

# **Innflytelse av endring i forsøksbetingelse på en komplementfikseringstest: robusthet og reproduserbarhet**



Mehdi Khaledabadi

Mastergradsoppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høst 2011

# **Innflytelse av endring i forsøksbetingelse på en komplementfikseringstest: robusthet og reproduserbarhet**



Mehdi Khaledabadi

Oppgaven ble utført ved Nasjonalt folkehelseinstitutt

Divisjon for Smittevern

Avdeling for Bakteriologi og infeksjonsimmunologi

Veiledere:

Professor Terje Einar Michaelsen

Professor Berit Smestad Paulsen

## Forord

Denne mastergradoppgaven ble utført fra september 2010 til november 2011 ved Nasjonalt folkehelseinstitutt under divisjon for smittevern og avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi.

Jeg ønsker å rette en stor takk til mine veiledere, professor Terje Einar Michaelsen og professor Berit Smestad Paulsen for god faglig oppfølging og praktisk veiledning under arbeidet med masteroppgaven. Deres veiledning bidratt til et lærelikt og spennende år for meg.

Jeg vil også takke Anne Cathrine Vestrheim for god hjelp og oppfølging under komplementfikseringstesten.

I tillegg vil jeg takke alle ansatte på SMBI Avdelingen på Folkehelseinstituttet for praktisk hjelp og for å ha bidratt til at dette har vært en spennende og lærerikt periode.

Jeg vil takke min kjære kone Pouneh og sønnene mine Pouya og Parham som har vært veldig tålmodig og samarbeidsvillig. Det har vært tungt for dem i disse årene og spesielt i perioden som holdet på å skrive masteroppgaven.

Jeg vil rette en stor takk til min faren som døde for noen år siden og takker min mor som støttet meg.

Takker til slutt bestevennen min Frank Elstad som har støtte meg mye under masteroppgaven.

Oslo, november 2011

Mehdi Khaledabadi

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	3
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	4
<b>1. Forkortelser</b> .....	8
<b>2. Sammendrag</b> .....	11
<b>3. Innledning</b> .....	13
3.1 Medisinske planter.....	13
3.1.1. Generelt.....	13
3.1.2. Polysakkarider.....	13
3.1.3. Pektiner.....	14
3.1.4. Pektin strukturelementer.....	16
3.1.4.1. Homogalakturonaner.....	16
3.1.4.2. Arabinaner.....	16
3.1.4.3. Arabinogalaktaner.....	17
3.1.4.3.1. Arabiogalaktan type-I.....	17
3.1.4.3.2. Arabiogalaktan type-II.....	18
3.1.4.4. Rhamnogalakturonan I (RG-I).....	18
3.1.4.5. Rhamnogalakturonan II (RG-II).....	19
3.1.4.6. Xylogalakturonan (XGA).....	20
3.1.5. Polysakkarider med biologisk aktivitet.....	20
3.2. Immunmodulerende aktivitet.....	22
3.2.1. Introduksjon.....	22
3.2.2. Komplementsystemet.....	22
3.2.2.1. Generelt.....	22
3.2.2.2. Aktivering av klassisk vei.....	24
3.2.2.3. Aktivering av alternativ vei.....	25
3.2.2.4. Aktivering av lektinveien.....	25
3.2.2.5. Komplementaktivering/komplementinhibering.....	26

3.2.2.6.	Membrane Attack Complex.....	27
<b>4.</b>	<b>Oppgavens målsetning.....</b>	<b>28</b>
<b>5.</b>	<b>Metoder og materialer.....</b>	<b>29</b>
5.1.	Generelle metoder.....	29
5.1.1.	Hovedmaterialer og utstyr.....	29
5.1.1.1.	Innveing av prøver.....	29
5.1.1.2.	Sentrifuge.....	29
5.1.1.3.	Blanding av løsninger.....	29
5.1.1.4.	Varmeskap med ristepate.....	29
5.1.1.5.	Absorbansmålinger.....	30
5.1.1.6.	Mikrotitterplatter.....	30
5.1.2.	Reagenser.....	30
5.1.2.1.	Destillert vann.....	30
5.1.2.2.	Waler.....	30
5.1.2.3.	PBS.....	30
5.1.2.4.	Veronalbuffer.....	31
5.1.2.5.	Humant serum.....	31
5.1.2.6.	SRBC.....	31
5.1.2.7.	Amboceptor.....	32
5.1.3.	Tillaging av aggregert hlgG.....	32
5.1.4.	HPLC-apparatur med skriver.....	33
5.1.5.	Plantematerialer.....	35
5.1.6.	Programvarer.....	35
5.2.	Biologisk aktivitet av plantepolysakkarider.....	35
5.2.1.	Generell.....	35
5.2.2.	Immunmodulerende aktivitet.....	35
5.2.3.	Komplementfikseringstest (CFT).....	35
5.2.3.1.	Tilberedning av serum til komplementfikseringstest.....	37
5.2.3.2.	Tillaging av antistoff stamløsning.....	38
5.2.3.3.	Tillaging av 1 % saueblodcelleløsning.....	38
5.2.3.4.	Fortynning av prøver og positiv kontroll til komplementfikseringstest.....	40

5.2.3.5.	Titreringskurve for komplementkilde.....	40
5.2.3.6.	Utføring av selve testen.....	42
5.2.3.7.	<b>Beregninger</b> .....	43
	- Lyseringsgrad.....	43
	- % hemming fra ekstrakt.....	43
	- ICH <sub>50</sub> -verdien.....	44
5.3.	LPS og komplementfikseringstest.....	44
5.3.1.	Generell.....	44
5.3.2.	Fabrikantinformasjon.....	45
5.3.3.	Laging av LPS løsning.....	45
5.3.4.	Fjerning av LPS fra testsubstansen.....	45
<b>6.</b>	<b>Resultater og diskusjon</b> .....	46
6.1.	Komplementfikseringstest.....	46
6.2.	Oppbygning av komplementfikseringstesten.....	46
6.3.	Ulike parametere som kan innvirke på Komplementfikseringstesten.....	48
6.4.	Bruk av aggregert IgG som positiv kontroll .....	49
6.5.	LPS og komplementfikseringsaktivitet.....	52
6.5.1.	Utføring av tester.....	53
6.5.2.	Alder på saueblodceller til testen.....	54
	- Brukt gammelt blod.....	54
	- Brukt ferskt blod.....	55
6.5.3.	LPS sin innflytelse på testsubstanser.....	57
6.5.3.1.	Titring av ΔhIgG og BPII (renset) i en LPS bufferløsning (10 ug/ml).....	58
	- Brukt gammelt blod.....	58
	- Brukt ferskt blod.....	59
6.6.	Styrken på risting under testen.....	62
6.7.	Endring i amboceptormengde i komplementfikseringstest.....	64
6.8.	Temperaturendring i komplementfikseringstest sammen med ulike serumkomplementkilde.....	67

