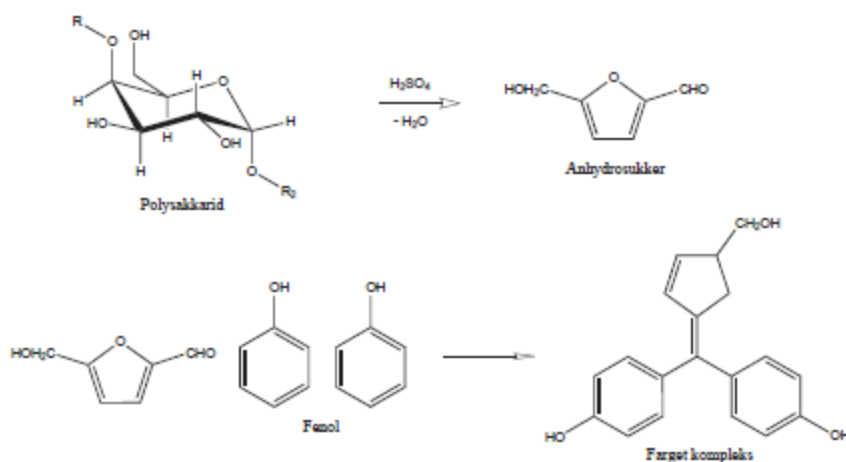
1. Kolonnen ble eluert med 300 ml 2M NaCl.
2. Kolonnen ble vasket med destillert vann til det ikke lenger ble blakket ved tilsetning av AgNO_3
3. Kolonnen ble konservert med 300 ml 20 % etanol, degasset.

4.3. Kvantitativ og kvalitativ monosakkaridbestemmelse

4.3.1. Fenol-svovelsyretesten

Prinsipp (Dubois og Clamp, 1956 og Cui, 2005)

Dette er en kolorimetrisk metode som benyttes for å fastslå tilstedeværelse av aldoser og ketoser i en prøve. Ved tilsetning av sterke syrer og fenol til karbohydratløsninger ved nærvær av varme vil det forekomme en rekke reaksjoner. Det vil dannes furanderivater som igjen kondenserer med hverandre eller med fenoliske forbindelser og produserer fargede komplekser. Kompleksene kan absorbere UV-lys, hvor absorbansen er proporsjonal med sukkerkonsentrasjonen. Maksimal absorbans for aldoser og ketoser er henholdsvis 490 nm og 480 nm.



Figur 4.5 Reaksjonslikningen som oppstår når et monosakkarid reagerer med svovelsyre ved tilstedeværelse av fenol, og dannelsen av furanderivater (anhydrosukker).

Kjemikalier

4 % Fenol-løsning

Konsentrert svovelsyre, H₂SO₄

Utstyr

Glassrør

Pipette og pipettespisser: Microman®, Gilson

WhirliMixer, Fisions, Scientific Equipment

Mikrotiterplate 96 brønner

BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader

Husk! Brilller og hansker

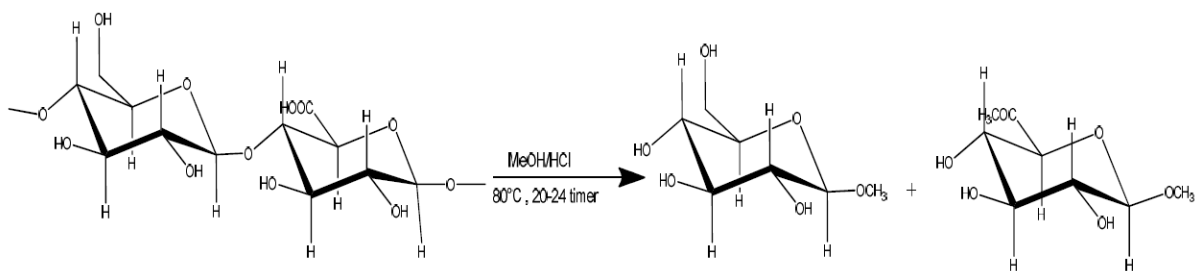
Framgangsmåte

4. 200µl 4 % fenol-løsning ble tilsatt glassrøret med 100 µl prøveløsning.
5. 1 ml konsentrert svovelsyre ble tilsatt, dette er en ekosterm reaksjon (varmedannelse).
6. Løsningen ble mikset kraftig. Prøvene bør mikses like mye, kan gi utslag på fargedannelsen.
7. Rørene ble satt til henstand i 30 min i romtemperatur, slik at fargen forsterkes.
8. 100 µl ble overført til en mikrotiterplate.
9. Absorbansen ble målt ved 490 nm.

4.3.1. Metanolyse

Prinsipp (Chamber et al., 1971 og Cui, 2005)

For å bestemme monosakkaridinnholdet i en prøve må innholdet av polysakkarider brytes ned til mindre enheter. Enzymatiske metoder kan benyttes, men disse vil være spesifikke i deres oppkutting. I motsetning til enzymer kan tilstedeværelse av sterk syre føre til at glykosidbindinger mellom monomere i polymeren brytes. Reaksjonen foregår på følgende måte; hvert glykosidbindingsbrudd forbruker ett metanolemolekyl og etterlater metylglykosider.



Figur 4.6 Metanolyse av polysakkarider i 4M HCl i metanol bryter glykosidbindingene mellom sukkerenhetene og danner metylglykosider og metylestere av uronsyrer.

Kjemikalier

4M HCl i metanol

1,0 mg/ml mannitol i 1M HCl i metanol, intern standard

Vannfri metanol

Utstyr

P_2O_5 -evakuert vakuumsikator

Supelcorør

SMI-rør og transferpetter (Brand) (50-100 μl)

Varmeskap

Kanyle

Glasspipette og pelesballong

Alt utstyr av glass ble syrevasket

Husk! Vernebriller og hansker

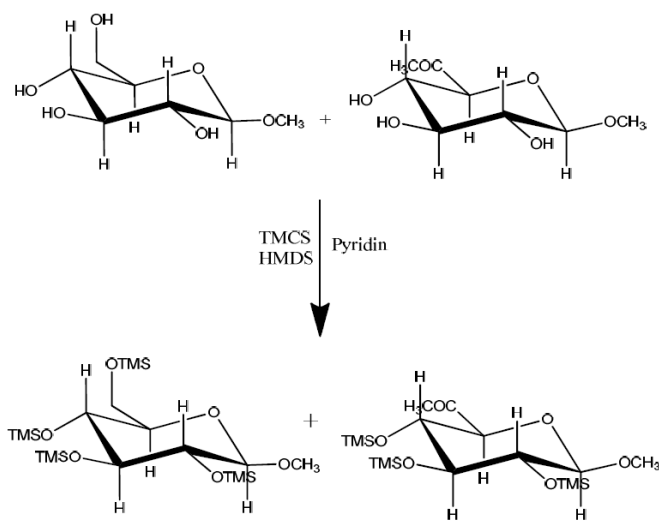
Framgangsmåte

1. Det ble veid inn 1 mg prøve i supelcorør.
2. Rørene ble dekket med parafilm, og stukket hull på med en kanyle.
3. Prøvene ble tørket i 24-48 timer i eksikator ved romtemperatur.
4. Det ble tilsatt 1 ml 4M HCl i metanol til hver prøve med glasspipette.
5. 100 µl intern standard ble tilsatt med SMI-rør.
6. Korkene ble skrudd på og rørene ble satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer.
7. Etter 15 min ble korkene skrudd til. Ved varmeeksponering vil korkene mykne opp og må derfor lukkes ekstra godt for at løsningen ikke skal fordampe.
8. Prøvene ble tørket med N₂-gass (metode 4.1.6.)
9. Syren ble nøytralisert med 200 µl vannfri metanol, og dampet av med N₂-gass.
10. Trinn 9 ble gjentatt 2 ganger.
11. Til slutt ble prøvene satt til tørking i eksikator i minimum 1 time før derivatiseringstrinnet.

4.3.3. TMS-derivatisering

Prinsipp (Cui, 2005)

For separasjon av forbindelser med GC instrument må prøven være flyktig. Dette skyldes at mobilfasen er en gass. Monosakkarider har mange polare funksjonelle grupper, noe som gjør dem lite flyktige. Det er derfor et krav om å derivatisere prøven og lage flyktige termisk stabile derivater av stoffene. Metoden er ekstremt følsom for vann. Hvis vann skulle være tilstede i reaksjonen vil derivatiseringen enten bli ufullstendig eller ikke forekomme i det hele tatt.



Figur 4.7 Derivatisering av både metylestere og frie hydroksylgrupper med TMS-reagens for å øke flyktigheten.

Kjemikalier

TMS-reagens: blanding av pyridin, trimetylklorasilan og heksametyldisilasan (5:1:2)

Utstyr

SMI-rør og transferpetter (Brand) (100 μ l)

Alt glassutstyr ble syrevasket

Whirlimixer

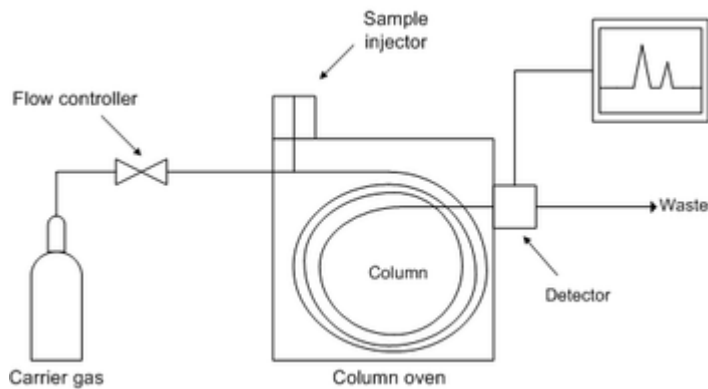
Framgangsmåte

1. 200 μ l TMS-reagens ble tilsatt prøvene.
2. Prøvene ble ristet forsiktig i 30 sek.
3. De ble satt til hendstad i 30 min i romtemperatur.

4.3.4. Gasskromatografi

Prinsipp (Greibrokk et al., 1994)

GC instrumentet består av injektor, kolonne og dektektor. Når prøven introduseres i injektoren blir prøven omgjort til gass, og brakt til kolonnen med mobilfasen som i dette tilfellet er en gass, bæregass. Stoffene i prøven separeres i kolonnen etter deres retardasjon på kolonnemateriale, flyktighet og temperatur. I detektoren produseres signaler for de ulike substansene og skrives ut som et kromatogram.



Figur 4.8 Skisse av GC-instrument

Utstyr og betingelser

GC # 1

Gasskromatograf: Carlo Erba 6000 Vega Series 2

Programmeringsenhet: ICU 600

Integrator: Chrom-card

Detektor: Flammeionisasjonsdetektor

Flammegassblanding: H₂ og luft

Injektor: Splitt:splittless

Kolonne: DB-5(J&W Scientific.) ” Fused silica” kapillærkolonne. Lengde: 30 m. Indre Ø:
0,32 mm, Filmtykkelse: 0,25mm

Bæregass: Helium

Flow: 1,8 ml/min (37,6 cm/sek)

Splitt flow: ~11ml/min

Spilttforhold: 1:6

Injiseringvolum: 1,0 µl

Injektortempertaur: 260 °C

Detektortemperatur: 310 °C

1°C/min

6°C/min

30°C/min

Temperaturprogram: 140 °C →→ 170 °C →→ 250 °C →→ 300 °C

Etter hver injisering ble nålen vasket 3 ganger med pyridin

GC # 2

Gasskromatograf: THERMO SCIENTIFIC FOCUS GC

Injektor: Splitt: splittless

Detektor: Flammeionisasjonsdetektor

Bæregass: Helium

Kolonne: Restek-Rxi 5MS. Lengde: 30 m. Indre Ø: 0,32 mm, Filmtykkelse: 0,25mm

Injektor temperatur: 250 °C

Detektor temperatur: 300 °C

Splitt forhold: 1:10

Injiseringvolum: 1 µl

Flow: Konstant trykk (0,70 bar)

1°C/min

6°C/min

30°C/min

Temperaturprogram: 140 °C →→ 170 °C →→ 250 °C →→ 300 °C

Etter hver injisering ble nålen vasket 3 ganger med pyridin.

4.3.5. Kvantitativ bestemmelse av fruktose, PABR-testen

Prinsipp (Boratyński, 1984)

Fenol-Aceton-Borsyre Reagenset (PABR) ble benyttet for kvantitativ bestemmelse av fruktose-innholdet i prøvene. Testen er en kolorimetrisk metode for ketose, fruktose. Fruktose kan ikke analyseres på samme måte som andre monosakkarider ved hjelp av metanolyse, TMS-derivatisering og GC.

Kjemikalier

PABR-reagenset (holdbar i 2 uker ved 4 °C):

10 ml 4 % fenol-løsning

200 µl aceton

0,4 g borsyre

D-(-)-Fruktose, sigma (standard)

Destillert vann

Konsentrert svovelsyre (Merck)

Utstyr

Glassrør

Varmeskap

Absorbansmåler: BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader

Mikrotiterplate 96 brønner

Pipette og pipettespisser: Microman®, Gilson

WhirliMixer, Fisions, Scientific Equipment

Husk! Brilller og hansker

Framgangsmåte

1. Prøvene ble løst i destillert vann til en konsentrasjon på 1 mg/ml.
2. Fruktose ble løst i destillert vann. Det ble laget standardløsninger med følgende konsentrasjoner: 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml og 0,05 mg/ml.
3. 100 µl av prøver, standardløsninger og kontroll, destillert vann, ble tilsatt 500µl PABR-reagens.

4. Rørene ble tilsatt 1,4 ml konsentrert svovelsyre.
5. Løsningene ble mikset og satt til henstand i 5 min ved romtemperatur.
6. Rørene ble satt inn i varmeskap på 37 °C i 1 time.
7. 100 µl prøve ble overført til mikrotiterplate.
8. Absorbansen ble målt ved 568 nm.

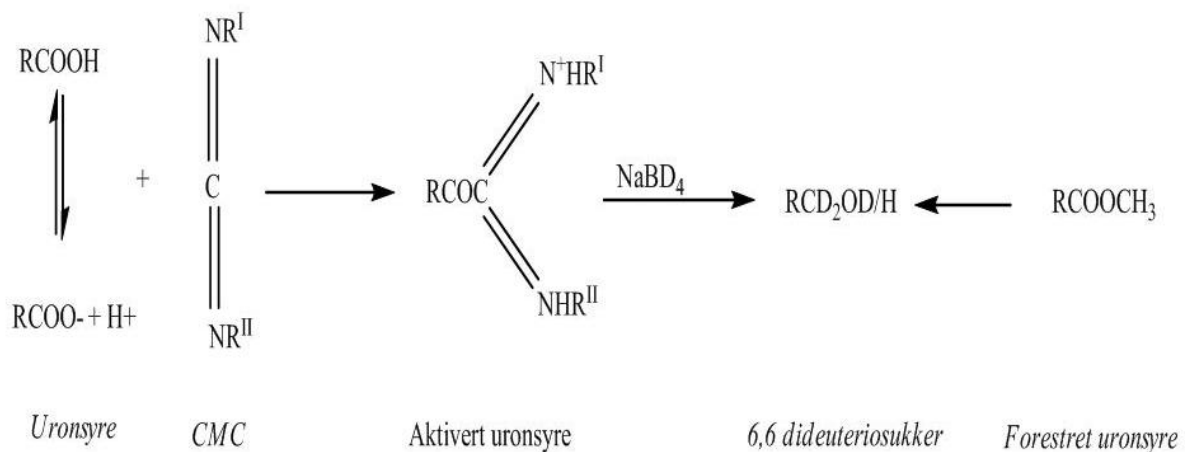
4.4. Strukturell analyse

4.4.1. Bestemmelse av bindingsmønstre

4.4.1.1. Karboksylsyre-reduksjon

Prinsipp (Kim og Carpita, 1992 og Cui, 2005)

Dette er en todelt metode hvor den ene er til for å bestemme forholdet mellom esterifiserte uronsyrer og frie uronsyrer, og den andre for å skille mellom uronsyrer og deres respektive nøytrale sukkere. Den første delen av metoden er en selektiv reduksjon av esterifiserte uronsyrer til 6,6 dideuterio sukkere ved bruk av NaBD₄ uten berøring av de frie uronsyrene. For å iverksette reduksjon av frie uronsyrer må de først aktiveres med carbodiimid (CMC).



Figur 4.9 Aktivering og reduksjon av frie karboksylsyre grupper, og reduksjon av forestrede uronsyrer.