6.9.	Forskjell i preinkuberingstid mellom prøvene og komplementserumkilder.....	71
6.10.	Test av ulike saeblod ved ulike hemolysering i forskjellige preinkubasjonstid.....	75
6.10.1.	Sau Nr: 7001.....	75
6.10.2.	Sau Nr: 0024.....	77
6.10.3.	Sau Nr: 6110.....	80
<b>7.</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Videre forsøk.....</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>Referanser.....</b>	<b>87</b>

## 1. Forkortelser

$\alpha$	Alfaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 (karbon nummer 1) har samme konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
Ab	Antistoff
Abs	Absorpsjon
ACV	Anonymisert person for serumkomplementkilde
Ag	Antigen
AGI	Arabinogalaktan type I
AGII	Arabinogalaktan type II
AP	Alternativ komplement aktiveringsvei
Ara	Arabinose
Araf	Arabinose på furanoseform
$\beta$	Betaanomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1(karbon nummer 1) har motsatt konfigurasjon som sukkeret selv (D eller L)
BPII	Biophytum II, fraksjon ble isolert fra <i>Biophytum petersianum</i> Klotzsch
BSA	Bovine Serum Albumin, en bestanddel i Veronal/BSA-buffer
C	Karbonatom
ca	Cirka
CFT	Komplementfikseringstest
CP	Klassisk komplement aktiveringsvei
CR1	Komplement reseptor 1
$\Delta$ hIgG	Aggregert humant IgG
D	D-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon
Da	Dalton
ECG	Anonymisert person for serumkomplementkilde
Fc	Fc-fragment del av antistoff
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
g-verdi	g-kraft ved sentifugering



H <sub>2</sub> O	Vannmolekyl
HCl	Hydrogenklorid
HGA	Homogalkturonan
HPLC	Apparatur for væskechromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
ICH <sub>50</sub>	Konsentrasjon av testsubstans som gir 50 % hemming av hemolyseing av sensibiliserte sauebløscelle
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kD	Kilodalton
L	L-sukker med hydroksylgruppe i kiralt karbon rettet mot venstre når molekylet er tegnet i Fischer- projeksjon
LP	Lektin komplement aktiveringsvei
LPS	Lipopolysakkarid
M	Symbol for molar(itet)
MAC	Membranangrepskompleks (Membrane Attack Complex)
Man	Manose
MASP	Manose assosiert serin protease
MBL	Mannosebindende lektin komplement aktiveringsvei
mg	Milligram (1 milligram er lik 0,001 gram)
min	Minutter
ml	Symbol for milliliter
MK	Anonymisert person for serumkomplementkilde
Mw	Molekylvekt
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaCl	Natriumklorid
nm	Symbol for nanometer
O	Oksygenatom
OD	Optisk tetthet (Optical Density)
PBS	Fosfatbuffersaltvann (Phosphat )
pH	Mål for en løsnings surhetsgrad
PMII	<i>Plantago major</i> fraksjon II
RGI	Rhamnogalakturonan I
RGII	Rhamnogalakturonan II
Rha	Rhamnose
Rhap	Rhamnose i pyranose form
Rpm	Runder per minutt
SRBC	Røde blodcelle fra sau (sheep red blodcelle)
ul	Mikroliter (1 mikroliter = 0,001 milliliter)

ug	Mikrogram
UV	Ultraviolett
V <sub>e</sub>	Elueringsvolum i en kromatografisk kolonne
V <sub>0</sub>	"Void volume", mobilfasenes elueringsvolum i en kromatografisk kolonne
V <sub>t</sub>	Totalvolum av kromatografisk kolonne
VB	Veronalbuffer
XGA	Xylogalakturonan
Xyl	Xylose
XylpT	Terminal Xylose på pyranoseform
$\Pi r^2 h$	Matematisk beregning av volumet til en sylinder
7001, 0024, 6110	Kode for sauer (Saue nummer)
1000 x g	1000 ganger g-kraft ved sentifugering

## 2. Sammendrag

Bruk av tradisjonell medisin har økt betydelig i verden i de siste årene. Spesielt i Afrika, Asia og Latin-Amerika som bruker tradisjonell medisin for å avhjelpe de primære helse relaterte tilstander i befolkningen. Den økende bruk av alternative behandlingsformer ser vi både i utviklingsland og i de industrialiserte land.

Denne masteroppgaven er en metodeoppgave som går ut på laboratoriearbeid og tolkning av resultater og deres betydning når vi endrer forsøksbetingelsene av en komplementfikseringstest.

Vi vil undersøke to plantepolysakkaridfraksjoner som man vet har aktivitet. De er PMII og BPII som allerede isolert og rensset fra *Plantago major* og *Biophytum petersianum* Klotzsch. Disse plantepektinene ble testet sammen mot 3 ulike personer serumkomplementkilder og 3 ulike sauer som kilde for saueblodceller i en in vitro test for å se om de har innvirkning på komplementsystemet. Komplement er en viktig del av immunsystemet. I testen brukes aggregert humant IgG som positiv kontroll for å sammenligne testsubstansenes aktiverende (forbruk) eller hemmende effekt i testen. Aggregert hIgG fungerer som komplement aktiverende.