Kjemikalier

500 mM imidazole i HCl

Nylaget 100 mg/ml og 70 mg/ml NaBD₄ (Aldrich) i 500 µM imidazole-HCl

Iseddik

0, 2 M MES (2-[N-Morpholino] ethane sulphic acid)

Nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann

2M TRIZMA Tris [hydroxymethyl] aminomethane

Oktanol (antiskummiddel)

0,05 M NaOH

Destillert vann

Utstyr

Metyleringsrør med skrukork

Dialyseslanger, MWCO: 3,500

WhirliMixer, Fisons, Scientific Equipment

Frysetørker

Varmeskap

SMI-rør og pipetter

Is

pH-papir

Alt glassutstyr ble syrevasket

Framgangsmåte

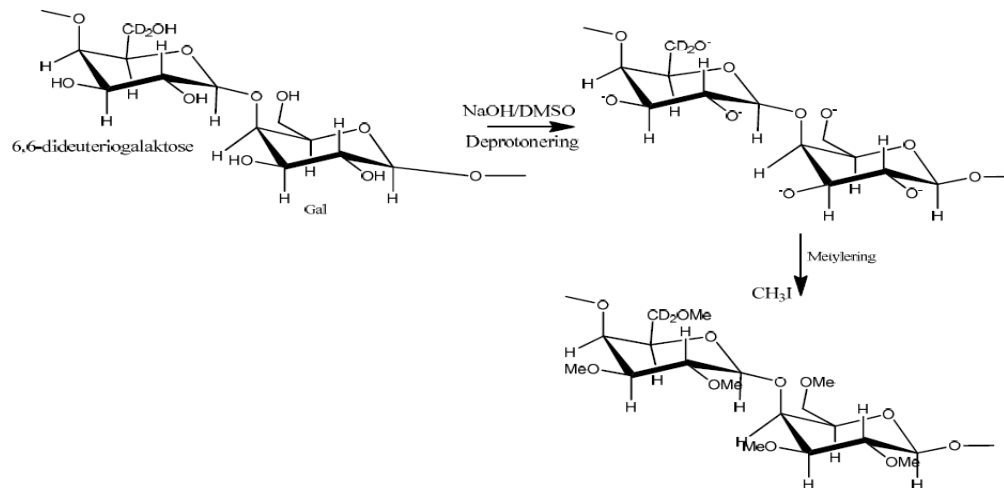
1. 2 mg prøve ble veid inn mellomlange metyleringsrør.
2. Prøven ble løst i 5 ml 500 mM imidazole-HCl (iskald).
3. Det ble tilsatt 300 µl 100 mg/ml NaBD₄ i 500 µM imidazole-HCl, mikset godt og satt på is i 5 min.
4. Trinn tre ble gjentatt.
5. 400 µl 100 mg/ml NaBD₄ i 500 µM imidazole-HCl ble tilsatt, mikset godt og satt på is i 30 min.

6. Overskuddet av NaBD_4 ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (5 x 100 μl), bobling og skumdannelse avsluttes ved nøytralisering.
7. pH ble kontrollert med pH-papir, skal ha en verdi under 7.
8. Prøven ble dialysert over natten (metode 4.1.12.).
9. Løsningen ble frysetørket i mellom lange metyleringsrør (metode 4.1.14.).
10. Frysetørket prøve ble tilsatt 1 ml destillert vann, ristet til alt var løst opp.
11. 200 μl 0,2 M MES ble tilsatt prøven.
12. 400 μl 500 mg/ml carbodiimide ble tilsatt prøven.
13. Prøven ble mikset godt og satt i varmeskap ved 25-30 °C i 3 timer.
14. Løsningen ble tilsatt 1 ml 2M TRIZMA og 4 dråper oktanol og avkjølt på is.
15. 1 ml 70 mg/ml NaBD_4 i 0,05 M NaOH ble tilsatt prøven og inkubert i kjøleskap (4 °C) over natten.
16. Overskuddet av NaBD_4 ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (5 x 100 μl).
17. Prøven ble dialysert i 24 timer (metode 4.1.12.).
18. Løsningen ble frysetørket i lange metyleringsrør (metode 4.1.14.).
19. 0,5 mg prøve ble tatt ut for å bestemme prosentandelen av syregruppereduksjon ved hjelp av metanolyse, TMS-derivatisering og GC. Resten av prøven ble metylert.

4.4.1.2. Metylering

Prinsipp (Cui, 2005)

Ved metylering omdannes alle frie hydroksylgrupper til metoksylder. Denne reaksjonen krever et basisk miljø og en metyldonor. Denne metoden benytter NaOH i DMSO og metyliodid.



Figur 4.10 Metylering av frie hydroksylgrupper i polysakkaridet.

Kjemikalier

DMSO (Dimetylsulfoksid)

NaOH pellets

Metyljodid (CH₃I)

Nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat (Merck) i destillert vann

Kloroform

Destillert vann

Utstyr

Metyleringsrør

Agatmorter og pistill

SMI-rør og pipetter

Rystemaskin

WhirliMixer, Fisions, Scientific Equipment

N₂-gass oppsett

Sentrifuge

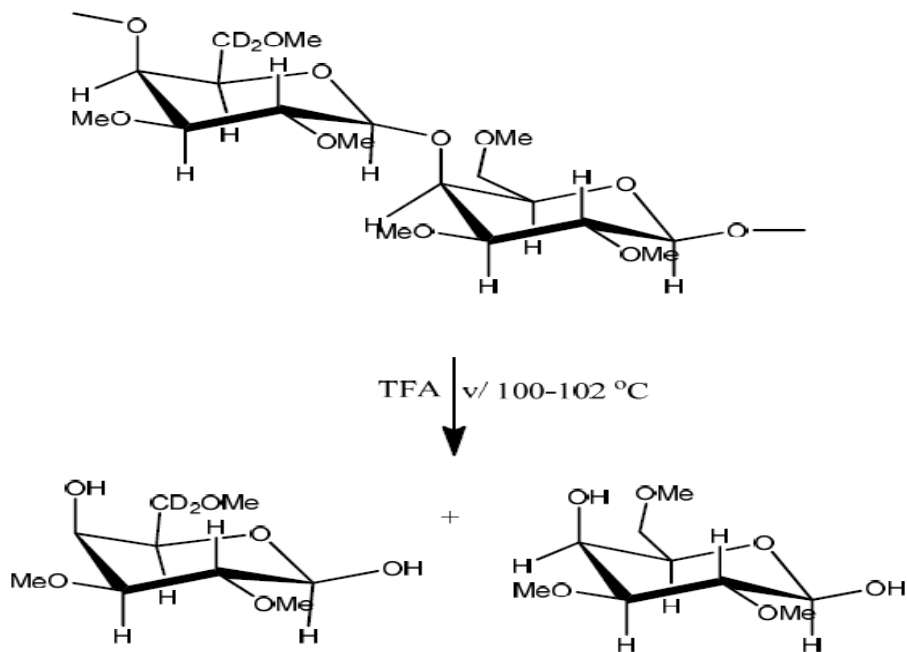
Framgangsmåte

1. Frysetørket prøve fra karboksylsyre-reduksjonen ble løst i 500 μ l DMSO.
2. Løsningen ble rystet i 20 min ved 200 rpm på rystemaskin.
3. NaOH pellets ble knust og rørt ut i DMSO ved bruk av morter og pistill. 2 pellets per ml DMSO (210 mg/ml NaOH i DMSO).
4. 500 μ l NaOH/DMSO ble tilsatt prøven med SMI-rør uten at røret ble tilgriset.
5. Løsningen ble flushet i ~ 2 min med N_2 -gass og rystet i 30 min ved 200 rpm.
6. 100 μ l CH_3I ble tilsatt prøven i avtrekk (CH_3I er kreftfremkallende) og rystet i 10 min ved 200 rpm.
7. Trinn 6 ble gjentatt.
8. 200 μ l CH_3I ble tilsatt og rystet i 20 min ved 200 rpm.
9. 10 ml natriumtiosulfat-løsning og 2 ml kloroform ble tilsatt.
10. Løsningen ble rystet godt, > 40 sek/prøve, og sentrifugert for å separere fasene.
11. Den øverste fasen, vannfasen, ble fjernet. Den nederste fasen, kloroformfasen ble vasket fire ganger med 5 ml destillert vann.
12. Kloroformfasen ble samlet i korte metyleringsrør og tørket under N_2 -gass.
13. Prøven ble videre hydrolysert.

4.4.1.3. Hydrolyse

Prinsipp (Cui, 2005)

Trifloreddiksyre (TFA) benyttes for å hydrolysere, spalte, polysakkaridene til monosakkarider.



Figur 4.11 Hydrolyse av glykosidbindingene i polysakkaridet ved tilstedeværelse av TFA.

Kjemikalier

2,5 M TFA

Utstyr

Varmeskap

N₂-gass oppsett

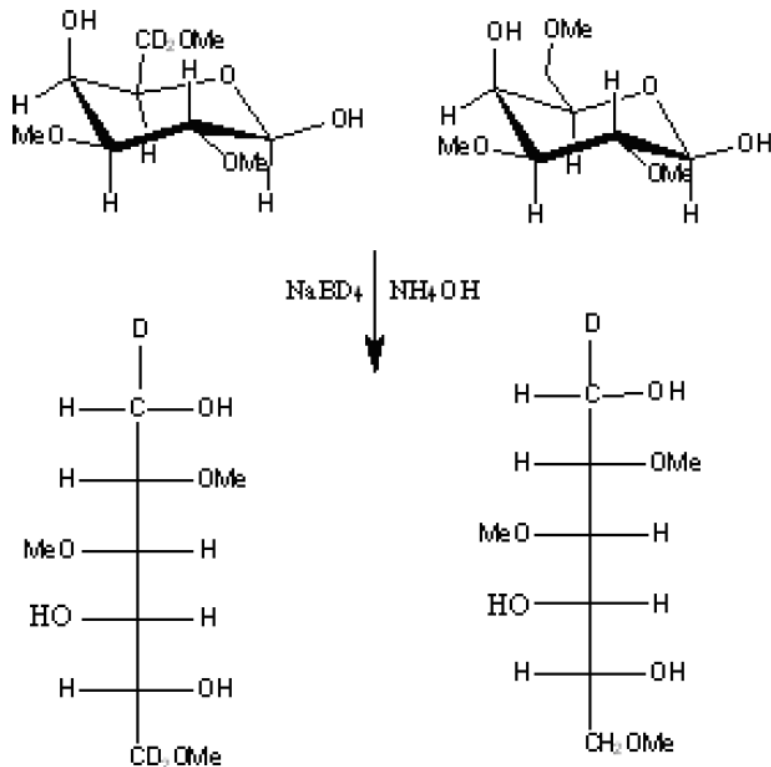
Framgangsmåte

1. Prøven ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA og flushet med N₂-gass.
2. Løsningen ble satt i varmeskap i 2 timer ved 100-102 °C.
3. Prøven ble avkjølt og tørket med N₂-gass.
4. Tørket prøve ble så redusert.

4.4.1.4. Reduksjon

Prinsipp (Cui, 2005)

Monosakkaridene fra hydrolysetrinnet reduseres til delvis metylerte alditoler ved bruk av NaBD_4 i basisk miljø. NaBD_4 setter inn et deuteriumatom i C1 posisjonen og det blir mulig å skille mellom C1 og C6 karbonatomer.



Figur 4.12 Reduksjon av delvis metylerte alditoler før GC/MS

Kjemikalier

2 M NH_3

Nylaget 1M NaBD_4 (Aldrich) i 2 M NH_3

Iseddik

5 % eddiksyre i metanol

Vannfri metanol

Utstyr

Metyleringsrør

Varmeskap

N_2 -gass oppsett

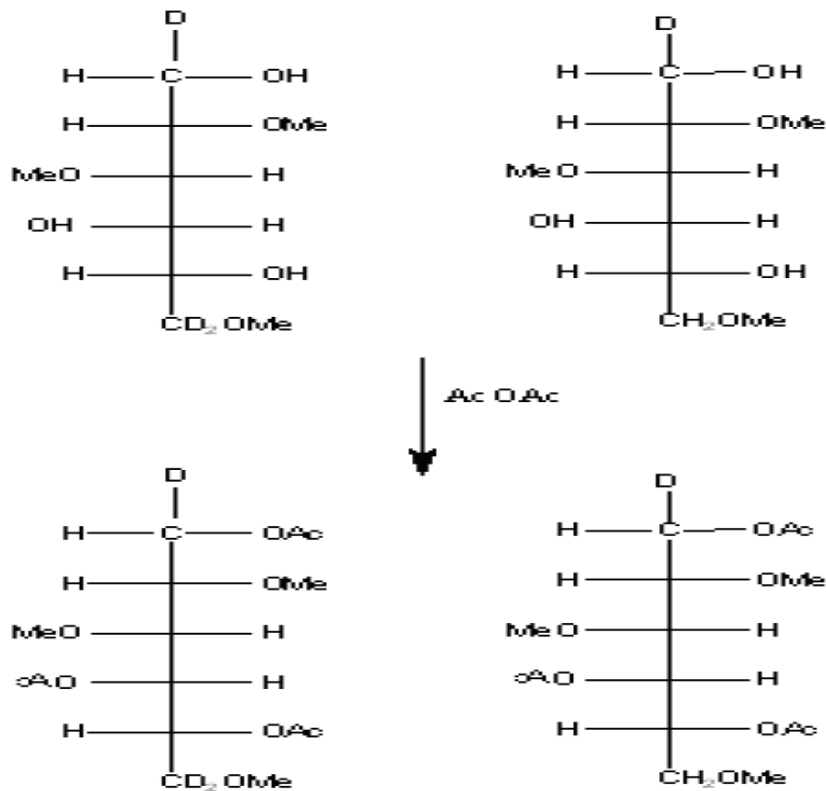
Framgangsmåte

1. Prøven ble løst i 500 μl 2 M NH_3 .
2. 500 μl 1 M NaBD_4 i 2 M NH_3 ble tilsatt og satt på ultralydbad i 1 min.
3. Løsningen ble satt i varmeskap i 1 time ved 60 °C.
4. Overskuddet av NaBD_4 ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (3 x 50 μl).
5. Prøven ble tørket med N_2 -gass.
6. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket under N_2 -gass. Ved tilsetning av eddiksyre omdannes overskuddet av bordeuterid til borsyre som fordampes sammen med metanol som metylester. Hvis dette ikke gjøres dannes det uheldige boratkomplekser.
7. Trinn 6 ble gjentatt.
8. 2,5 ml vannfri metanol ble tilsatt og tørket under N_2 -gass.
9. Punkt 8 ble gjentatt.
10. Prøven ble videre acetyllert.

4.4.1.5. Acetylering

Prinsipp (Cui, 2005)

De delvis metylerte alditolene acetyleres med eddiksyre anhydrid til delvis metylerte alditol acetater som analyseres med GC-MS.



Figur 4.13 Her omdannes de delvis metylerte alditolene til delvis metylerte alditol acetater

Kjemikalier

1-metylimidazole

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Destillert vann

Vannfri metanol

Utstyr

Metyleringsrør

WhirliMixer, Fisions, Scientific Equipment

Sentrifuge

Supelcorør

Framgangsmåte

1. 200 µl 1-metylimidazole ble tilsatt prøven etterfulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Løsningen ble rystet godt og hensatt i romtemperatur i 10 min.
3. Overskuddet av eddiksyreanhydridet ble ødelagt med 10 ml destillert vann, løsningen bør bli varm. Her byttes det over til lange metyleringsrør.
4. Løsningen ble mikset godt og satt til henstand i 10 min.
5. De behandlede monosakkaridene ble ekstrahert med 1 ml diklormetan, mikset i 30 sek og sentrifugert.
6. Den nederste fasen ble samlet i korte metyleringsrør.
7. Trinn 5 ble gjentatt.
8. Diklormetanfasene ble samlet sammen og tilbakevasket med 2 x 5 ml destillert vann.
9. Diklormetanfasen ble samlet i supelcorør. Det er viktig at diklormetanfasen samles uten noe vann.
10. Prøven ble tørket med N₂-gass og deretter løst i 50 µl vannfri metanol før GC-MS analysering.

4.4.1.6. GC-MS

Prinsipp (Cui, 2005)

GC-MS analysene ble utført av Finn Tønnesen ved avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt.

GC-MS er den beste metoden for analysering av delvis metylerte alditol acetater, hvor hver av disse vil gi opphav til én topp på kromatogrammet.

Utstyr og betingelser

GC-MS: GC 800 Series

Detektor: Fisons Instruments, MD 800

Injektor: Splitt (1:10)

GC-kolonne: FactorFOUR™, VF- 1ms

Filmtykkelse: 0,25 µm

Indrediameter: 0,25 µm

Lengde: 30 m

Injektortemperatur: 250 °C

Temperaturområde: 80-280 °C

Dataprogram: Masslab 73

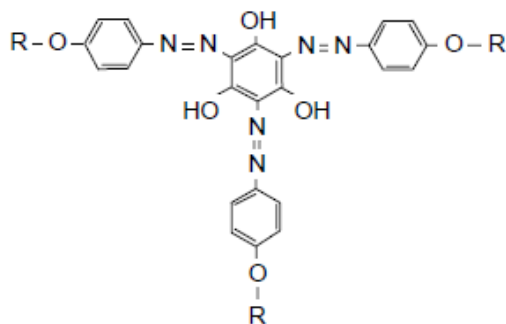
1°C/min 6°C/min 30°C/min

Temperaturprogram: 140 °C →→ 170 °C →→ 250 °C →→ 300 °C

4.4.2. Bestemmelse av arabinogalaktan type II

Prinsipp (Van Holst og Clarke, 1984 og Seifert og Roberts, 2007)

Karbohydratdelen på arabinogalaktanproteinene består hovedsakelig av arabinogalaktan type II (AG II). AG II består hovedsakelig av galaktose og arabinose, hvor 1→3 bundet galaktose danner hovedkjede med forgreninger av galaktose ved C3 posisjonen med terminale arabinose-enheter. Arabinogalaktan type II bindes spesifikt til Yariv reagens, et rødfarget fargereagens, og en rødfarget utfelling forekommer.



Figur 4.14 Yariv reagens, R= β -D-glucosyl, α -D-galactosyl eller α -D-mannosyl

Kjemikalier

1 mg/ml og 2 mg/ml Yariv-løsning i destillert vann

1 mg/ml arabisk gummi i destillert vann

Løsning til en plate med 1 mm geltykkelse:

35 mg agarose for gelelektroforese

30 mg NaCl

0,7 mg NaN₃

3,5 ml destillert vann

Utstyr

Gelbondfilm fra agarose (5 cm x 7 cm)

Filterpapir

Glasskar med lokk

Veieskip av plastikk

Cellepapir

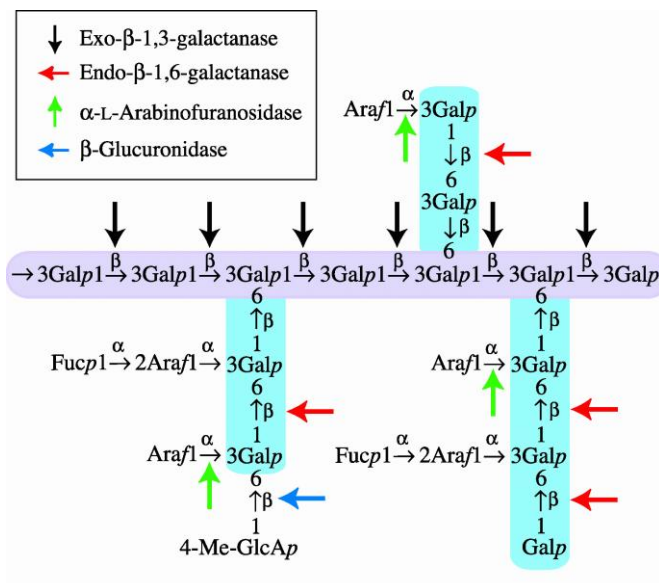
Framgangsmåte

1. Prøvene ble løst opp i destillert vann til en konsentrasjon på 2 mg/ml.
2. Gelbondfilm ble klippet opp 5 cm x 7 cm.
3. Agarose, NaCl og NaN_3 ble løst i 3,5 ml destillert vann under oppvarming til løsningen ble klar.
4. 100 μl Yariv reagens ble tilsatt rett før støping.
5. Gelen ble helt over platene, på den hydrofile siden (vanndråper på den hydrofobe siden lager runde og klare dråper). Det er viktig at platene støpes på en vannrett overflate.
6. Brønner ble stanset ut etter at gelen var avkjølt og stivnet.
7. Prøveløsningene og standard på 2, 4 og 6 μl ble overført til brønnene.
8. Platene ble lagt på små veieskip i et lite kar med fuktet papir i bunnen. Lokket ble lagt på for å hindre uttørking.
9. Platene ble inkubert i romtemperatur over natten.
10. Røde ringer ble dannet rundt brønnene ved tilstedeværelse av AG II.
11. Platene ble tatt ut av karet og lagt på benken og dekket med et fuktet filterpapir.
12. Platene ble deretter dekket med store mengder cellepapir, og en glassplate ble lagt på toppen.
13. En tung gjenstand (2,5 L full glassflaske) ble lagt over glassplaten for å trekke ut væsken av platene.

4.4.3. Enzymatisk degradering med α -L-arabinofuranosidase

Prinsipp (Saha og Bothast, 1999)

Prøvene med innhold av arabinogalaktaner ble behandlet med α -L-arabinofuranosidase fra *Bifidobacterium adolescentis* for å undersøke arabinosens betydning for pektinenes biologiske aktivitet. Enzymet er av *exo*-typen, hydrolyserer terminale ikke reduserende α -arabinofuranoser. α -L-arabinofuranosidase fra bifidobakterier hydrolyserer arabinoser som er hovedsakelig bundet til hovedkjede av xylose.



Figur 4.15 skjematiske struktur av arabinogalaktan og enzymer med aktivitet på AG sidekjeder.

Kjemikalier

Na-acetatbuffer 30 mM (pH 4,2):

Na-acetat x 3 H₂O

Destillert vann

37 % HCl (Merck)

α -L-Arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) fra *Bifidobacterium adolescentis* (Megazyme).

Innholder 200U/ml.

Toluen

Destillert vann

Utstyr

Metyleringsrør med skrukork

Varmeskap

PD-10 kolonne

Filter: PALL[®] Acrodisc[®], sterile, 0,45 µm

Framgangsmåte

1. 25 mg prøve ble veid inn i metyleringsrør.
2. Prøven ble løst i 5 ml 30 mM Na-acetatbuffer.
3. Det ble tilsatt 50 µl α -L-Arabinofuranosidase og 1 dråpe toulen.
4. Løsningen ble inkubert ved 40 °C .
5. Etter 30-36 timer ble det tilsatt litt mer enzym, 15 µl α -L-Arabinofuranosidase.
6. Etter 72 timer ble enzymene deaktivert ved å gi oppløsningen et oppkok.
7. Prøven ble filtrert 0,45 µm og overført til en PD-10 kolonne (metode 4.4.3.1.)
8. Det ble samlet totalt 20 rør á 1 ml (20 dråper) per rør.

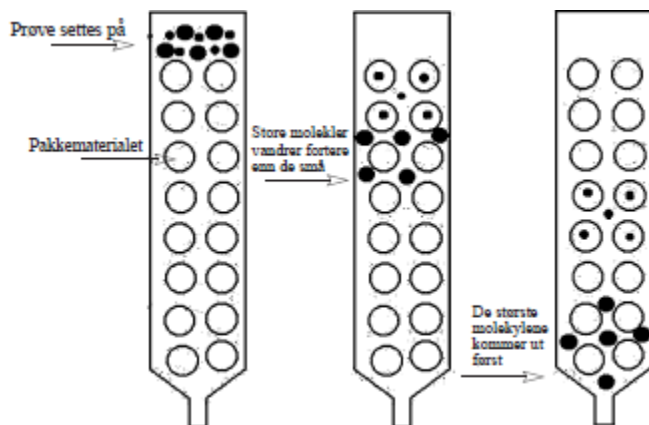
4.4.3.1. Gelfiltrering

Prinsipp (Cui, 2005 og Greibrokk et al., 1994)

Gelfiltrering er en kromatografisk metode som separerer substanser etter deres størrelse. En gelfiltreringskolonne består av en inert stasjonærfase med en kontrollert porestørrelse. I en polysakkaridløsning finnes det molekyler med ulike størrelser. Når denne overføres til en gelfiltreringskolonne vil de største molekylene ikke være i stand til å penetrere porene, men elueres ut sammen med uretarderte substanser. Mindre molekyler vil kunne penetrere porene og retarderes. Retardasjonen er proporsjonal med molekylstørrelsen. Jo mindre størrelse desto høyere retardasjon, og dermed separasjon.

PD-10 kolonne

Kolonnen består av ferdigpakket Sephadex G-25 Medium med porestørrelse som holder igjen partikler med størrelse under 5000 kDa. Kolonnen kan benyttes for å fjerne salter og mindre molekyler fra løsninger. Her ble metoden brukt for å fjerne monosakkarider fra en polysakkaridløsning etter enzymdegradering.



Figur 4.16 Prinsippet for gelfiltrering. Store molekyler blir ikke retardert, men elueres ut først. Små molekyler under 5000 kDa blir holdt igjen av kolonnen og elueres ut senere.

Kjemikalier

Destillert, degasset vann

Alle prøveløsninger ble filtrert 0,45 µm

Utstyr

Kolonne: PD-10 GE Healthcare

Kolonnevolum: 8,3 ml

Matriks: SephadexTM G-25 Medium

Framgangsmåte

1. Kolonnen ble plassert på et stativ slik at den sto loddrett, det er viktig at den er helt rett da gravitasjon er nødvendig.
2. PD-10 kolonnen ble varmet opp til romtemperatur.
3. Kolonnen ble vasket med 25 ml destillert, degasset vann.
4. 2,5 ml prøveløsning ble overført til kolonnen.
5. Det ble eluert med 20 ml destillert, degasset vann og fraksjoner à 1 ml ble samlet opp.
6. Kolonnen ble vasket med 25 ml destillert, degasset vann før tilsetning av ny prøve.
7. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.1.) og slått sammen på grunnlag av dette.
8. Fraksjonene ble frysetørket.

4.4.4. Kvantitativ bestemmelse av fenol-innhold

Prinsipp (Singleton et al., 1999)

Folin-Ciocalteu reagentet (FCR) ble benyttet for kvantitativ bestemmelse av det totale innholdet av fenoler, med ferulasyre som standard. FCR består av polymere ioner dannet av fosfotungstate- og fosfomolybdate heteropolyiske syrer. I sur løsning befinner de seg som hydratiserte oktahedrale komplekser med metalloksider koordinert rundt en sentral fosfat. Når komplekset mister én eller to elektroner ved oksidering av fenoler farges løsningen blå.

Kjemikalier

1 M Na₂CO₃ x 10 H₂O- løsnning (M_w: 285, 99g/mol)

Folin-Ciocalteu, Merck/Kebo lab (1:2 fortynning i destillert vann)

Ferulasyre (standard)

Destillert vann

Metanol

Utstyr

Glassrør

Whirlimixer

Absorbansmåler: BIO-RAD Modell 3550 Microplate Reader

Framgangsmåte

1. 1 mg/ml prøve i destillert vann ble laget.
2. Standardløsninger av ferulasyre ble laget på følgende måte (Tabell 4.1)

Stamløsning: 1,5 mg ferulasyre ble løst i 1,5 ml metanol, og fortynnet videre med 1,5 ml destillert vann. Dette gir en konsentrasjon av ferulasyre på 0,5 mg/ml.

Tabell 4.1 Fortynningsrekka for standardløsninger av ferulasyre

Standard nr.	Mengde (µg)	Konsentrasjon (µg/ml)	Stamløsning (µl): vann (µl)
1	2	5	4:396
2	4	10	8:392
3	8	20	16:384
4	12	30	24:376
5	16	40	32:368
6	20	50	40:360

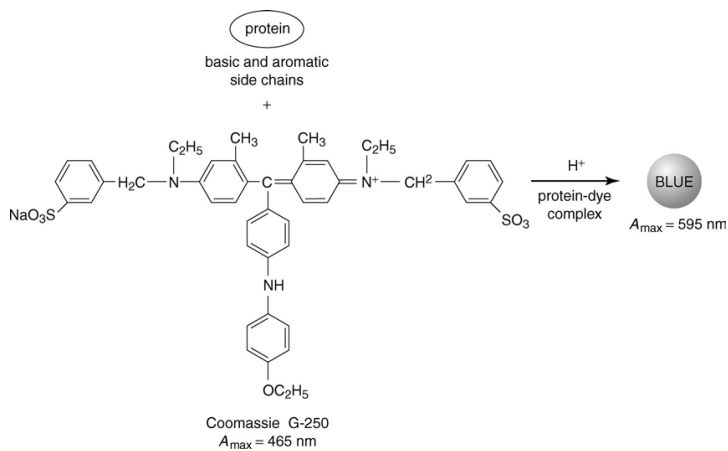
3. 0,4 ml prøveløsning ble tilsatt 0,4 ml Folin-Ciocalteu.
4. Prøven ble satt til henstand i 3 min i romtemperatur.

5. 0,4 ml 1 M Na₂CO₃-løsning ble tilsatt og satt til henstand i 1 time.
6. Absorbansen ble målt ved 750 nm.

4.4.5. Kvantitativ bestemmelse av protein-innhold, Bio-Rad Protein Assay

Prinsipp (Bio-Rad, 2011 og Bradford, 1967)

Dette er en kolorimetrisk metode for bestemmelse av proteininnhold. Reagenset består av Coomassie brilliant blue G-250 fortynnet i en syreløsning. Fargen endres fra brun til blå når proteinbinding forekommer.



Figur 4.17 Det aktive reagenset i Bio-Rad Protein Assay-løsningen, Coomassie G-250

Kjemikalier

Bio-Rad fargereagens (holdbar i 2 uker ved romtemperatur):

1 del fargereagens konsentrat

4 deler destillert vann

Albumin fra bovint serum , sigma (standard)

Destillert vann

Utstyr

Filterpapir: Whatman[®] filter paper 41 ashless

Mikrotiterplate

Absorbansmåler: Wallac Victor³_™ 1420 Multilabel counter, PerkinElmer[™] precisely

Framgangsmåte

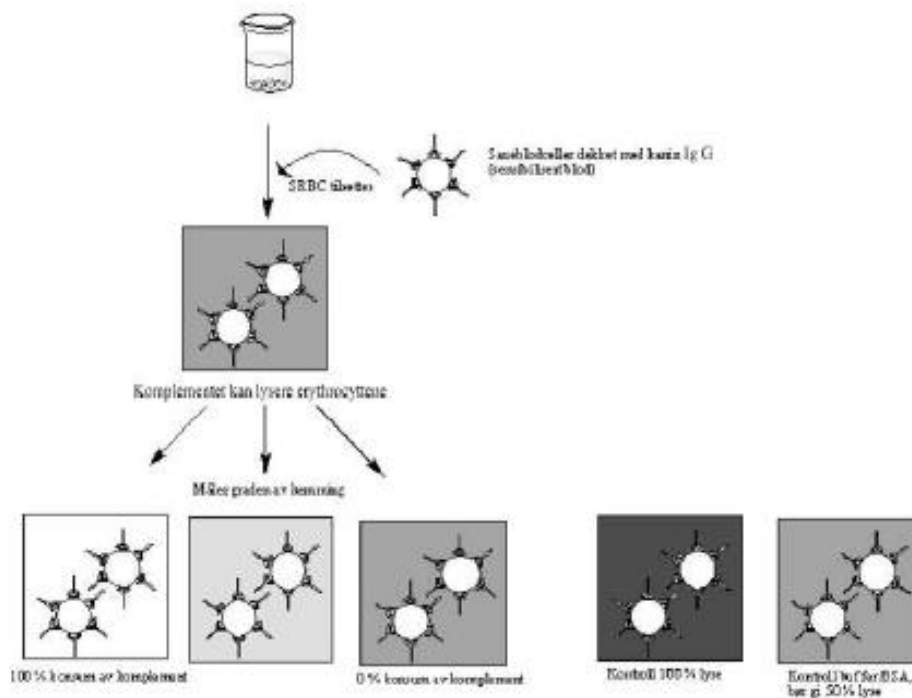
1. Fargereagens-løsningen ble filtrert for å fjerne partikler.
2. Det ble laget standardløsninger av albumin med 2-foldsfortynninger fra 0,5 mg/ml ned til 3,9 µg/ml.
3. 0,5 mg prøve ble løst i 3 ml destillert vann.
4. 160 µl ble pipettert fra hver prøve, standardløsning og kontroll, destillert vann, over i hver sin brønn i mikrotiterplate. Det ble laget triplikater av hver prøve.
5. 40 µl fargereagens ble tilsatt hver brønn, løsningen ble mikset godt.
6. Prøvene ble inkubert i romtemperatur i maks én time.
7. Absorbansen ble målt ved 595 nm.

4.5. Biologisk aktivitet

4.5.1. Komplementfikseringstesten

Prinsipp (Michaelsen et al., 1991)

I denne testen brukes det erythrocytter fra sau sensibilisert med antistoffer fra kanin. Komplementsystemet vil føre til hemolyse av blodcellene, men ved tilsetning av prøve som enten aktiverer eller hemmer komplementets proteiner vil hemolysen av blodcellene reduseres. Dersom en slik redusjon forekommer vil man kunne si at prøven har en komplementfikserende aktivitet.



Figur 4.18 Komplementfikseringstestens prinsipp: hemming av hemolyse er proporsjonal med fargen på supernatanten. Sterk rød farge: Ingen lysing av de røde blodcellene. Klar farget supernatant: 100 % lyse.

Kjemikalier

Blod fra sau 7001, tappet 27.09.2010 og 11.02.2011

Amboceptor virion: Fortynnet 1:2500 i veronalbuffer (06.09.2009 og 04.02.2011)

Fosfatbuffer (PBS)

Veronal/BSA-buffer: Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % Natriumazid (10 %)

Komplement: Serum fra ECG (humant)

Standardløsning: BP II, pektin fra *Biophytum petersianum* med utgangskonsentrasjon 1 mg/ml

Prøveløsninger: Alle løsningene hadde en utgangskonsentrasjon på 1 mg/ml

Destillert vann

Utstyr

Mikrotiterplate 96 brønner, flat- og rundbunnet

Glassrør

Varmeskap med ristepate: Termax 37 °C

Whirlimixer

Sentrifuge (metode 4.1.9.)

Absorbansmåler

Framgangsmåte

Vasking av saueblodceller (100 µl/plate)

1. 100 µl blod ble overført til glassrør.
2. Blodet ble tilsatt fosfatbuffer.
3. Røret ble sentrifugert på 1000 g i 5 min.
4. Vaskevannet ble fjernet.
5. Trinn 2-4 ble gjentatt.
6. Blodet ble tilsatt veronal/BSA-buffer.
7. Løsningen ble sentrifugert på 1000 g i 5 min.
8. Væsken over blodet ble fjernet, og ble sittende igjen med pakkede blodceller.