Komplementfikseringstest er en in vitro screeningstest av polysakkarider i et biologisk testsystem som består av biologiske materialer. I testen brukes tre hovedreagenser, de er:

- 1) humant serumkomplementkilde
- 2) prøvesubstans
- 3) sensibiliserte saueblodceller

I testen innkuberes først prøvesubstansen med serumkomplementkilde og deretter med sensibiliserte saueblodceller. Testen består av flere trinn og vi vil finne ut hvordan ulike trinnene i komplementfikseringstesten har betydning på testresultater.

Prøven kan enten hemme eller aktivere (forbruke) komplementet. I begge tilfeller fører det til reduksjon av hemolysering av saueblodceller.

Aktivitet i systemet måles som % hemming av hemolyse. Testsubstansens aktivitet i  $ICH_{50}$  - verdien (er konsentrasjonen av testsubstans som gir 50 % hemming i testsystemet) måles og sammenlignes med  $ICH_{50}$  - verdien av positiv kontrollen ( $\Delta hIgG$ ). Variasjon i  $ICH_{50}$ -verdiene er observert for alle testsubstansene som ble brukt i forsøkene avhengig av forsøksbetingelser.

Det er observert at både BPII og PMII er like sensitive og de interagerer annerledes med komplementkilden enn aggregert hIgG.

Vi ønsker å se på ulike parametere som kan ha innflytelse på testsystemet noe som gjør at det blir forskjell i resultater. Det vil si hvor robust testen er og hvor mye testresultatene varierer. Vi ønsker å se på om testen er reproduserbar eller ikke.

Vi skal se på

- Ulike saueblodceller i forhold til hverandre
- Ulike serumkomplementkilder
- Alder på saueblodceller (ferskt og gammelt blod)
- Sensibiliseringsgrad (bruker varierende antistoffmengde)
- Ulike hemolysegrader (40, 50 og 60 %)
- Forskjellige preinkubasjonstid.
- Ulike ristehastighet
- Temperaturendring i varmeskapet
- LPS sin virkning

## 3. Innledning

### 3.1. *Medisinske planter*

#### 3.1.1. Generelt

Medisinplanter er fremdeles den viktigste ressurs for et stort flertall mennesker rundt omkring i verden og spesielt i u-land (Grønhaug, T. E, et al., 2008). Mange forskjellige planter har lenge vært kjent for å ha medisinske effekter og har vært brukt i tradisjonelle medisiner (Yamada, H and Kiyohara, H. 2007), til behandling og kurering av forskjellige type sykdommer deriblant sårheling både eksternt og internt. Moderne vitenskap og isolering av aktive virkestoffer viser at disse plantene i mange tilfeller inneholder polysakkarider som er ansvarlige for de biologiske aktiviter (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005. Paulsen. 2002) relatert til immunsystemet ved ulike in vitro og in vivo testanalyser. Disse plantene inneholder komponenter med både høy og lav molekylvekt med effekt på immunsystemet (Grønhaug, T. E, et al., 2011).

Det er ulike deler av planter som brukes. Seks medisinske planter ble undersøkt av Grønhaug og medarbeidere i en studie i Mali i 2008. Disse ble brukt mot malaria, diaré, hepatitt, lungeproblemer, ulike type smerter og dermatitt. Mest brukte plantedeler var blader, røtter og stembark (Grønhaug, T. E, et al., 2008).

#### 3.1.2. Polysakkarider

Polysakkarider (makromolekyler) er naturlig forekommende polymerer av aldoser og/eller ketoser som er bundet sammen gjennom glykosidbindinger. De kalles homoglykaner når bare én type monosakkaridenhet er tilstede og heteroglykan når det er mer enn én type monosakkarid (Rashmi Srivastava and Dinesh K. Kulshreshtha. 1989) med for eksempel 2 og opp til rundt 10 forskjellige typer (Paulse, B.S., Barsett, H. 2005). Polysakkarider er til stede i alle typer organismer, pattedyr, planter og mikroorganismer. Molekylstørrelsen kan variere fra rundt 10 kD og opp til flere millioner (Paulsen 2002). Strukturelt er de en heterogen gruppe av komponenter. De er nøytrale eller sure og kan bestå av repeterende enheter. De kan være lineær eller forgrenet og bli erstattet med ulike typer organiske grupper som metyl og acetyl grupper (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005).

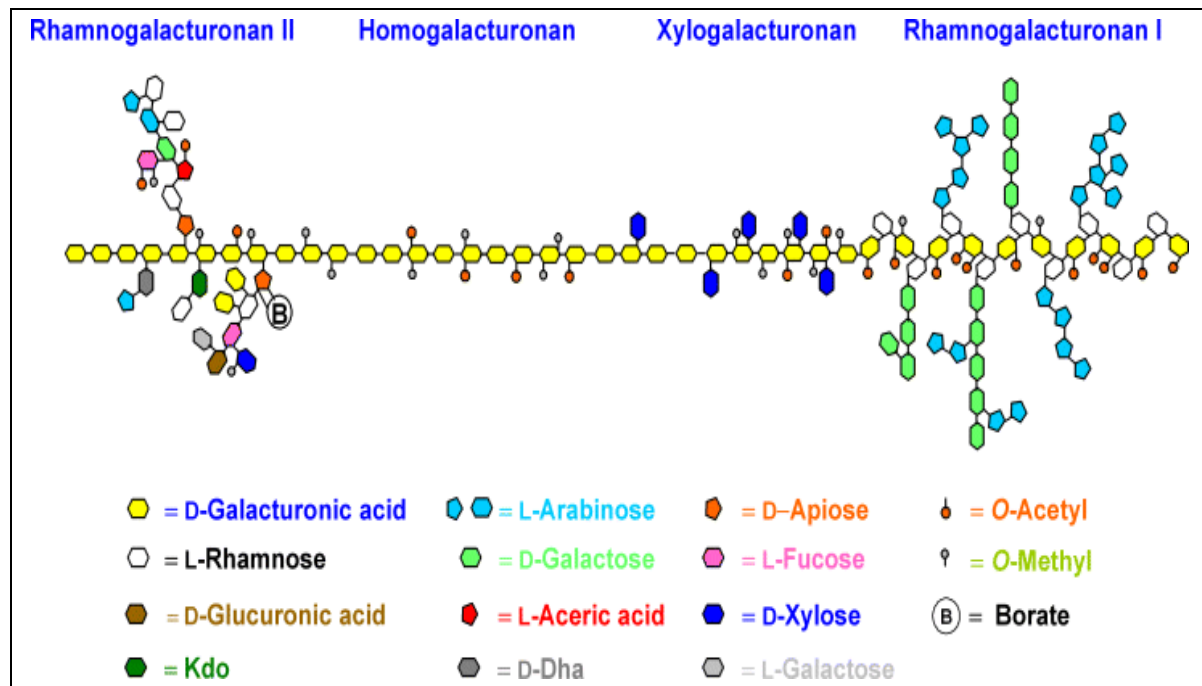
Ulike type polysakkarider isolert fra medisinsplanter viser biologiske aktiviteter av forskjellige typer knyttet til immunsystemet (Grønhaug, T. E, et al., 2011). Ofte er polysakkarider med biologiske aktivitet ladet, det vil si de inneholder uronsyrer, f.eks D-galakturonsyre i pektiske polysakkarider (Paulsen, B.S., Barsett. H. 2005). Forskjellige rapporter viser at mange plante polysakkarider har modulerende effekt på immunsystemet for eksempel komplementsystemet, lymfocytproliferasjon, antistoffproduksjon, makrofagfunksjon og intestinal immunitet (Yamada, H and Kiyohara. H. 2007).