Sensibilisering av blodcellene

1. 5,925 ml veronal/BSA-buffer ble overført til glassrør.
2. 15 µl amboceptor virion ble tilsatt.
3. 60 µl pakkeblodceller overføres røret.
4. Røret ble inkubert ved 37 °C i 30 min med risting.
5. Løsningen ble vasket med fosfatbuffer og sentrifugert på 1000 g i 5 min.
6. Supernatanten ble fjernet.
7. Trinn 5-6 ble gjentatt.
8. Blodet ble tilsatt veronal/BSA-buffer og sentrifugert på 1000 g i 5 min.
9. Trinn 6 ble gjentatt.
10. Det ble tilsatt 5,490 ml komplementbuffer til blodcellene, dette er nå en 1 % løsning av blodcellene.

Fortynning av prøvene: 2- folds fortynning

Det ble laget en fortynningsrekke av hver prøve.

1. 500 µg/ml: 0,5 g prøve ble løst i 1 ml buffer
2. 250 µg/ml: 400 µl av fortynning 1 og 400 µl buffer
3. 125 µg/ml: 400 µl av fortynning 2 og 400 µl buffer
4. 62,5 µg/ml: 400 µl av fortynning 3 og 400 µl buffer
5. 31,3 µg/ml: 400 µl av fortynning 4 og 400 µl buffer
6. 15,6 µg/ml: 400 µl av fortynning 5 og 400 µl buffer

BPII ble benyttet som standard, og fortynnet på samme måte som prøvene over. Det kan være behov for videre fortynning av standarden for å få en mer dekkende standardkurve.

Titreringskurve for komplement

For å benytte seg av denne metoden er det viktig å vite hvor mye komplement som må til for å fremkalle 50 % lyse.

Dette gjøres for hver blodtapping eller dersom det er lenge siden komplementet har vært i bruk.

Framgangsmåte

1. Komplement ble fortynnet på følgende måte (Tabell 4.2)

Tabell 4.2 Fortynningsskjema for komplement

Forhold	Komplement	Veronal-BSA
Komplement: buffer	(μ l)	buffer (μ l)
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890

2. 28 brønner med 50 μ l buffer (4 brønner per komplement fortynning), 12 brønner med destillert vann ble overført til rundbunnet mikrotiterplate.
3. 50 μ l av komplementfortynningene ble tilsatt buffer brønnene.
4. Platen ble dekket med tape og satt til risting ved 37 °C i 30 min.
5. 50 μ l 1 % sensibiliserte erythrocytter ble tilsatt hver brønn og inkubert i 37 °C i 30 min med risting.
6. Platen ble sentrifugert i 5 min på 1000 g.
7. 100 μ l av hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate og sentrifugert i 5 min på 1000 g.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm og 50 % lyse ble beregnet.

Testing av plantematerialet

1. Duplikater på 50 µl av hver fortynning av prøven ble tilsatt en brønn i en rundbunnet mikrotiterplate.
2. 50 µl av den komplementfortynningen som ga 50 % lyse ble tilsatt hver brønn.
3. 4 brønner ble tilsatt 100 µl destillert vann (100 % lyse) og 4 brønner ble tilsatt 50µl veronal/BSA-buffer og 50 µl komplement.
4. Platen ble dekket med tape og inkubert med risting ved 37 °C i 30 min.
5. Alle brønnene ble tilsatt 50 µl sensibiliserte erytocytytter. Platen ble inkubert i nye 30 min med risting ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert i 5 min, 1000 g.
7. 100 µl av supernatanten ble overført til flatbunnet mikrotiterplate og sentrifugert på 1000 g i 5 min.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm.

Beregningsformler

Lyseringsgrad:

$(\text{Abskontroll}/\text{Absdest.vann}) * 100 \%$

% Hemming fra ekstrakt:

$[(\text{Abskontroll} - \text{Absprøve}) / \text{Abskontroll}] * 100 \%$

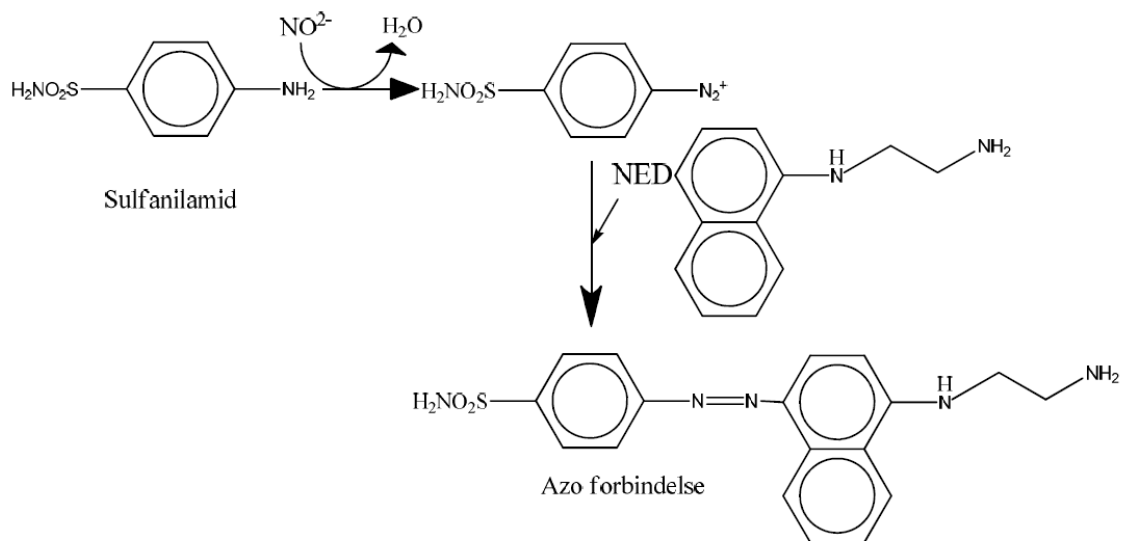
4.5.2. Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Prinsipp (Nims et al., 1995)

Testen ble utført på Rikshospitalet i samarbeid med Kari Tvette Inngjerdingen.

Ved aktivering av makrofager skiller de ut nitrogenoksid (NO). NO er en aktiv substans som medfører vasodilatasjon og økt vaskulær permabilitet.

Ved nedbrytning av NO dannes det nitritt (NO_2^-) som benyttes som markør for makrofagaktivering. I denne metoden brukes det Griess-reagenser bestående av sulfanilamid og N-(1-naphtyl)etyldiamin. Når disse reagerer med NO_2^- dannes det et farget kompleks i surt miljø.



Figur 4.19 Når Griess reagenset reagerer med nitritt dannes det en azo forbindelse

Kjemikaler

Dyrkningsmedium: RPMI 1640 tilsatt kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2 mM LL-glutamin, 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol

Griess-reagens A: 1 % sulfanilamid (i 5 % fosforsyre)

Griess-reagens B: N-(1-naphtyl)etyldiamin i destillert vann

Cellelinje: RAW 264,7 derivert fra musemakrofager

Positiv kontroll: LPS (lipopolysakkarid) 10 ng/ml, PM II fra *Plantago major* 2 mg/ml

Utstyr

Celleteller: Coulter® Particle Counter, Beckman Coulter

Sentrifuge Rottina 420R Hettich zentrifugen

Celleinkubator skap med CO₂-kontroll (Forma Scientific)

Absorbansmåler: Titertek multiskan

Mikrotiterplate med flat- og rundbunn

Framgangsmåte

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. 20 µl av cellesuspensjon ble tatt ut og tilsatt 10 ml isoton buffer II for å telles ved bruk av coulter counter.
2. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 min.
3. Cellene ble tilsatt dyrkningsmedium slik at det ble oppnådd en konsentrasjon på 500 000 celler/ml.
4. Det ble laget en fortynningsrekke på 2 mg/ml, 200 µg/ml og 20 µg/ml av prøvene.
5. 5 µl prøve ble tilsatt hver brønn i en flatbunnet mikrotiterplate. Det ble laget duplikater av hver fortynning.
6. Det ble også laget 2 paralleller av de positive kontrollene, LPS og PM II, og rent medium ble benyttet som blank.
7. 100 µl cellesuspensjon (= 50 000 celler) ble tilsatt hver brønn. Hver brønn inneholder 100 µl løsning med en sluttkonsentrasjon av prøvene på 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml.
8. Cellene ble inkubert ved 37 °C i en celleinkubator med 4 % CO₂ i ca 24 timer.
9. Supernatanten ble overført til en rundbunnet mikrotirterplate og sentrifugert ved 1400 rpm i 2 min.
10. 50 µl av supernatanten ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate.
11. En standardkurve ble laget med 2-folds fortynninger av 100 mM NaNO₂. Disse ble behandlet likt som prøvene.
12. 50 µl Griess reagens A ble tilsatt hver brønn.
13. Platene ble dekket med aluminiumsfolie og satt mørkt i 10 min.

14. 50 µl Griess reagens B ble tilsatt hver brønn.

15. Absorbansen ble målt ved 540 nm.

4.6. Feltarbeid i Mali

Det ble utført en etnobotanisk studie i Mali januar-februar 2011 under veiledning av professor Drissa Diallo. Hensikten med studien var å undersøke ulike plantasjer som i samarbeid med instituttet for tradisjonell medisin (DMT) i Mali kultiverte *Vernonia kotschyana*, og undersøke hvilken dyrkemethode som egner seg best for planten.

Det ble foretatt undersøkelse av to plantasjer, i Banancoroni og Donéguébougou, i tillegg til DMTs plantasje.

Følgende spørsmål ble stilt på plantasjene:

1. Hvor kommer frøene fra?
2. Hvor stort er dyrkningsfeltet?
3. Hvilken planteteknikk benyttes?
4. Hvordan ble plantene vannet?
5. Når forekommer innhøstningen?
6. Hvor mange planter ble det høstet?
7. Hvilke tørkebetingelser har røttene, og hvor lang tid tar tørkeprosessen?
8. Hva er utbyttet for ferske- og tørkede røtter?

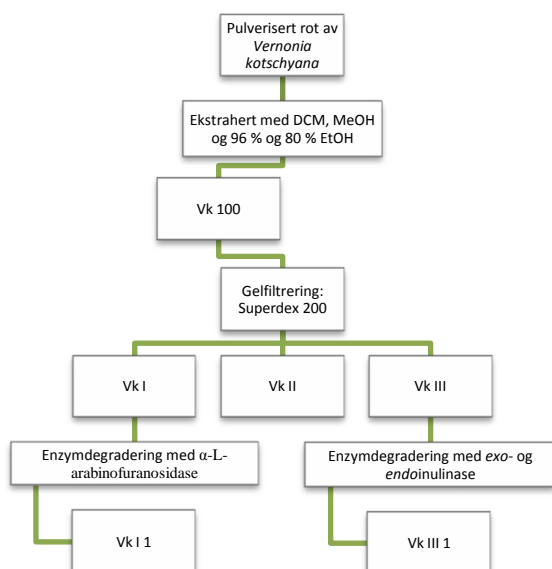
Drissa Diallo fungerte som tolk under intervjuene da de ble utført på det lokale språket, Bambara.

5. RESULTATER OG DISKUSJON

5.1. Plantemateriale

De ville røttene fra *V. kotschyana* ble samlet inn i Mansatola, Kolokani, i Mali. Røtter fra kultiverte planter ble innhøstet fra to år og seks måneder gamle planter fra DMTs medisinplantehage i Bamako, Mali.

Plantematerialet har fått forkortelsene Vky, Vko og Vkw som står for henholdsvis *V. kotschyana* unge røtter (6 mnd), eldre røtter (2 år) og ville røtter.

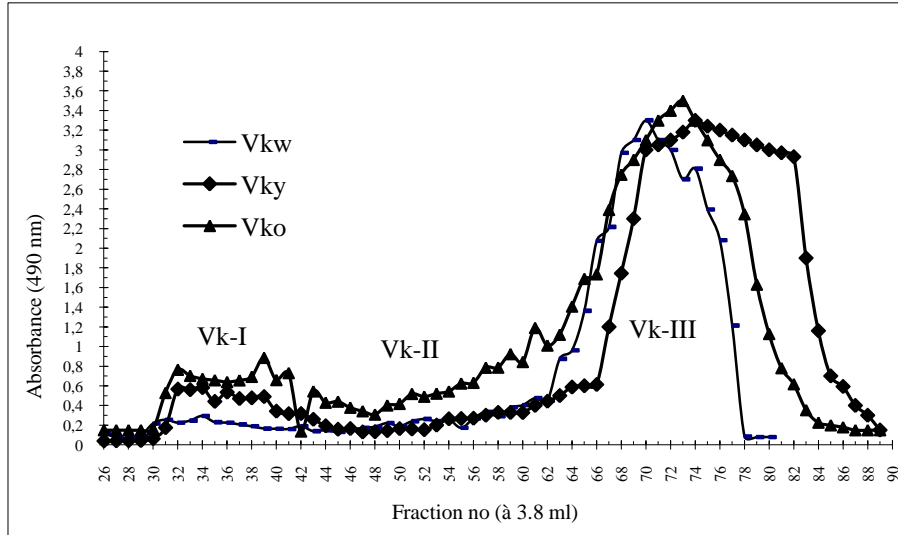


Figur 5.1 Flytskjema for opparbeidelse av fraksjonene fra *V. kotschyana*

5.2. Ekstraksjon og fraksjonering

Ekstraksjon av de pulveriserte røttene ble utført av Kari Tvette Inngjerdingen (Figur 5.1). Lavmolekylære substanser ble fjernet fra de pulveriserte røttene med diklormetan (DCM), metanol (MeOH), samt 96 % og 80 % etanol (EtOH). Det tørkede residuet etter ekstraksjon med organiske løsemidler ble videre ekstrahert to ganger med vann ved 100 °C og filtrert. Det vandige råekstraktet, Vk 100, ble dialysert og oppbevart ved -18 °C eller frysetørket.

Inulin ble forsøkt fjernet fra ekstraktene ved sentrifugering, og den inulin-reduuerte delen ble applisert på en Superdex 200 kolonne. Dette ga opphav til tre fraksjoner, Vk I, II og III, separert etter molekylvekt (Figur 5.2). Disse fraksjonene ble så dialysert og frysetørket.

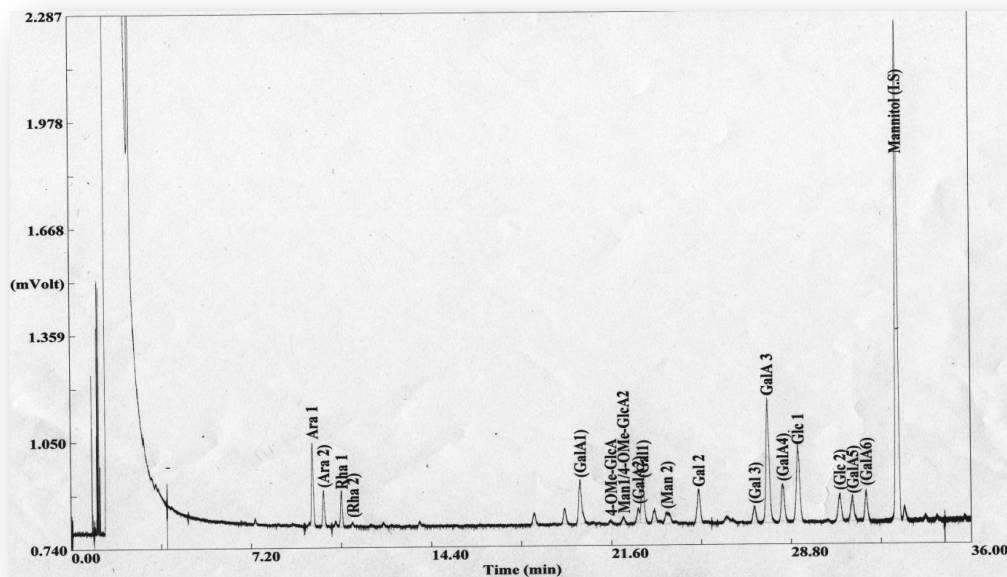


Figur 5.2 Elueringsprofil av Vk 100 fraksjonene på gelfiltreringskolonne, Superdex 200.

5.3. Kjemisk karakterisering

5.3.1. Kjemisk karakterisering, V_k 100

1 mg prøve av råekstraktene, V_k 100, ble veid inn, metanolysert og TMS-derivatisert, for deretter å bestemme monosakkaridinnholdet ved hjelp av GC. Et monosakkarid kan gi opphav til flere topper. Dette skyldes at et monosakkarid kan forekomme i flere konformasjoner. Det kan være åpent, seks- eller femringet og hydroksylgruppen på C1 kan enten være i β- eller α- posisjon. Det er toppen med høyest intensitet som brukes til å beregne mengden monosakkarid. Monosakkaridinnholdet er vist i tabell 1, og GC-kromatogrammet for V_k 100 er vist i figur 3.



Figur 5.3 GC-kromatogram av V_k 100 med mannitol som intern standard

Tabell 5.1 Monosakkaridinnholdet i V_k 100 fraksjonene. Verdiene er oppgitt i mol prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold

	Ara mol%	Rha mol%	Man mol%	Gal mol%	Glc mol%	GalA mol%	4-O-Me- GlcA mol%
V _k 100	10	2,8	1,6	8,6	53,6	21,4	0,7
V _{ko} 100	18,7	6,4	2,6	11,3	24,5	33,3	2,9
V _{kw} 100	13,6	3,7	1,7	8	19,8	52,5	0,9

Prosentverdiene i tabell 1 ble beregnet ved bruk av monosakkaridets molverdi. Grunnen til dette er at monosakkaridene har forskjellig molekylvekt og bruken av molverdier vil gi et bedre sammenlikningsgrunnlag.

Råekstraktene av *V. kotschyana* inneholder blant annet arabinose-, rhamnose-, galaktose- og galakturonsyrener. Disse monosakkaridene er vanlig å finne i pektiner. GalA og Rha kan tyde på tilstedeværelse av rhamnogalakturonan I (RG I) og andelen Gal og Ara i fraksjonene kan stamme fra arabinogalaktan type I og II (AG I og II), samt arabinaner. I tillegg inneholder alle fraksjonene mye GalA som er hovedbestanddelen i det glatte området i pektiner, homogalakturonan.

Fruktoseinnhold

I tillegg til monosakkarider typiske for pektiner ble det påvist et relativt høyt innhold av Glc i V_k 100 fraksjonene. V_k 100 fraksjonene inneholder i tillegg mye fruktose. I følge PABR-testen inneholder V_{ky} 100, V_{ko} 100 og V_{kw} 100 henholdsvis 83 %, 83,6 % og 85,4 % fruktose. Fruktosen har sannsynligvis sitt opphav fra inulin, som det finnes mye av i Asteraceae-familien. Inulins hovedfunksjon i Asteraceae-planter er som langtids karbohydratreserve. I tillegg har den en beskyttende effekt mot kulde, tørke og bidrar i reguleringen av osmose. Konsentrasjonen av inulin øker ved kulde og reduseres når planten er i vekst, (Jeong, B. og Housley, T.L., 1990). Inulin har en terminal glukoseenhet noe som delvis forklarer den høye prosentandelen glukose i V_k 100 fraksjonene. Inulinet i *V. kotschyana* har vist å ikke inneha biologisk aktivitet i komplementfikserings testen, noe som ble undersøkt i en tidligere studie (Nergard et al., 2004).

Fenolinnhold

Arabinose- og galaktoseenheter kan være forestret med fenolsyrer, som ferulasyre eller kumarinsyre. I planter er det mest av ferulasyre, hvor den kryssbinder polysakkarider i celleveggen. Det påstås at ferulasyre utviser en rekke aktiviteter, blant annet antioksidant, antimikrobiell, anti-inflammatorisk, anti-trombotisk og krefthemmende aktivitet.

Fenolinnholdet i V_{ky} 100, V_{ko} 100 og V_{kw} 100, beregnet som ferulasyreekvivalenter, er henholdsvis 0,4 %, 1,1 % og 1,1 %.

Proteininnhold

Proteininnholdet ble bestemt ved bruk av en enkel fargetest, Bio-Rad protein assay, med bovint serum albumin som standard. Vky 100, Vko 100 og Vkw 100 inneholder lite protein, henholdsvis 0,7 %, 2,2 % og 0,7 %.

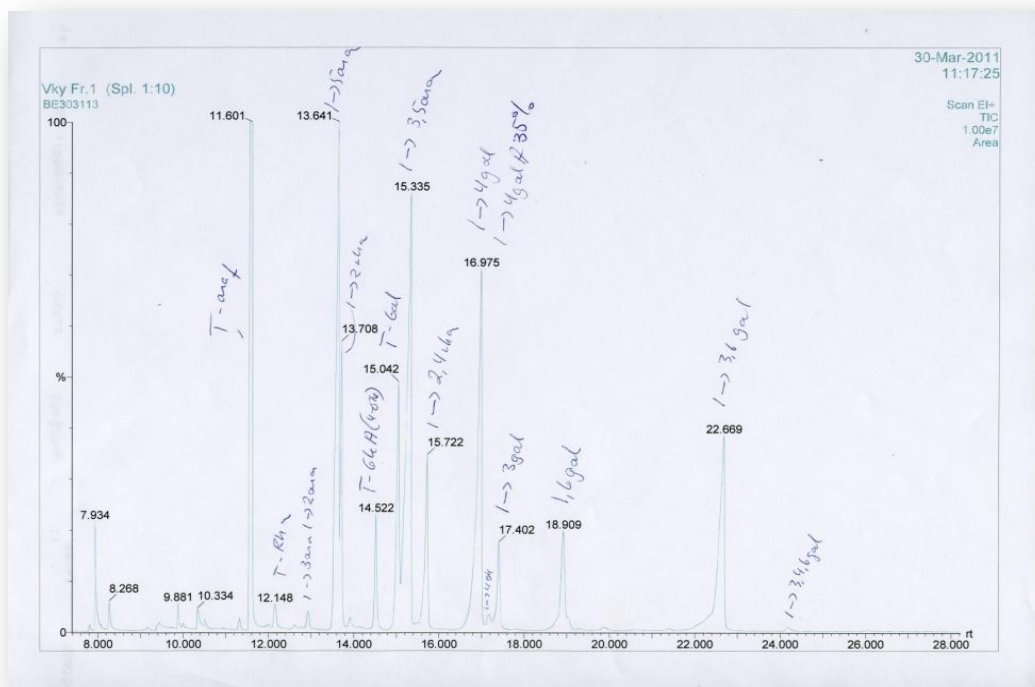
5.3.2. Kjemisk karakterisering, V_k I

V_k 100, råekstraktene, ble videre separert ved bruk av en gelfiltreringskolonne, Superdex 200, til V_k I, II, og III, (Figur 5.2). V_k I fraksjonene ble metanolysert, TMS-derivatisert og deretter analysert ved hjelp av GC, for å bestemme karbohydratsammensetningen, (Tabell 5.2).

Tabell 5.2 Monosakkaridinnholdet i V_k I fraksjonene. Verdiene er oppgitt i mol prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold

	Ara mol%	Rha mol%	Man mol%	Gal mol%	Glc mol%	GalA mol%
V _{ky} I	45,8	7,6	4,4	27,5		14,8
V _{ko} I	40,4	10,9		28,2		20,5
V _{kw} I	42,6	7,9		30,5	3,4	15,6

Videre ble V_k I fraksjonene metylert, redusert med NaBD₄ og acetykert før de ble applisert på GC-MS for undersøkelse av bindingsmønsteret til de ulike monosakkaridene. Uronsyrer i prøvene ble redusert før metyleringen ved bruk av NaBD₄ og carbodiimide, (Figur 5.4, tabell 5.3)



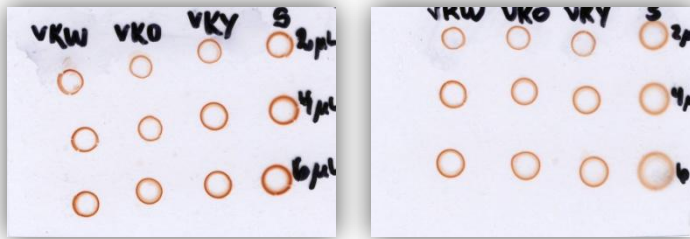
Figur 5.4 Eksempel på et GC-MS kromatogram, fraksjon Vky I

Tabell 5.3 Mol prosentene av glykosyl enhetene i Vk I fraksjonene etter metylering.

Glykosyl enheter	Bindingstype	Vky I	Vko I	Vkw I
Rha	Terminal <i>p</i>	0,5	0,9	0,8
	1,2	3,5	5,1	3,5
	1,2,4	3,7	5,0	3,7
Ara	Terminal <i>f</i>	19,5	13	17,7
	1,2	0,2	0,3	
	1,3	0,2	0,3	
	1,5	13,4	12,7	12,9
	1,3,5	12,5	14,3	12,0
GalA	1,4	14,8	20,5	15,6
Gal	Terminal	4,8	5,5	4,4
	1,3	2,1	2,0	3,1
	1,4	8,5	11,2	10,8
	1,6	3,1	3,8	2,9
	1,3,6	8,8	5,4	9,2
	1,3,4,6	0,2	0,2	0,1

Vk I fraksjonene består hovedsakelig av Rha-, Ara-, Gal- og GalA-enheter, (Tabell 5.2). Bindingsmønsteret tyder på tilstedeværelse av arabinaner, da Ara er å finne som både lineært 1→5 Ara, forgrenet 1→3,5 Ara og terminal Ara. Vk I fraksjonene har videre et høyt innhold av 1→3 Gal, 1→6 Gal, 1→3,6 Gal, 1→4 Gal, samt terminal Gal, noe som kan tyde på tilstedeværelse av arabinogalaktan type I og II. Arabinogalaktaner og arabinaner kan være bundet til en RG I hovedkjede bestående av Rha og GalA-enheter med et forhold på ca 1:2, hvor Rha- enhetene er bundet 1→2 til GalA. Halvparten av Rha-enheter har sidekjeder bundet via C4, (Tabell 5.3).

Vk I fraksjonene med konsentrasjoner på 2 mg/ml ga utfelling med Yariv-reagens ved konsentrasjoner av Yariv på 2 mg/ml og 1 mg/ml, (Figur 5.5). Yariv-reagenset reagerer med karbohydrat-delen, som ofte er arabino-3,6-galaktan (AG II), på arabinogalaktanproteiner.



Figur 5.5 Yariv-test med 2 mg/ml (venstre) og 1 mg/ml (høyre) Yariv reagens med arabisk gummi som positiv kontroll.

Fruktoseinnhold

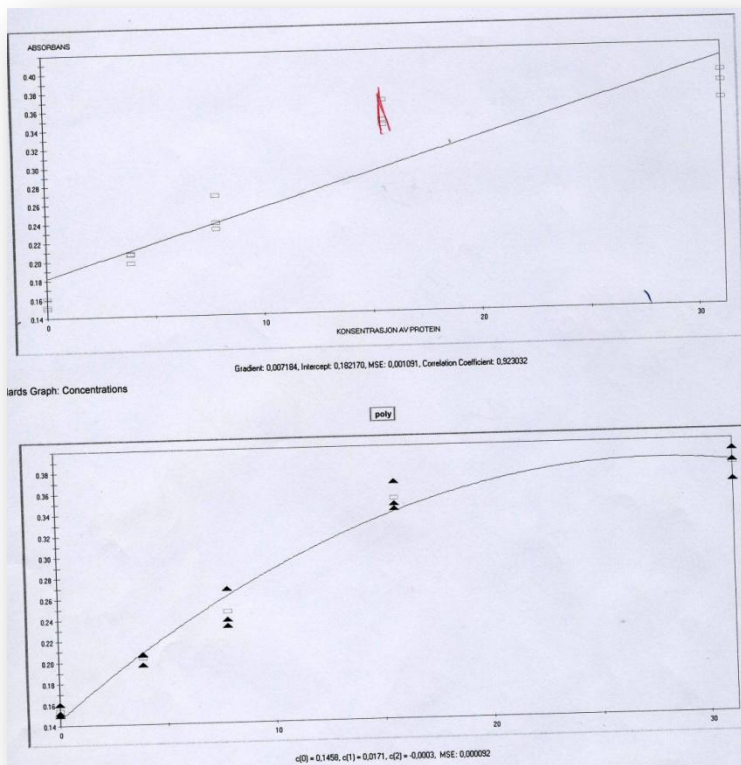
Vky I, Vko I og Vkw I inneholder henholdsvis 11,9 %, 10,4 % og 13,0 % fruktose.

I en tidligere studie av *V. kotschyana* ble inulinet i den sure polysakkaridfraksjonen, Vk100A2, definert til å ha en polymeriseringsgrad på omtrent 50. Det var derfor uventet at noe av inulinet ble eluert ut sammen med den høye molekylære fraksjonen Vk100A2a i denne studien. Nergards teori er at inulinet var blitt kovalent bundet med polymerens sidekjedder. Det antas at denne teorien også kan forklare fruktoseinnholdet i Vk I fraksjonen.

Proteininnhold

Proteininnholdet i fraksjonene er 4,3 %, 3 % og 2,9 % for henholdsvis Vky I, Vko I og Vkw I. Arabinogalaktanproteiner består av 1-10 % protein som inneholder hovedsakelig hydroxyprolin/prolin, alanin, serin og treonin. I en fraksjon av tomat fant man et høyere innhold av AGP i unge røtter og stengler i forhold til de gamle, (Nothnagel, 1997). Dette kan være årsaken til en noe høyere proteinverdi i de unge røttene, Vk I. Det kan også skyldes at desto eldre planter blir desto høyere blir polysakkaridandelen i forhold til proteindelen. Det er blitt påstått at AGP har regulering- og signaloppgaver i forhold til blant annet celledifferensiering og utvikling av vev, (Albersheim et al., 2011). Nergard et al. (2004) har tidligere studert en liknende fraksjon, Vk100A2a, isolert fra ville røtter av *V. kotschyana*. Her ble blant annet aminosyresammensetning for proteindelen i denne fraksjonen undersøkt, (Tabell 5.4). I denne studien ble det konkludert med at Vk100A2a fraksjonen er et arabinogalaktan pektin på grunn av lav proteindel. Det antas derfor at Vk I fraksjonene også er arabinogalaktan pektiner.

Proteininnholdet ble beregnet ved bruk av en andre orden polynomial modell fordi absorpsjonsspekteret til bundet og fri farge overlapper og kan føre til at Bradfordassayet gir en ikke-lineær proteinkonsentrasjon, (Figur 5.5), (Olsen, B.J.S.C. og Markwell, J., 2007).



Figur 5.5 Bovint Serum Albumin (BSA) standardkurve, lineær regresjon versus andre orden polynomial. Den lineære linjen går ikke gjennom alle punkter, mens den polynomiale passer bedre.

Tabell 5.4 Amniosyresammensetningen i proteindelen av Vk100A2a

Aminosyre	Mol %
Serin	17,1
Alanin	14,9
Hydroxyprolin	7,4
Proline	3,1
Threonin	4,7

Det kan tyde på at Vk I fraksjonen består av arabinogalaktan II på bakgrunn av utfelling med Yariv-reagens, monosakkaridinnholdet og bindingsmønsteret. Det er en høy andel av 1→5 og 1→3,5 bundet arabinose, noe som tyder på høy forgrening av pektinet. Den høye andelen av 1→4 Gal tyder på tilstedeværelse av AG I.

Fenolinnhold

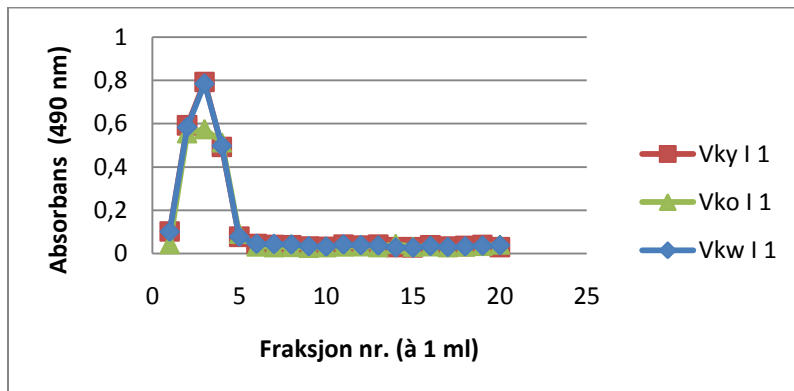
Fenolinnholdet i V_k I fraksjonene ble bestemt til 0,7 %, 0,9 % og 0,8 % for henholdsvis V_{ky} I, V_{ko} I og V_{kw} I.

5.3.3. Kjemisk karakterisering, V_k I 1

Enzymdegradering av V_k I med α -L-Arabinofuranosidase

For å bestemme struktur-aktivitetsforholdet til V_k I ble 25 mg prøve tilsatt enzymet α -L-arabinofuranosidase. Den degraderte løsningen ble filtrert 0,45 μ m og applisert på en gelfiltreringskolonne, PD-10 kolonne, for desalting og separasjon. Separasjonen utføres etter molekylstørrelse, hvor høymolekylære substanser elueres ut først og de med lav molekylstørrelse elueres ut sist.

Karbohydratprofiler utført med fenol-svovelsyretesten viste kun én topp (Figur 5.6), kalt V_k I 1, som tilhører den opprinnelige fraksjonen V_k I. Det var ingen spor av mindre fragmenter, monosakkarideneheter.



Figur 5.6 Karbohydratprofil for V_k I etter enzymdegradering med α -L-arabinofuranosidase og separasjon på PD-10 kolonne.