### 3.1.3. Pektiner

Pektiner er en svært sammensatt gruppe av de mest komplekse galakturonsyrerike polysakkarider i naturen. De finnes i den primære celleveggen og mellom cellene i de fleste planter i varierende mengder i form av nøytrale og sure polymerer avhengig av plantekilden. De deles inn i homogalakturonaner, arabinogalaktaner og rhamnogalakturonaner basert på deres karbohydratinhold. Flere nøytrale monosakkarider er vanligvis til stede i disse polysakkaridene. De pektiske polymerer har komplekse strukturer og ble delt inn i to hovedtyper som har heterogene strukturer som rhamnogalakturonan I (RG-I, som er dekorert med sidekjerder av arabinoser og /eller galaktoser) og rhamnogalakturonan II (RG-II), (Paulsen, B.S., Barsett. H. 2005. Paulsen 2002).

Pektiner er generelt multifunksjonelle, sure hetero-polysakkarider med minst tre spesifikke strukturelle domener: HGA, RG-I, og RG-II. De utviser betydelig heterogenitet både med hensyn til kjemiske strukturer og molekylvekt som er i størrelsesorden på 100 kDa (Perez. S, et al., 2003). Pektin kan være sammensatt av så mange som 17 forskjellige monosakkarider med mer enn 20 forskjellige bindinger (Voragen, A. G. J, et al., 2009). De er generelt kjent for å være sammensatt av lineær (1 → 4)- $\alpha$ -D-galakturonan regioner, nemlig såkalte glatte galakturonregioner som hovedkjede og ramified regioner såkalte "hårete" regioner som består av en rhamnogalakturonan hovedkjede substituert med sidekjerder rik på nøytralt sukker som arabinogalaktan, arabinan, galaktooligosakkarider og arabino-oligosakkarider (Yamada, H. and Kiyohara., H. 2007).

En skjematisk fremstilling av sammensetningen av disse strukturelle elementene er gitt i figur 3.1 (Scheller, H.V, et al., 2007). Perez et al., 2003 og Mohnen Debra, 2008 har også foreslått lignende skjematisk struktur av pektin.



**Figure 3-1: Skjematiske struktur av pektin.** Figuren illustrerer de fire forskjellige domener av pektin som finnes overalt. Den relative mengden av ulike typer pektin varierer, rhamnogalakturonan I (RG-I) og homogalakturonan er viktige komponenter, mens xylogalakturonan og rhamnogalakturonan II (RG-II) er mindre viktige komponenter. Mange ulike varianter finnes særlig på sidekjeder av RG-I. (Scheller, H.V, et al., 2007).

Ut fra figuren ses at pektin består av mange polysakkarider inkludert homogalakturonan, xylogalakturonan, rhamnogalakturonan I med arabinan, galaktan og arabinogalaktansidekjeder og rhamnogalakturonan II (Hotchkiss, A. et al., 2009) som kan variere betydelig i hårete område (Vincken, J. P, et al., 2003).

For å forstå de mange funksjonene av pektinfraksjoner er det viktig å kjenne deres kjemiske strukturer. De viktigste kjennetegnene ved pektiner er galakturonsyreinnholdet, nøytrale sukker sammensetning, mengde og fordeling av metylestere og acetylgrupper og deres molekylvekt. I tillegg kan forholdet mellom glatte og hårete regioner, lengde og kjemiske struktur på den nøytrale sidekjeden og fordelingen av de ulike subenheter over ryggraden påvirker pektines egenskaper (Voragen, A. G. J, et al., 2000).

Noen pektiner får mer og mer interesse for deres helsefremmende aktiviteter (Voragen, A. G. J, et al., 2009) og tidligere studier fra Yamada viste at pektiner har en rekke farmakologiske effekter slik som immunstimulerende, anti-sår, kolesterolreducerende effekt (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005), kreftreducerende og stimulerende på immunresponsen (Mohnen, D. 2008).

### 3.1.4. Pektin strukturelementer

Pektiner deles vanligvis inn i nøytrale og sure polymerer, men visse strukturelle trekk er felles mellom ulike typer pektinstoffer (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005).

#### 3.1.4.1. Homogalakturonaner

Homogalakturonan (HG) er den mest tallrike og største typen av en lineær pektisk polysakkarid med  $\alpha$ -1,4-bundet galakturonsyre (GalA) i ryggraden. Den utgjør  $\sim$  60- 65 % av pektin mengden i plantecelleveggen. HG-lengden i ryggraden varierer i ulike pektiner. Den minste estimerte lengder anslått å være på ca. 72–100 GalA residuer.