Resultatene etter metanolyse, TMS-derivatisering og GC viste ingen reduksjon i arabinoseinnholdet etter degradering med α -L-arabinofuranosidase, (Tabell 5.5). Årsaken til dette er antageligvis at enzymet som ble benyttet i forsøket er fra bifidobakterier. Disse har høy spesifisitet for arabinoser som er bundet til xylaner, og mindre aktivitet på *p*-Nitrophenyl- α -arabinofuranosid, sukkerbete arabinan og arabinogalakto-oligosakkarider, (Megazyme,

2011). I en tidligere masteroppgave utført av Evjenth (2007) ble spesifisitet til ulike arabinofuranosidaser testet. Hun fant ut at det samme enzym som ble benyttet her kun reduserte arabinoser med 9,3 % på lavmolekylære fraksjoner. Hun antar at deres ulike evne til å kutte arabinoser skyldes forurensninger.

Nergard et al. (2004) har i en tidligere studie utført enzymdegradering av Vk100A2a, tilsvarer Vk I, hvor det ble benyttet enzym fra *Aspergillus niger*. En reduksjon på 90 % av arabinoseenhetene ble observert.

Tabell 5.5 Monosakkaridinnholdet i Vk I 1 fraksjonene. Verdiene er oppgitt i mol prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold

	Ara mol%	Rha mol%	Gal mol%	Glc mol%	GalA mol%
Vky I 1	45,7	9,5	27,8		17,1
Vko I 1	42,3	10,3	27,2		20,2
Vkw I 1	41	7,9	33,4	3,4	16,8

5.3.4. Kjemisk karakterisering, Vk II

Vk II er en mellomfraksjon mellom de to sure fraksjonene Vk I og Vk III, (Figur 5.2).

Monosakkaridanalysen viste at denne fraksjonen ikke var en ren fraksjon, men er en blanding av strukturer som finnes både i Vk I og Vk III-fraksjonene. Det ble derfor valgt å utelate Vk II-fraksjonene ved videre arbeid.

5.3.5. Kjemisk karakterisering, Vk III

Vk III fraksjonene består hovedsakelig av 1→4 bundet galakturonsyre, samt glukose, (Tabell 5.7 og 5.8). Vko III fraksjonen inneholder mer galakturonsyre og mindre glukose i forhold til Vky III og Vkw III.

Tabell 5.7 Monosakkaridinnholdet i V_k III fraksjonene. Verdiene er oppgitt i mol prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold

	Ara mol %	Rha mol %	Man mol %	Gal mol %	Glc mol %	GalA mol %	4-O-Me GlcA mol %
V _{ky} III	0,6	0,5	0,1	2,7	24,5	71,4	
V _{ko} III	2,0	2,1	0,5	3,1	7,5	83,4	1,2
V _{kw} III	1,0	0,5		1,9	28,6	66,3	1,8

Tabell 5.8 Mol prosentene av glykosylenhetene i V_k III fraksjonene etter metylering.

Glykosyl enheter	Bindingstype	V _{ky} III	V _{ko} III	V _{kw} III
Rha	Terminal <i>p</i>	0,5	0,7	0,5
			1,4	
Ara	Terminal <i>f</i>	0,6	0,5	0,4
			1,5	0,6
GalA		71,4	83,4	66,3
Gal	Terminal	2,7	3,1	1,9

GC-MS resultatene viste at alle Gal A enhetene var 1→4 bundet, mens Gal-enhetene var terminale. Det ble det observert to topper med 2→1 bundet fruktose ved retensjonstidene 16,7 og 16,9 i GC-MS-spekteret. Dette bekrefter innhold av inulin i prøven.

Fruktoseinnhold

V_k III-fraksjonene inneholder store mengder fruktose i forhold til de andre fraksjonene. V_{ky} III, V_{ko} III og V_{kw} III inneholder henholdsvis 76,3 %, 43,7 % og 80,0 % fruktose. Fruktosen har mest sannsynlig sitt opphav fra inulin. Det antas at inulinen er av lav polymeriseringsgrad fordi den ble eluert ut sammen med V_k III fraksjonene, som har lave molekylstørrelser.

Forskjellen mellom de ulike V_k III fraksjonene er at V_{ko} III inneholder minst fruktose og glukose. Hvis man ser på fruktoseinnholdet i rækstraktene finnes det ingen forskjell der.

Årsaken til den lave verdien for V_{ko} III ligger antageligvis ved sammenslåingen av fraksjoner etter eluering på Superdex-kolonnen. Det antas at det har blitt med litt mindre inulin i denne fraksjonen enn de andre.

Fenolinnhold

Vk III-fraksjonene har fenolsyreinnhold på 0,4 % og 0,8 % for henholdsvis Vko III og Vkw III. For Vky III fraksjonen ble fenolsyre ikke detektert.

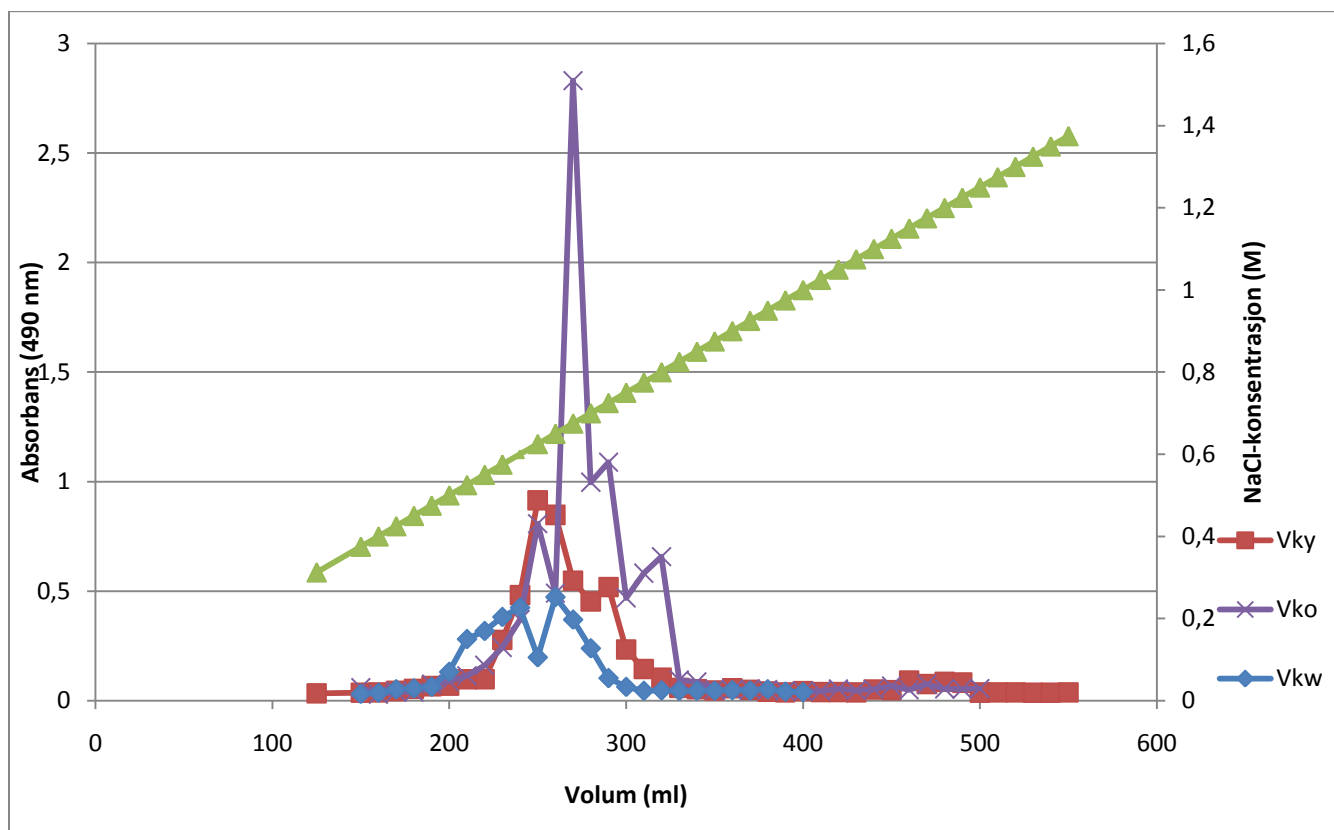
Proteininnhold

Proteininnholdet ble bestemt til 0,4 %, 1,1 % og 1,2 % for henholdsvis Vky III, Vko III og Vkw III.

Enzymdegradering av Vk III med *endo-* og *exoinulinase*

Vk III fraksjonene ble behandlet med *endo-* og *exoinulinase* og applisert på en ionebytterkolonne, ANX Sepharose 4 Fast flow. Inulin ble eluert ut sammen med den nøytrale med destillert vann. Den sure fraksjonen ble eluert ved en NaCl konsentrasjon ~ 0,4 M-0,8 M. Etter utførelse av fenol-svovelsyretesten ble en karbohydratprofil laget, noe som ga opphav til flere fraksjoner, (Figur 5.7). Fraksjonene ble dialysert og monosakkaridinnholdet ble bestemt. Monosakkaridsammensetningen av fraksjonene var tilnærmet lik og de ble dermed slått sammen til én fraksjon, Vk III 1. Frysetørring av den nøytrale fraksjonen ga en seig masse som tydet på innhold av glukose og salter. Den nøytrale fraksjonen til Vko III inneholdt opptil 60 mol % glukose, 23 mol % mannose og 12 mol % arabinose.

Vk III 1 fraksjonene inneholder gjennomsnittelig 93 mol % 1→4 bundet galakturonsyre, i tillegg til noe GalA-enheter terminalt bundet. Innholdet av Ara-, Rha- og Gal-enheter er omtrent de samme som før degradering av inulinet, mens GalA-enhetene har økt noe. Årsaken til dette kan være at flere GalA-enhetene, spesielt de terminale, har blitt mer tilgjengelige etter degradering av inulinet, (Tabell 5.9 og 5.10). Glukoseandelen i Vk III 1 fraksjonene er blitt kraftig redusert etter degradering av inulinet. Den er blitt redusert med 93,9 %, 86,6 % og 94,8 % for henholdsvis Vky III 1, Vko III 1 og Vkw III 1.



Figur 5.7 Karbohydratprofilen av Vc III etter degradering med *exo-* og *endo*inulinase, og separasjon på en ANX Sepharose Fast Flow kolonne med en 0-1 M NaCl-gradient.

Tabell 5.9 Monosakkaridinnholdet i Vc III 1 fraksjonene. Verdiene er oppgitt i mol prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold

	Ara mol %	Rha mol %	Gal mol %	Glc mol %	GalA mol %
Vky III 1	0,4	0,7	2,4	1,5	94,8
Vko III 1	0,9	2,1	2,6	1,0	93,0
Vkw III 1	0,8	1,3	2,5	1,5	93,8

Tabell 5.10 Mol prosentene av glykosyl enhetene i V_k III 1 fraksjonene etter metylering.

Glykosyl enheter	Bindingstype	V _{ky} III 1	V _{ko} III 1	V _{kw} III 1
Rha	Terminal <i>p</i> 1,2	0,7	2,1	1,3
Ara	Terminal <i>f</i> 1,5	0,3 0,1	0,5 0,4	<0,2 0,7
GalA	1,4 Terminal	84,8 8,2	86,8 6,2	81,5 12,3
Gal	Terminal	2,4	2,6	2,5

Fruktoseinnhold

V_k III 1-fraksjonene inneholder mindre fruktose etter degraderingen med *exo*- og *endo*nulinase med et innhold på 15,7 %, 8,2 % og 13,5 % for henholdsvis V_{ky} III 1, V_{ko} III 1 og V_{kw} III 1. Dette betyr en reduksjon på 79,4 %, 81,2 % og 83,1 % for henholdsvis V_{ky} III 1, V_{ko} III 1 og V_{kw} III 1 i forhold til deres tilsvarende V_k III fraksjoner.

5.4. Biologiske studier

Mange pektiner isolert fra planter har vist biologisk aktivitet. Det mange av disse har til felles er en rhamnogalakturonan hovedkjede med mange forgreiningspunkter, og med høyt forgrenede sidekjeder. Kombinasjonen av sidekjeder og den tredimensjonale formen på polysakkaridet er essensielt for å aktivere det biologiske system, (Paulsen, 2002).

Målet med de biologiske testene i denne studien er å sammenligne aktiviteten av polysakkarider isolert fra ville røtter versus kultiverte røtter, og om det kan være av betydning når røttene bør sankes.

5.4.1. Komplementfiksering

Alle fraksjonene ble testet for deres komplementfikserende effekt, og sammenlignet med pektinet BP-II isolert fra *Biophytum petersianum*. Komplementtesten ble utført tre ganger på alle fraksjonene. Verdiene som er tatt med i oppgaven er fra tester hvor prøvene ga nærmest 50 % hemming av hemolysen.

Inhibitory concentration 50 (IC₅₀) er en betegnelse som referer til en konsentrasjon av plantematerialet som må til for å hemme hemolysen med 50 %, konsentrasjonen blir oppgitt i µg/ml, (Neubig et al., 2003).

Vk 100 fraksjonene

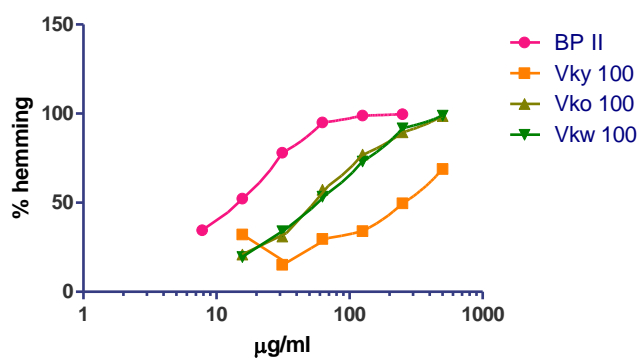
Alle fraksjonene i Vk 100 serien, råekstraktene, viste en dose-avhengig komplementfikserende aktivitet, (Tabell 5.11, figur 5.8). BP-II viste en 50 % hemming av hemolyse ved 14,8 µg/ml.

Vky 100 fraksjonen inneholder mindre GalA-enheter i forhold til Vko 100 og Vkw 100 med henholdsvis 21,4 mol %, 33,3 mol % og 52,5 mol %, (Tabell 5.1).

Vky 100 har videre betydelig mer innhold av glukose med sine 53,6 mol % i forhold til 24,5 mol % og 19,8 mol % for henholdsvis Vko 100 og Vkw 100. Dette kan forklare den høyere IC₅₀-verdien for Vky 100 i forhold til Vko 100 og Vkw 100.

Tabell 5.11 IC_{50} -verdiene til V_k 100 fraksjonene. Verdiene er presentert grafisk i figur 5.8

Fraksjon	IC_{50} -verdier ($\mu\text{g/ml}$)
V _{ky} 100	254,4
V _{ko} 100	54,6
V _{kw} 100	58,3
BP II	14,8



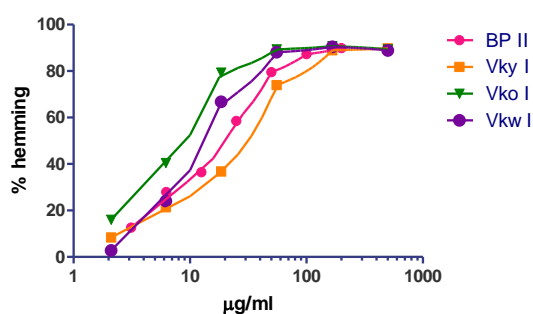
Figur 5.8 Komplementfikserende aktivitet til V_k 100 fraksjonene med BP II som positiv kontroll.

V_k I fraksjonene

Det er ingen store forskjeller mellom monosakkaridsammensetningen til de ulike V_k I fraksjonene, (Tabell 5.2). De inneholder hovedsakelig Ara- og Gal-enheter, som inngår i både AG I og AG II strukturer. Disse strukturene har vist komplementfikserende aktivitet i mange planter. Kun lave konsentrasjoner av V_k I fraksjonen er nødvendig for å oppnå 50 % hemming av hemolyse, og for både V_{ko} I- og V_{kw} I er IC_{50} -verdien lavere enn for standarden BP-II, (Tabell 5.12).

Tabell 5.12 IC_{50} -verdiene til V_k I fraksjonene. Verdiene er presentert grafisk i figur 5.9

Fraksjon	IC_{50} -verdier ($\mu\text{g/ml}$)
V _{ky} I	31,7
V _{ko} I	9,47
V _{kw} I	13,7
BP II	20,2



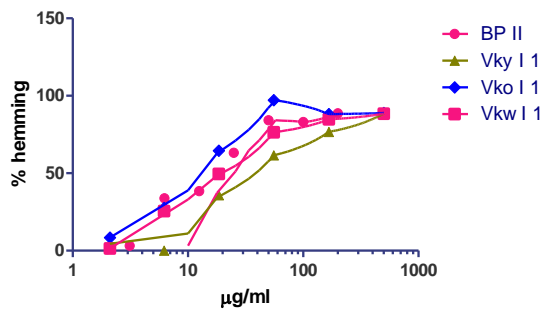
Figur 5.9 Komplementfikserende aktivitet til V_k I fraksjonene med BP II som positiv kontroll

V_k I 1 fraksjonene

V_k I 1 fraksjonene ble behandlet med α -L-arabinofuranosidase fra bifidobakterier med lav spesifisitet for den typen arabinoser som finnes i fraksjonen. Derfor ser man tilsvarende IC_{50} -verdier som for V_k I fraksjonene. I følge Nergard, som fikk redusert nesten all arabinose i den sammenlignbare fraksjonen V_k100A2a var det ingen forskjell i komplementfikserende aktivitet før og etter arabinose reduksjon. Det antas derfor at dette ville vært tilfelle her også hvis enzymene hadde fungert.

Tabell 5.13 IC_{50} -verdiene til V_k I 1 fraksjonene. Verdiene er presentert grafisk i figur 5.10

Fraksjon	IC_{50} -verdier ($\mu\text{g/ml}$)
V _{ky} I 1	38,8
V _{ko} I 1	13,7
V _{kw} I 1	19,9
BP II	25



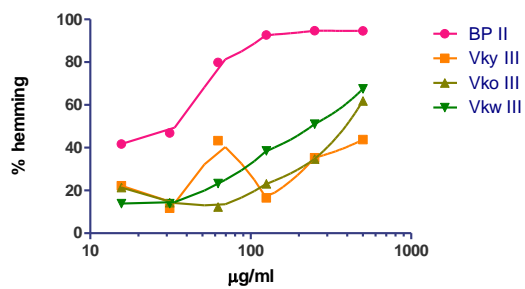
Figur 5.10 Komplementfikserende aktivitet til V_k I fraksjonene med BP II som positiv kontroll

V_k III fraksjonene

V_k III fraksjonene har lav komplementfikserende aktivitet sammenlignet med V_k I fraksjonene, (Tabell 5.14, figur 5.11) De strukturelle forskjellene mellom disse fraksjonene er store. V_k I fraksjonene består av pektiner med høy molekylstørrelse, 1150 kDa (b.Nergard et al. 2004) av rhamnogalakturonan med AG I-, AG II- og arabinan-sidekjerder. V_k III fraksjonene har lavere molekylstørrelse, og mesteparten av prøven inneholder 1→4 bundet GalA. Dette er hovedbestandelen i det ”glatte” område, av pektinet, homogalakturonan.

Tabell 5.14 *IC*₅₀-verdiene til V_k III fraksjonene. Verdiene er presentert grafisk i figur 5.11

Fraksjon	<i>IC</i> ₅₀ -verdier (µg/ml)
V _{ky} III	> 500
V _{ko} III	390,6
V _{kw} III	239,4
BP II	34,2



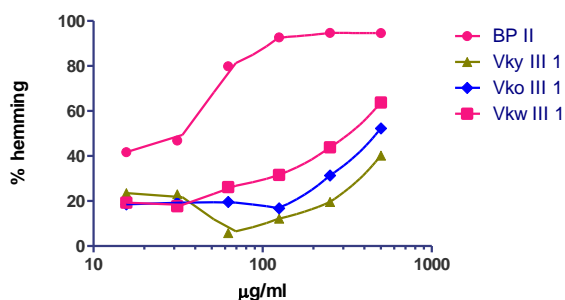
Figur 5.11 Komplementfikserende aktivitet til V_k III fraksjonene med BP II som positiv kontroll

V_k III 1 fraksjonene

V_k III 1 fraksjonene har sitt opphav etter degradering av V_k III-fraksjonene med inulinase. Nedbrytning av inulin førte til reduksjon av fruktose med 79,4 %, 81,2 % og 83,1 % for henholdsvis V_{ky} III 1, V_{ko} III 1 og V_{kw} III 1. Den komplementfikserende aktiviteten etter reduksjon av fruktose er noe lavere enn før reduksjonen, (Tabell 5.14 og 5.15). Det antas imidlertid at denne forskjellen ikke betyr mye og at det likevel ikke tyder på at inulinen interferer på den komplementfikserende aktiviteten til fraksjonen.

Tabell 5.15 IC₅₀-verdiene til V_k III 1 fraksjonene. Verdiene er presentert grafisk i figur 5.12

Fraksjon	IC ₅₀ -verdier (µg/ml)
V _{ky} III 1	> 500
V _{ko} III 1	472,5
V _{kw} III 1	326,6
BP II	34,2



Figur 5.12 Komplementfikserende aktivitet til V_k III 1 fraksjonene med BP II som positiv kontroll

OPPSUMMERING

Det ser ut til at V_k I fraksjonene har best komplementfikserende aktivitet uansett opphav. Forskjellene mellom V_k I fraksjonene og de andre fraksjonene er primært det høye innholdet av Ara og Gal og dermed sannsynligvis AG I og II- enheter. Disse enhetene har i flere tilfeller vist biologisk aktivitet. V_k III 1 fraksjonen er hovedsakelig et rent homogalakturonan med lite påvirkning på komplementsystemet. V_k 100 fraksjonene er vandige råekstrakter som inneholder pektiner av både RG-I og homogalakturonan typen, og dette gjenspeiles i dens noe høyere IC₅₀-verdier i forhold til V_k I fraksjonene.

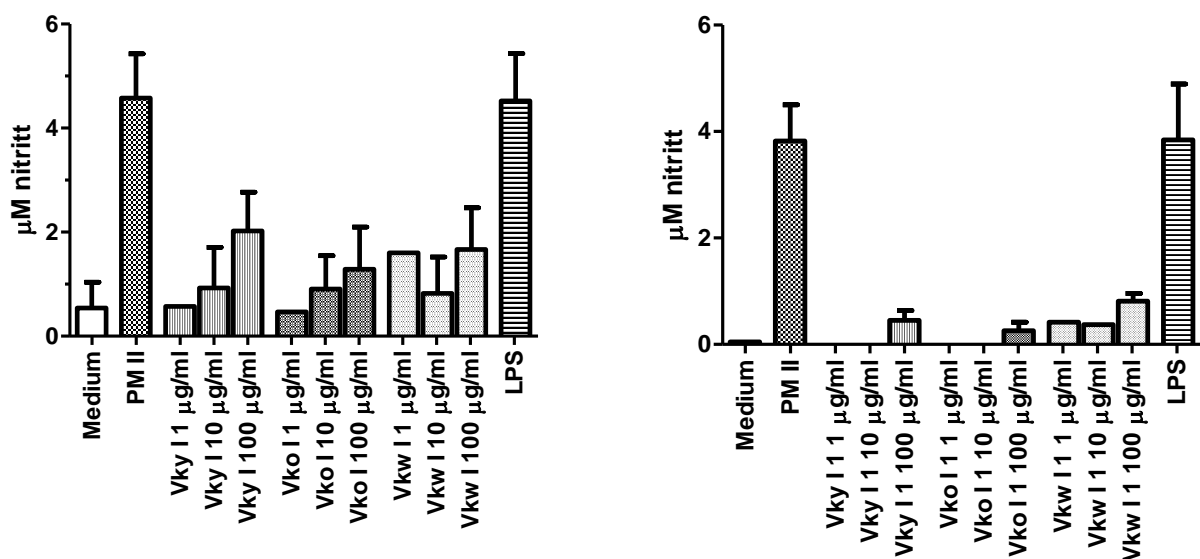
Alle fraksjonene isolert fra V_{ky} har noe lavere komplementfikserende aktivitet i forhold til tilsvarende fraksjoner fra V_{ko} og V_{kw}. Dette kan skyldes dens noe lavere innhold av monosakkarider typisk for pektiner i forhold til V_{ko} 100 og V_{kw} 100. Disse resultatene viser at de kultiverte røttene er biologisk aktive på lik linje med de ville røttene.

Tidligere studier av planten konkluderer det med at aktiviteten ser ut til å være avhengig av både ytre strukturer og den indre kjernen, (Nergard, et al., 2005b). Tap av homogalakturonanenheten har vist å redusere aktiviteten, mens reduksjon av arabinose-enheter ikke har påvirket aktiviteten.

5.4.2. Aktivering av makrofager

Alle fraksjonene isolert fra *V. kotschyana* i denne studien ble testet for deres evne til å aktivere makrofager ved å måle NO-frigjøring.

Ved aktivering av makrofager produseres det en rekke cytokiner og radikaler, som blant annet nitrogenoksid (NO). NO brytes ned til nitritt som er et stabilt nedbrytningsprodukt som kan påvises ved bruk av Griess-reagenser. En standardkurve med ulike konsentrasjoner av nitritt ble benyttet for å beregne frigjøringen av nitritt fra prøvene.



Figur 5.13 Måling av NO-frigjøring ved makrofag aktivering ved tilsetning av fraksjonene Vk I og Vk I 1.

Makrofager fra muscellelinjen RAW 264,7 ble benyttet og aktiviteten ble sammenlignet med de positive kontrollene lipopolysakkarid (LPS) og pektinet PM II, fra *Plantago major*. Både LPS og PM II er vist å være gode makrofagstimulatorer. Kun resultatene fra Vk I og Vk I 1 fraksjonene er presentert grafisk, (Figur 5.13). Resterende fraksjoner viste ingen aktivitet. For Vk I fraksjonene ser det ut til å være en doseavhengig NO-frigjøring, men denne er ikke signifikant for noen av fraksjonene. Som nevnt tidligere har Nergard undersøkt fraksjonene Vk100A2a og Vk100A2b som likner henholdsvis Vk I og Vk III 1 for deres evne til å frisette NO. Fraksjonene viste ingen evne til å aktivere makrofager, (Nergard, et al., 2004)

Vk I 1 fraksjonene (figur 5.13) viser lavere aktivitet i forhold til Vk I fraksjonene. I følge GC-resultatene var det nærmest ingen forskjell i monosakkaridinnhold mellom fraksjonene. Forskjellen i aktivitet kan muligens skyldes en endring i molekylets konfigurasjon under degraderingsprosessen. Det ble blant annet benyttet en pH på 4,2, noe som kan ha ført til endringer på strukturen. Den sure pH'en kan videre ha ført til at noen uronsyrer er blitt spaltet av. Det forekom ingen endringer i GalA-innholdet etter degraderingen, men de kan ha blitt spaltet av som oligomere, og dermed ikke blitt fjernet ved dialyse.

5.5. Etnofarmakologiske studier i Mali

5.1.1. Etnofarmakologi

Begrepet etnofarmakologi er relativt nytt. Det er 43 år siden det ble introdusert for første gang, som tittelen på en bok. Det ble opprinnelig brukt om nytteforholdet mellom mennesker og planter. Det har siden fått en nyere definisjon hvor det er snakk om forskning på fysiologisk aktivitet hos planter, dyr og andre substanser som er blitt benyttet i tradisjonell medisin både i tidligere og nyere kulturer, (Heinrich, M., 2003). Etno- referer til mennesker eller kultur, mens farmakologi omhandler medisin.

Etnofarmakologiske studier innebærer ofte feltarbeid hvor man søker tradisjonell medisinsk kunnskap.

Tradisjonell kunnskap er kunnskap som tilhører en lokal befolkning som er blitt utviklet over tid og er i stadig utvikling. Kunnskapen tilhører hele samfunnet, men det er likevel bare noen som er bærer og utfører slik kunnskap i samfunnet. Kunnskapen videreføres ofte til verdige personer. Denne kunnskapen kan være alt fra hvilke planter som vokser best sammen, oppbevaringsmetoder, innhøstningstidspunkt, hvilke planter skal benyttes til hvilken sykdom og i hvilken styrke, (Hansen, S. A og Vanfleet, J.W., 2003).

5.5.2. Mali

Mali er et vest-afrikansk land omringet av sju naboland, blant annet Algerie, Senegal, Niger og Mauritania. I 2010 feiret landet 50 års uavhengighets jubileum etter fransk kolonisering, sammen med en rekke andre afrikanske land. I dag blir landet regjert etter demokratiske prinsipper hvor dagens president

Amadou Toumani Toure, valgt i 2002, avskaffet diktaturet i 1991.

Landet er det 24. største i verden med sine 1 240 192 km², det har ingen kystlinje, men har blant annet elvene Niger og Senegal som sørger for frodige områder i sør.



Det lever over 14 millioner mennesker i Mali og regnes som et av de 25 fattigste land i verden. Økonomien i landet er basert på jordbruk og gruvestarbeid, men dette er ikke nok til å reise landet fra fattigdom, hvor landet fortsatt er avhengig av ytre hjelpeorganisasjoner. Landet er delt inn i tre geografiske områder Sør-Mali, fruktbar region, og det er her hovedstaden Bamako befinner seg. Sentral-Mali, definert som halv-tørr, steppe område og Nord-Mali, del av Sahara, (CIA, 2011).



5.5.3. Tradisjonell medisin i Mali

Tradisjonell medisin i Mali og i mange utviklingsland er fortsatt av stor betydning for behandling av helserelaterte problemer. Til tross for økt tilgang til konvensjonell medisin er den fortsatt for dyr for den maliske befolkningen, hvor omtrent 80 % benytter tradisjonell medisin for primære helsebehov. Her er det billigere konsultasjon og behandlingsmateriale i forhold til den konvensjonelle. I noen tilfeller blir ikke healeren betalt verken for konsultasjon eller behandling, men lever på gaver fra lokalsamfunnet.



I Mali har healere en anerkjent posisjon i lokalsamfunnet, og ved slutten av 60-tallet kunne healere bli offisielt registrert som tradisjonelle healere ved instituttet for tradisjonell medisin (DMT). Samarbeidet mellom DMT og healere har vært nyttig for begge parter. Healere har ved ønske delt sin kunnskap med DMT og fått sine medisinblandinger undersøkt i forhold til farmakologiske, toksikologiske og fytokjemiske analyser. Dette har ført til økt kjennskap til

flere medisinske planter og ført til produksjon av 12 forskjellige ”naturlegemidler”. Disse er blant annet;

Balembo – Mot hoste

Dysenterial – Mot dysenteri

Gastroседal – Mot mage-tarm sår

Hepatisane – Mot hepatitt

Laxia-cassia – Mot forstoppelse

Malarial – Mot malaria



DMT har i tillegg til registrering av healere andre oppgaver som

registrering av tradisjonell kunnskap og medisinske planter, drive forskning og utvikle ”naturlegemidler” fra lokale planter, (Togola, et al., 2005).

5.5.4. Feltarbeid

Plantasje: Banancoroni

Jordbruker: Bréhimia Diallo

Ved denne plantasjen dyrkes det i tillegg til *V. kotschyana* en rekke andre planter, blant annet mango, papaya og sitron.

V. kotschyana frø som ble benyttet var distribuert av DMT. I denne plantasjen ble frøene sådd 1. august 2010 i et område på 108,8 m². Plantasje-jorda var av den rødaktige og harde typen. Jorda ble derfor bløtgjort med vann før det ble gravd dype hull, på ca. 50 cm bredde, hvor frøene ble sådd. I Mali er det regnesong i månedene juni til november. Dette letter vanningsarbeidet, hvor *V. kotschyana* plantene kun ble vannet av regnvann. Ugress ble fjernet kun én gang under oppveksten av *V. kotschyana*. I tillegg til mye vann trenger plantene mye sol. Dette fører til at jorda var hard ved innhøstning. Innhøstningen var arbeidskrevende fordi jorda ble hakket opp for å trekke opp røttene. Plantene ble innhøstet på to tidspunkt, 19. desember og 26. desember 2010. Det betyr en modningsprosess på nesten fem måneder. Det er viktig at planten har fått nye frø før de høstes, derfor må de forbli i jorda i minst 4,5 måned.

Etter innhøstning ble røttene vasket, kuttet i små biter og tørket. De ble tørket i 20 dager ved 20-25 °C. Ferske røtter av *V. kotschyana* veide 110 kg, mens utbyttet av tørkede røtter var på 30 kg. Det ga et ubytte på 27,3 %.

Plantasje: Donéguébougou

Jordbruker: Koniba Niaré

Frøene som ble benyttet kommer fra DMTs plantasje. Frøene ble sådd 20. august 2010, og var fortsatt ikke innhøstet under besøket 23. januar 2011. De ble sådd i et område på 0,5 hektar, 5000 m². Frøene ble plantet i rader istedenfor hull slik det ble gjort i Banancoroni. Plantene ble kun vannet med regnvann. Radene letter drenering av overflødig vann. For mye vann kan føre til at spirene ikke klarer å presse seg gjennom den leirete jorda. Det ble ikke fjernet ugress i løpet av vekstperioden.

Siden plantene fortsatt ikke var blitt innhøstet ble det derfor trukket opp røtter fra et område på 0,5 m². Røttene som ble innhøstet veide 600 g. Senere ble de vasket, kuttet opp i små biter og tørket på hustaket ved 35 °C i to døgn. Utbyttet av tørkede røtter veide 260 g. Dette er et utbytte på 43,3 %. Det høye utbyttet tyder på at røttene ikke var fullstendig tørre. Røttene ved plantasjen er fortsatt ikke innhøstet per dags dato, 10.07.2011.





Plantasje: DMT

Jordbruker: N'Golo Balo

Området som benyttes på DMT for *V. kotschyana* er på 70 m*20 m. Frøene plantes i rader hvor den opphøyde delen er 20-40 cm høy og 20-40 cm bred. Avstanden mellom radene er på 0,5 m. Frøene blir sådd i juni-juli månedene. Innhøstningen forekommer etter 3 til 4 måneder. Noen planter innhøstes noe senere for at frøene skal modnes. Plantene vannes ikke, det er kun regnvann som benyttes. Perioder med mye vann skaper problemer;

1. Råtne frø.
2. Spirer klarer ikke å trenge seg gjennom den tunge jorda.

Problemer med mye vann og tomme frø gjør det nødvendig å så store mengder frø for å få et brukbart utbytte, omtrent 50 kg frø per hektar.