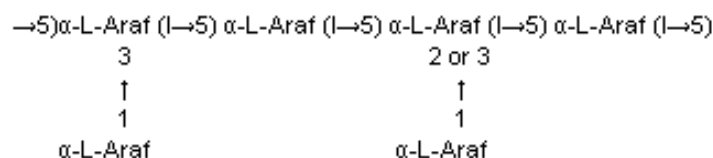
GalA fraksjoner innenfor ryggraden kan være metyl-forestret på C-6 og/eller O-acetylert på O-2 og/eller O-3, men graden av methyl-esterifisering og acetylering varierer mellom ulike kilder. Skjematisk struktur er vist i figur 3.2 (Voragen, A. G. J. et al., 2009. Mohnen, D. 2008. Caffall, K. H., et al., 2009).



Figur 3.2: Foreslått struktur for homogalakturonan (Mohnen, D. 2008).

#### 3.1.4.2. Arabinaner

Arabinaner funnet i planter består i utgangspunktet av repeterende 1,5-bundet  $\alpha$ -L-arabinofuranosider (Araf) i ryggraden. De kan være lineære eller forgrenede avhengig av kilden de kommer fra. Arabinaner er vanligvis substituert med  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$ 2)-,  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$ 3)- og/eller  $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Araf-(1  $\rightarrow$ 3)- sidekjeder. Det er ikke klart at arabinaner eksisterer slik i naturen. Arabinaner er mest sannsynlig bundet til galaktaner og blir en del av arabinogalaktanstrukturer i pektinkomplekset eller indirekte knyttet til pektinstoffer festet i ryggraden gjennom små galaktaner. Skjematisk struktur er vist i figur 3.3 (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005. Voragen, A. G. J, et al, 2009. Mohnen, D. 2008).



Figur 3.3: Forslag til struktur for en del av en arabinan (Paulsen, B.S., Barsett, H, 2005).



### 3.1.4.3. Arabinogalaktaner

Arabinogalaktaner er normalt relativt store sidekjeder presentert på rhamnoseenheter av rhamnogalakturonaner (Inngjerdingen, K.T, et al., 2005). Mange planter er rike kilder til disse polysakkarider som er distribuert i hele planteriket (Togola, A. et al., 2007).

Arabinogalaktaner er klassifisert inn i tre store strukturtyper: De er

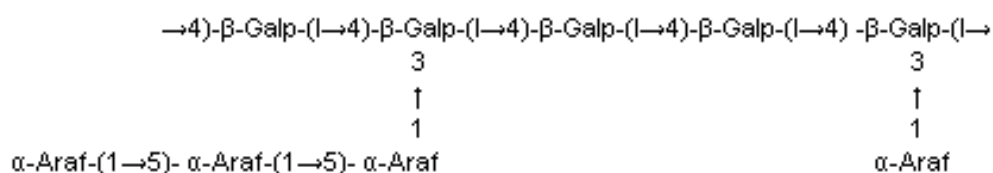
- 1) Arabino-4-galaktaner, AGI
- 2) Arabino-3,6-galaktaner, AGII
- 3) Polysakkarider med arabinogalaktan sidekjeder. Såkalt ekte pektin.

AG-I og AG-II finnes i den hårete regionen av pektiner (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005. Yamada, H. and Kiyohara. H. 2007). Den viktigste strukturelle forskjellen mellom disse to typene er at galaktoseenheterne i utgangspunktet er (1→4) bundet i AG-I og (1→3) og (1→6) bundet i AG-II typene (Paulsen, B.S. 2002).

Det er rapportert at mesteparten av arbinogalaktaner som viser biologisk aktivitet liksom immunmodulerende aktivitet, anti-komplementær aktivitet og intestinal immunsystemmodulerende aktivitet tilhører arabinogalaktan type II (Paulsen, B.S. 2002. Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007).

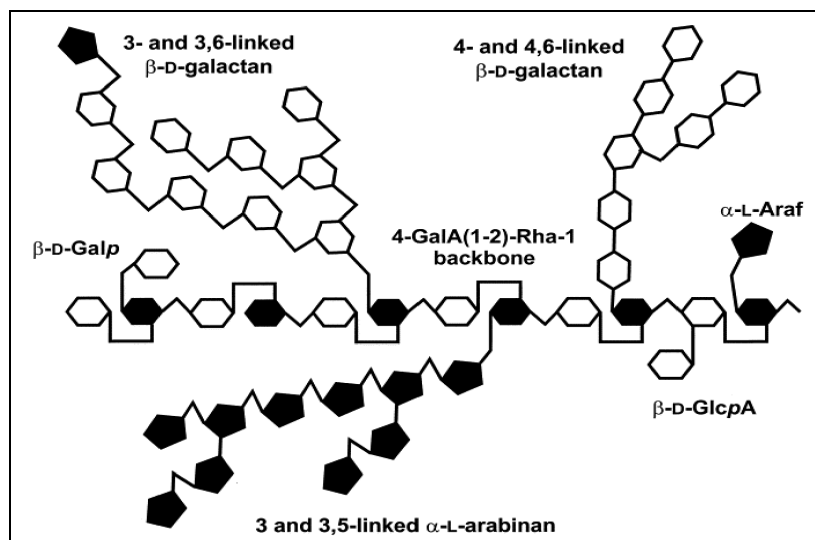
#### 3.1.4.3.1. Arabiogalaktan type-I

Arabiogalaktan type-I består av repeterende galaktoseenheter knyttet sammen via  $\beta$ -(1→4)-D-Galp i hovedkjeden. Arabinaner med intern - (1→5)- $\alpha$ -L-Araf forgrenet via 1,3 - $\beta$ -D-Galp til hovedkjeden (Voragen, A. G. J, et al., 2009). AG-I er den mest tallrike RG-I assosiert AG i pektin komplekser (Caffall, K. H and et al., 2009). Figur 3.4 viser forslått struktur av AG-I.



Figur 3-4: Arabinogalaktan I struktur.



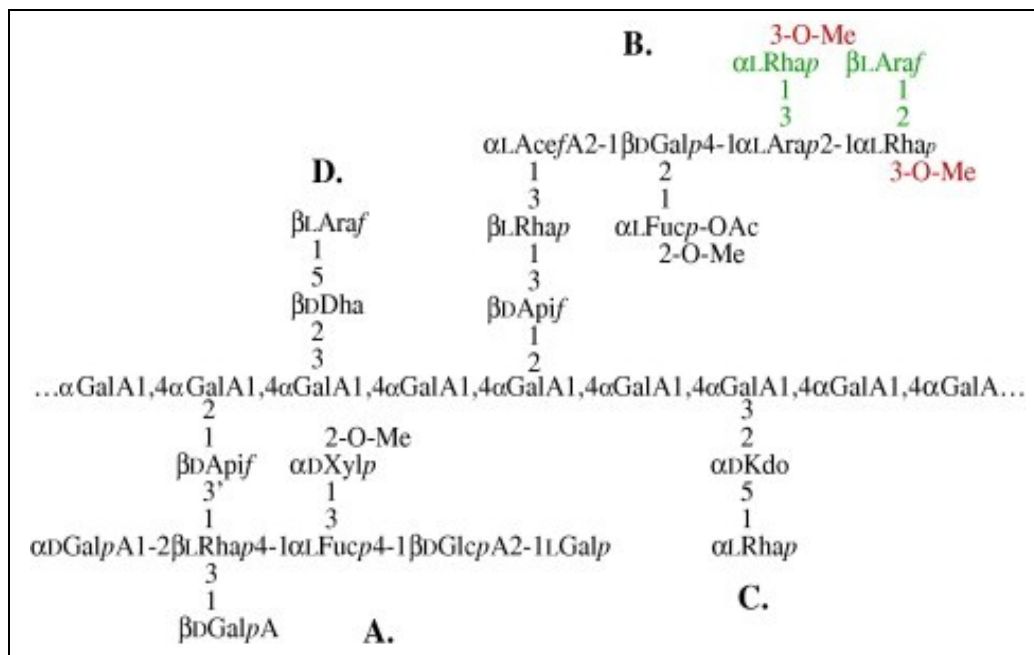


**Figur 3.6:** En modell som viser de store strukturelle trekk ved **rhamnogalakturonan I**. Hovedkjeden er sammensatt av disakkarid repeterende enhet  $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}-(\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}-(1 \rightarrow)]$ . Forgrenede og lineær oligosakkarider består hovedsakelig av  $\alpha\text{-L-Araf}$  og  $\beta\text{-D-Galp}$  residuer er knyttet til C4 av noen av Rhap rester. Noen av Rhap rester kan også være O-acetyllert på C2 og / eller C3. Mer enn ti glycosyltransferase aktiviteter nødvendig for biosyntesen av RG-I (Brent, L., et al., 2000).

#### 3.1.4.5. Rhamnogalakturonan II (RG-II)

Rhamnogalakturonan II polymeren er en del av pektinkomplekset i plantecelleveggen som utgjør en liten del av den totale mengden av pektinet. Hovedkjeden består av 9-10 GalA enheter bundet via  $\alpha\text{-D-(1}\rightarrow 4)\text{-GalA}$  til hverandre. RG-II finnes i de fleste planter i den primære celleveggen. Fire (*forskerne mener nå at det er 5 sidekjeder*) forskjellige kompliserte oligosakkarid sidekjeder dekorerer hovedkjeden via 1,3 og 1,4 bindinger til GalA. Det mest karakteristisk delen i RG-II er tilstedværelse av mange sjeldne sukker typer som 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose, apiose, aceric syre, 2-keto-3-Deoxy-D-manno-octulosonic syre (KDO) og 3-Deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric syre (DHA) (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005). Disse sidekjedene er bundet til HG fragmentet på ca.9 GalA residuer (Voragen, A., et al., 2009) og ble anslått at Mw på RG-II er ca. 5-10 kDa (Perez, S., et al., 2003). RG-II utgjør 10 % av pektinet der de forgrenede kjedene består av 12 ulike sukkertyper med mer enn 20 forskjellige koblinger (Mohnen, D., 2008 and Caffall, K. H., et al., 2009).

Det er observert at RG-II kan ha både aktivitet og ikke-aktivitet i ulike planter som har like struktur av RG-II (Inngjerdingen, M., et al., 2008). Noen pektiner har egenskaper av biologiskaktivitet (Grønhaug, T.E., et al., 2011) og flere av disse polymerene har effekt på makrofager, T-lymfocytter og NK-celler (Grønhaug, T.E., et al., 2009).



**Figure 3.7:** Strukturen for rhamnogalakturonan II funnet i veggene i planter. Residuene vist i grønn tekst er de som ikke er til stede i RG-II av arabidopsis og nært beslektede arter. Modifikasjoner vist i rød tekst er de som er tilstede i RG-II av Pteridophyte og Lycophyte arter. Tilpasset fra O'Neill et al, (2004) (Caffall, K. H., et al., 2009).

### 3.1.4.6. Xylogalakturonan (XGA)

Xylogalakturonan (XGA) er homogalakturonan som er substituert med  $\beta$ -D-Xylp-(1  $\rightarrow$ 3) enkelte enhetssidekjeder (Voragen, A. G. J., et al., 2009). Det har blitt foreslått av Vincken og medarbeidere at XGA ikke er en integrert del av den pektiniske hovedkjeden, men foreslått at den kan være en sidekjede av RG-I, mens Perez og medarbeidere indikerer at den er en del av hovedkjeden i pektiner (Inngjerdingen, M., et al., 2008).

### 3.1.5. Polysakkarider med biologisk aktivitet

Ulike karbohydrater (polymerer) har i løpet av de siste 10 årene vist seg å være ansvarlige for mange biologiske effekter, enten ved direkte effekt eller ved å fremkalle effekter via kompleks reaksjonskaskader. Polymerer med biologiske aktiviteter er ofte ladet med uronsyrer, f.eks D-GalA i pektiske polymerer (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005. Paulsen, B. S., 2002). Det første rene komplekspolysakkarid som viste biologisk aktivitet ble isolert i 1984 i følge Yamada et al., (Grønhaug, T.E., et al., 2009).

For å forstå den biologiske aktiviteten av pektiske polysakkarider på et molekylært nivå bør følgende to problemstillinger avklares:

- 1) hva er minimum essensiell karbohydrat struktur for uttrykket av hver biologisk aktivitet og
- 2) hvordan disse polysakkaridene uttrykker biologisk aktivitet (Yamada, H. 1994). Ikke alle pektiske polymerer kan vise biologisk aktivitet. Det må være spesifikke strukturelle aspekter til stede i disse polymerene for å kunne utløse aktivitet (Paulsen, B.S., Barsett, H. 2005).