Tørkeprosessen kan ta opptil én måned innendørs, men 15-20 dager i sola.

I 2010 ble utbytte på 6-8 tonn/hektar ferske røtter, men kun 1-2 tonn/hektar tørkede røtter.

Det påstås at det oppnås røtter med bedre morfologi når de plantes i rader i forhold til i hull.

6. KONKLUSJON

Målet med oppgaven var å sammenligne monosakkaridsammensetning og struktur, samt biologisk aktivitet av polysakkarider isolert fra kultiverte og ville røtter fra *Vernonia kotschyana*. Det ble i tillegg utført etnofarmakologiske studier i Mali rundt kultivering av *V. kotschyana*.

Det ble ved hjelp av kromatografiske metoder og enzymatiske degraderinger opparbeidet ulike polysakkaridfraksjoner. Karbohydratsammensetningen ble analysert ved metanolyse, TMS-derivatisering og gasskromatografi, mens bindingsmønsteret til de ulike monosakkaridene ble bestemt ved metylering, reduksjon med NaBD₄ og acetylering. Polysakkaridenes evne til å fikserer komplement, samt å aktivere makrofager ble undersøkt.

Råekstraktene, V_k 100 fraksjonene, viste seg å inneholde polysakkarider av pektin typen basert på monosakkaridsammensetningen. I tillegg inneholdt fraksjonene store mengder fruktose i følge PABR-testen.

V_k I fraksjonene inneholder gjennomsnittlig 43 mol % arabinose, 8,8 mol % rhamnose, 29 mol % galaktose og 17 mol % galakturonsyre. Arabinosen befinner seg både lineært 1→5 bundet og forgrenet 1→3,5 bundet i tillegg til terminal arabinose. Galaktosen foreligger primært som 1→3,6 bundet, 1→4 bundet, samt noe terminalt. Galakturonsyren finnes kun som 1→4 bundet, og all rhamnosens er 1→2 bundet med galakturonsyre. Det ble funnet forgreningspunkt hos rhamnosens i C4 posisjon.

Fraksjonene gav utfelling med Yariv-reagens noe som tyder på tilstedeværelse av arabinogalaktan type II. Fraksjonene inneholder videre litt glukose og fruktose som stammer fra inulin. Årsaken til tilstedeværelse av inulin i denne fraksjonen skyldes antageligvis koelivering av kovalent bundet inulin med polymerens sidekjerder. Fraksjonene inneholder proteiner, men det er blitt konkludert med at denne fraksjonen er et arabinogalaktan pektin på grunn av det lave proteininnholdet.

Den komplementfikserende aktiviteten av *V_k I fraksjonene* ble vist å være bedre enn den positive kontrollen BP II, et pektin isolert fra *Biophytum petersianum*, men viste ingen

signifikant aktivering av makrofager. Det antas at fraksjonens komplementfikserende egenskaper skyldes dens innhold av arabinogalaktaner.

Vk I 1 fraksjonene ble opparbeidet etter enzymdegradering av *Vk I* fraksjonene med α -L-arabinofuranosidase fra bifidobakterier uten signifikant reduksjon av arabinose-enheter. Enzymet som ble benyttet hadde liten spesifisitet for typen arabinaner i *Vk I* fraksjonene. Det er derfor ingen store forskjeller i monosakkaridsammensetningen mellom *Vk I* og *Vk I 1*. Fraksjonene viste også gode komplementfikserende egenskaper på lik linje med *Vk I* fraksjonene, men dårligere makrofagstimulerende aktivitet. Det antas at en konformasjonsendring fant sted ved den lave pH'en ved enzymdegradering.

Vk III fraksjonene består av 71,4 mol %, 83,4 mol % og 66,3 mol % galakturonsyre for henholdsvis *Vky III*, *Vko III* og *Vkw III*. Galakturonsyren befinner seg som 1 \rightarrow 4 bundet. Fraksjonen inneholder mye fruktose som er 1 \rightarrow 2 bundet, samt glukose. Disse enhetene antas å stamme fra inulin. *Vk III* fraksjonene viste lavere komplementfikserende aktivitet i forhold til *Vk I* fraksjonene. *Vkw III* viste lavest IC₅₀-verdi på 239,4 μ g/ml sammenlignet med *BP II* på 34,2 μ g/ml. Fraksjonene viste ingen effekt på makrofagstimulering.

Vk III 1 fraksjonene ble opparbeidet etter enzymdegradering av *Vk III* fraksjonene med *endo*- og *exo*inulinase, og 79,4 %, 81,2 % og 83,1 % av glukoseinnholdet ble redusert for henholdsvis *Vky III 1*, *Vko III 1* og *Vkw III 1* i forhold til deres tilsvarende *Vk III* fraksjoner. Fraksjonen består i likhet med *Vk III* hovedsakelig av GalA-enheter, men med noe høyere andel GalA. Den komplementfikserende aktiviteten ligger omtrent på samme nivå som for *Vk III* fraksjonene.

Tre plantasjer som dyrket *V. kotschyana* ble besøkt under oppholdet i Mali.

Dyrkningsmetoden var forskjellig på to av stedene. Ved Banancoroni-plantasjen ble *V. kotschyana* dyrket i dype hull i jorden, mens ved Donéguébougou- og DMT plantasjene ble plantene dyrket i regelmessige rader. Det er fortsatt ikke klarlagt hvilken forskjell de ulike metodene utgjør for plantene, men det kan tyde på at planter dyrket i rader fikk et morfologisk bedre utseende enn de som ble dyrket i groper. Videre studier er derfor nødvendig.

På bakgrunn av studiene kan man konkludere med at de kultiverte røttene er biologisk aktive på lik linje med de ville røttene selv om det forekommer noen små ulikheter i karbohydratsammensetningen.

7. REFERANSELISTE

- Aulton, M.E. (2007)
Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines, 3. utgave,
Churchill Livingstone, Edinburgh
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin, A. (2011)
Plant Cell Walls: from chemistry to biology, Garland Science, New York
- Bio-Rad (2011)
Bio-Rad Protein Assay, Aksessert 06.07.2011, http://www.molbiotech.uni-freiburg.de/km/lehre/kurs/Genkurs_2009/biorad_assay_short.pdf
- Boratyński, J. (1984)
Colorimetric Method for Determination of Ketoses Using Phenol-Aceton-Boric Acid
Reagent (PABR)
Analytical Biochemistry (137) s. 528-532
- Bradford, M.M. (1967)
A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of
Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Analytical Biochemistry (72) s. 248-254
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Russel, L.J. (2000)
Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant
Physiologists, Rocville, Maryland
- Burkhill, H.M. (1985)
The useful plants of West Tropical Africa, Vol. 1, 2. utgave, Royal Botanic Gardens,
Kew, s. 500-501
- Chambers, R.E. og Clamp, J.R. (1971)
An Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of
Carbohydrate-Containing Materials
Biochemical Journal (125) s. 1009-1018
- CIA (2011)
"Central Intelligence Agency - The World Factbook - Mali" Aksessert 06.07.2011,
<https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/ml.html>
- Cui, S.W. (2005)
Food carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications, Boca Raton:
CRC Press
- Deeni, Y.Y. og Hussain, H.S.N. (1994)
Screening of *Vernonia kotschyana* for Antimicrobial Activity and Alkaloids
International journal of pharmacognosy (32) s. 388-395

- Diallo, D., Marston, A., Terreaux, C., Touré, Y., Paulsen, B.S. og Hostettmann, K. (2001)
Screening of Malian Medicinal Plants for Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal,
Antioxidant and Radical Scavenging Activities
Phytotherapy research (15) s. 401-406
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., og Smith, F. (1956)
Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances
Analytical chemistry (28) s. 350-356
- Evjenth, R.K. (2007)
Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra *Opilia cetidifolia* – en
medisinplante fra Mali, Etnofarmakologiske studier i Mali
Hovedfagsoppgave for graden Cand. Pharm., Farmasøytisk institutt, Universitetet i
Oslo
- GE Healthcare (2011)
ANX Sepharose 4 Fast Flow (High sub), Aksessert 06.07.2011,
[http://amershambiosciences.biz/aptrix/upp00919.nsf/Content/B40F547E32960318C1257628001CCE8C/\\$file/18114225AA.pdf](http://amershambiosciences.biz/aptrix/upp00919.nsf/Content/B40F547E32960318C1257628001CCE8C/$file/18114225AA.pdf)
- Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. (1994)
Kromatografi: separasjon og deteksjon, 3. utgave, Universitetsforlaget, Oslo
- Germanó, M.P., De Pasquale, R., Iauk, L., Galati, E.M., Keita, A., Sanogo, R. (1996)
Antiulcer activity of *Vernonia kotschyana* sch. Bip.
Phytomedicine (2) s. 229-233
- Hansen, S. A. og Vanfleet, J. W. (2003)
Traditional Knowledge and intellectual Property.
A handbook s.1-38
- Heinrich, M. (2003)
Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old
diseases or a better understanding of indigenous cultures?
Current topics in medical chemistry (3) s.141-154
- Heinze, T. (2005)
Polysaccharides I: Structure, Characterization and Use, Advances in Polymer Science
186, Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, s. 69-101
- Inngjerdingen, K.T. (2000)
Sårhelende planter i Mali
A. Videre studier over *Glinus oppositifolius*
B. Feltarbeid i Dogonland og Sikasso
Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

- Inngjerdingen, K.T., Debes, S.C., Inngjerdingen, M., Hokputsa, S., Harding, S.E., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2005)
Bioactive peptic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization
- Inngjerdingen, M., Inngjerdingen, K.T., Patel, T.R., Allen, S., Chen, X., Rolstad, B., Morris, G.A., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2008)
Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells
Glycobiology (18) s. 1074-1084
- Isawumi, M.A., El-Ghazaly, G., Nordenstam, B. (1996)
Pollen morphology, floral microcharacters and taxonomy of the genus *Baccharoides* Moench (Vernoniae: Asteraceae)
Grana (35) s.205-230
- Jeong, B. og Housley, T.L. (1990)
Plant Physiology (93) s. 902-906
- Kim, J., Carpita, N.C. (1992)
Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles
Plant Physiology (98) s. 646-653
- Kumar, M.N.V.R. (2000)
A review of chitin and chitosan applications
Reactive and Functional Polymers (46) s. 1-27
- Langøen, A. (1994)
HUDEN- *pleie, pleiemidler og sårbehandling*, Universitetsforlaget, Oslo
- Lawson, L.D. og Bauer, R. (1998)
Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity, ACS symposium series 691, American Chemical Society, Washington, DC
Chapter 12: *Echinacea*: Biological Effects and Active Principles
- Lerouxel, O., Cavalier, D.M., Liepman, A.H., Keegstra, K. (2006)
Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides – a complex process
Current Opinion in Plant Biology (9) s. 621-630
- Maïga, M.Y., Guindo, S., Traore, H.A., Dembele, M., Guindo, A., Kalle, A., Pichard, E. (1995)
Etude épidémiologique des affections oeso-gastro-duodénales au Mali au moyen de la fibroscopie digestive haute. Médecine d’Afrique noire 42, s. 68-72.
- Mbatudde, M., Mucubguzi, P. og Lye, K.A. (2007)
Diversity and distribution of Asteraceae along a rainfall gradient in Uganda
African Journal of Ecology (45) s.52-56

- Megazyme (2011)
 α -L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium* sp. (Lot 31001). Aksessert 10.07.2011,
<http://secure.megazyme.com/downloads/en/data/E-AFAM2.pdf>
- Michaelsen, T.E., Garred, P., Aase, A. (1991)
Human IgG subclass pattern of inducing complement mediated cytolysis on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration.
European Journal of Immunology (221) s. 11-16
- Miller, L.P. (1973)
Phytochemistry, vol. I, Van Nostrand, New York
- Mosser, D.M. og Edwards, J.P. (2008)
Exploring the full spectrum of macrophage activation
Nature Reviews Immunology (8) s. 958-969
- Nergard, C.S., Diallo, D., Michaelsen, T.E., Malterud, K.E., Kiyohara, H., Matsumoto, T., Yamada, H., Paulsen, B.S. (2004)
Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp
Journal of Ethnopharmacology (91) s. 141-152
- Nergard, C.S., Matsumoto, T., Inngjerdigen, M., Inngjerdigen, K.T., Hokputsa, S., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Kiyohara, H., Paulsen, B.S., Yamada, H. (2005 a)
Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. (Asteraceae)
Carbohydrate Research (340) s. 115-130
- Nergard, C.S., Kiyohara, H., Reynolds, J.C., Thomas-Oates, J.E., Matsumoto, T., Yamada, H., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2005 b)
Structure-immunomodulating activity relationship of a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp.
Carbohydrate Research (340) s. 1789-1801
- Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A. (2003)
International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology
Pharmacological Reviews (55) s. 597-606
- Nims, R.W., Darbyshire, J.F., Saavedra, J.E., Christodoulou, D., Hanbauer, I., Cox, G.W., Grisham, M.B., Laval, F., Cook, J.A., Krishna, M.C., Wink, D.A. (1995)
Colorimetric Methods for the Determination of Nitric Oxide Concentration in Neutral Aqueous Solutions
Methods in Enzymology (7) s. 48-54

- Nothnagel, E. A. (1997)
Proteoglycans and Related Components in Plant Cells.
International Review of Cytology (174), s.195-291
- Olsen, B.J.S.C. og Markwell, J. (2007)
Assays for Determination of Protein Concentration
Current Protocols in Protein Science s. 3.4.1-3.4.29
- Paulsen, B. S. (2002)
Biologically active polysaccharides as possible lead compounds
Phytochemistry Reviews (1) s. 379-387
- Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., Doco, T. (2003)
A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest
of a function
Biochimie (85) s. 109-121
- Plantlife (2004)
Herbal harvest with a future: Towards sustainable sources for medicinal plants.
Aksessert 06.07.2011, <http://www.plantlife.org.uk/uploads/documents/Herbal-Harvests-with-a-Future.pdf>
- Pope, G.V. (1988)
Notes on *Vernonia* (*Compositae*) in the Flora Zambesiaca Area
Kew Bulletin (43) 2 s. 279-289
- Puhlmann, J., Zenk, M.H., Wagner, H. (1991)
Immunologically active polysaccharides of *Arnica montana* cell cultures
Phytochemistry (30) s. 1141-1145
- Ricca, E., Calabrò, V., Curcio, S., Iorio, G. (2007)
The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis
Critical Reviews in Biotechnology (27) s. 129-145
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001)
Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling
Phytochemistry (57) s. 929-969
- Sarma, J.V. og Ward, P.A. (2010)
The complement system
Cell Tissue Research (343) s. 227-235
- Saha, B. C. og Bothast, R. J. (1999)
Enzymology of Xylan Degradation
American Chemical Society

- Samuelsen, A.B., Paulsen, B.S., Wold, J.K. (1995)
Isolation and Partial Characterization of Biologically Active Polysaccharides from *Plantago major* L.
Phytotherapy Research (9) s. 211-218
- Sagberg, K.M. (2006)
Nye stoffer med effekt på immunsystemet isolert fra sårhelende planter i Mali
polysakkarider fra *Combretum glutinosum*
Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
- Sanogo, R., Germanó, M.P., De Tommasi, N., Pizza, C., Aquino, R. (1998)
Vernoniosides and an androstane glycoside from *Vernonia kotschyana*
Phytochemistry (47) s. 73-78
- Sanogo, R., De Pasquale, R., Germanó, M.P. (1996)
Vernonia kotschyana Sch. Bip.: Tolerability and Gastroprotective Activity
Phytotherapy research (10) s. 169-171
- Schepetkin, I.A. og Quinn, M.T. (2006)
Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential
International Immunopharmacology (6) s. 317-333
- Seifert, G.J., Roberts, K. (2007)
The Biology of Arabinogalactan Proteins
Annual Reviews of Plant Biology (58) s. 137-161
- Singleton, V.L., Orthoer, R. og Lamuela-Raventós, R.M. (1999)
Analysis of total phenols and other oxidation substates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent
Methods in Enzymology (299) s. 152-178
- Sogn, C. (1998)
Polysakkarider fra *Vernonia kotschyana rot*: Etnobotanikk, kjemi og biologisk aktivitet
Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
- Srikanta, B.M., Siddaraju, M.N., Dharmesh, S.M. (2007)
A novel phenol-bound peptic polysaccharide from *Decalepis hamiltonii* with multi-step ulcer preventive activity
World Journal of Gastroenterology (39) s. 5196-5207
- Togola, A., Diallo, D., Dembélé, S., Barsett, H., Paulsen, B.S. (2005)
Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa) in the regions Doila, Kolokani and Siby
Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine s. 1-9

- Van Holst, G. og Clarke A.E. (1984)
Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion
Analytical Biochemistry (148) s. 446-450
- World health organization (WHO) (2008)
Traditional medicine, Fact sheet N°134. Aksessert 06.07.2011,
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/index.html>
- Yamada, H. (1994)
Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity
Carbohydrate Polymers (25) s. 269-276