Ulike farmakologisk aktiviteter har vært observert i pektiske polysakkarider og pektiner fra varmt vannekstrakt av medisinske urter, inkludert Kampo medisiner (japansk urt). Derfor er studier på bioaktive polysakkarider viktige for å belyse effekten av herbal medisiner ( Yamada, H. 2000).

Effekter som ble nevnt tidligere for biologisk aktive pektiner og beslektede polysakkarider fra ulike medisinske planter kan være avhenge av deres kjemiske strukturer. Ulike rapporter viser at de forskjellige aktiviteter skyldes komplekse strukturer innenfor ramified rhamnogalakturonan regionen som er rik på nøytrale sukkersidekjeder av ren arabinaner, ren galaktaner og arabinogalaktanområdene av pektiner fra ulike kilder. Rapporterte aktiviteter synes å korrelere med tilstedeværelse av spesifikke ledd som f.eks  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-galaktankjede,  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-galaktankjede og  $\beta$ -D (1  $\rightarrow$ 3,6)- galaktankjeder og forgrenet 3,5-arabinan (ROS, J.M., et al., 2000 og Inngjerdingen, M., et al., 2008).

Mange rapporter viser at flere farmakologiske aktiviteter for eksempel immunmodulerende aktiviteter kan utløses av pektiske polysakkarider og de er knyttet til immunsystemet, fordøyelsessystemet og andre systemer (Yamada, H og Kiyohara, H. 2007) og karakterisering av pektiske polysakkarider med immunstimulerendeaktivitet ble rapportert fra vest-Afrika i flere artikler (Grønhaug, T. E., et al., 2009).

Plantepolysakkarider består av både lav og høy molekylvekt som kan ha immunstimulerende aktiviteter (Diallo, D., et al., 2002). De virker på immunsystemet og de kalles for immunmodulatorer når komplementsystemet er involvert (Xubo, F., et al., 2006).

Polysakkarider med innhold av uronsyre er funnet å være bedre stimulerende midler enn uronsyrefrie polysakkarider (Rashmi, S. et al., 1989). Medisinske planter med gode og sterke immunegenskaper inneholder betydelige mengder av arabinogalaktaner der AG-II er rapportert som den immunmodulerende aktivatoren (Inngjerdingen, K. T., et al., 2007).

Selv om naturlig pektin har ingen aktivitet, kan fraksjoner av det samme pektinet ha strukturer som gir farmakologiske egenskaper (ROS, J.M and et al., 2000 ) og det er flere rapporter som peker til en mer potent komplementaktiveringsaktivitet av den hårete regionen enn i det tilsvarende opprinnelige pektinet. Dette skyldes trolig en kombinasjon av

rhamnogalakturonankjeden og de nøytrale sukkerkjedene (Inngjeringen, M., et al., 2008. Inngjeringen K. T., et al., 2005). Ramified regionen, som er den mest aktive delen av kjeden står for den antikomplementære aktiviteten blant de strukturelle fraksjonene av pektiner (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007).

## **3.2. Immunmodulerende aktivitet**

### **3.2.1. Introduksjon**

Menneskekroppen har flere forsvarslinjer mot infeksjoner. Det betegnes som immunsystemet og er viktig for overlevelse. Hovedfunksjonen av immunsystemet er å beskytte verten mot smittsomme mikrober. Immunsystemet består av medfødte og adaptive deler. Det medfødte immunforsvaret trer i funksjon først når et patogen angriper kroppen. Den utøver sin funksjon umiddelbart mens det adaptive immunforsvaret slår til dersom det medfødte immunforsvaret ikke klarer å eliminere inntrengere ( Parham, P. 2009). Det medfødte immunforsvaret består av ulike celler og løselige proteiner og bioaktive små molekyler som enten er til stede i biologiske væsker (f.eks, komplement-proteiner) eller som frigjøres fra celler som er aktivert (f.eks chemokiner, bakteriedrepende peptider). Det adaptive immunsystemet har antigen-spesifikke reseptorer uttrykt på T- og B-lymfocytter (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007).

Flere typer plantepolysakkarider med forskjellige strukturer som pektiner, pektiske polysakkarider, hemicellulose-polysakkarider, arabinogalaktan, arabinan, heteroglykan, inulin og  $\beta$ -D-glukan har blitt rapportert å ha immunmodulerende aktivitet. Disse virker både på det adaptive og medfødte immunforsvar (for eksempel komplementsystemet) (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007 og Togola, A., et al., 2007).

### **3.2.2. Komplementsystemet**

#### **3.2.2.1. Generelt**

Komplementsystemet tilhører det medfødte immunsystemet. Det samarbeider blant annet med antistoffer som tilhører det adaptive immunsystemet. Komplementsystemet består av over 20 serumproteiner inkludert 9 komplement komponenter (C1-C9) og deres regulatorer i blodet i en inaktiv form.

Komplement komponentproteiner aktiveres gjennom tre kaskadeveier:

- 1) Den klassiske veien
- 2) Den alternative veien
- 3) MBL-veien (Mannosebindende lektinvei)

(Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007 og Yamada, K. 1994).

Alle tre veiene møtes på C3 nivå (mest tallrike komplement protein som finnes i blodet) som resulterer til dannelsen av aktive produkter som C3a, C3b og videre aktivering til dannelsen av C5a og membranen angrepskomplekset (C5b-9) (Ward, P. A., et al., 2010).

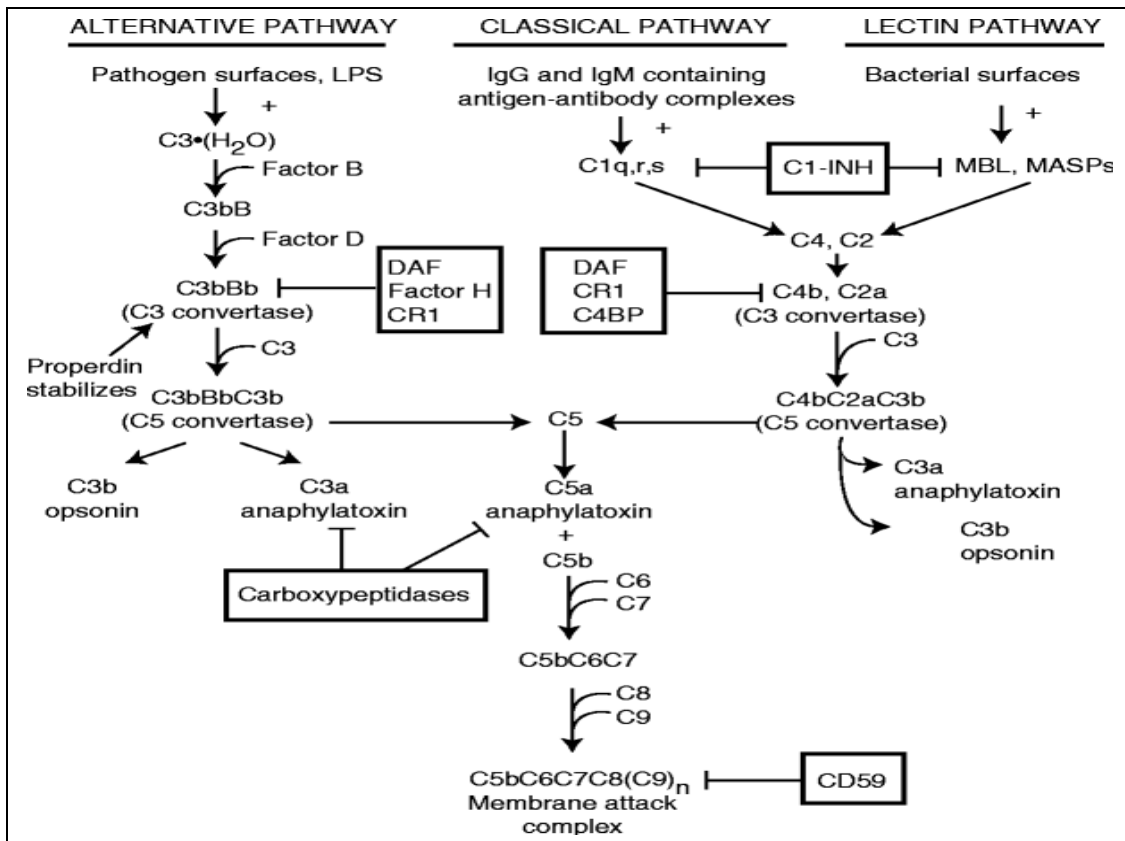
Komplementaktiverende polysakkarider har vist seg å ha effekt på komplementsystemet avhengig av nøytrale karbohydratsidekjeder og rhamnogalakturonan hovedkjeden (Xubo, F., et al., 2006).

En metode for å bestemme den immunologiske aktiviteten til plantepektiner er ved å måle effekten på komplementsystemet.

Generelt når det oppstår en infeksjon i kroppen vil den både alternative og MBL komplementaktiveringsveien bidra til en tidlig forsvarsmekanisme (Yamada, H. og Kiyohara, H. 2007).

Alle disse tre veiene som nevnte over jobber sammen for å produsere C3 konvertases (C3). Proteolytisk spalting av C3 vil produsere C3b og C3a fragmenter. C3b er kjemisk reaktiv og noen av C3b vil kovalent binde seg til patogenoverflaten og merke patogenet for destruksjon. Makrofager har komplementreseptor (CR1) på overflaten som gjenkjenner C3b fragmentene på patogenoverflaten og på den måten opsoniseres patogenet (Parham, P. 2009).

Figuren på neste side viser en skjematisk tegning av de tre forskjellige komplementaktiveringsveier.



**Figur 3.8:** Figuren viser de tre forskjellige komplement aktiverings veier. De er alternative, klassiske og lektin veier. Faktorer som kan hemme veier er angitt i bokser (Ward, P. A., et al., 2010).

### 3.2.2.2. Aktivering av klassisk vei

Den klassiske veien (CP) av komplementaktivering er en del av både medfødt og adaptiv immunitet og krever binding av enten antistoff eller et medfødt immunsystemprotein som kalles C-reaktivt protein til patogenoverflate (Parham, P. 2009).

Den klassiske veien initieres når komplementsystemets komponent C1 (C1) bestående av C1q, C1r og C1s molekyler binder seg til Fc-region delen av IgM eller IgG immunkomplekset (Ag:Ab). Det er C1q delen som gjenkjenner Fc-delen og aktivering av C1r og C1s protease-molekyler oppstår som en konsekvens av C1q binding til Fc-delen av immunglobulinet etterfulgt av andre komplementsystemers komponentaktivering. (0141, P. A., et al., 2010. Yamada, H, 1994).

Aktivert C1s vil spalte videre C4 til C4a og C4b og C2 til C2a og C2b hvor C4b eller C2b kovalent binder seg til patogenets overflate og danner klassiske C3-konvertase (C4bC2a) som aktiverer C3 og spalter den til C3a og C3b fragmenter. Aktivert C3b binder seg til patogenoverflaten og danner alternativ konvertase (C3bBb) som kan aktiveres i alternativ vei (Parham, H. 2009).



### 3.2.2.3. Aktivering av alternativ vei

Komplementaktivering via alternativ veien (Ap) er en av de første responsene ved det medfødte immunsystemet (Parham, P. 2009). Den aktiveres direkte fra C3 (komplement komponent 3) ved mikroorganismer, protozoer og noen aktivatorer som LPS gjennom et antistoffuavhengig mekanisme og etterfølges av ytterligere aktiveringer (Yamada, H. 1994. Yamada, H. og Kiyohara, H. 2007). C3 som dannes i lever har thioester-molekyl på seg som hydrolyseres hele tiden ved lav frekvens i plasma i nærvær av mikroberoverflaten til iC3 eller C3(H<sub>2</sub>O). Faktor B og D kan binde seg til iC3 og merke den. Det dannes en løselig C3 konvertase kalt iC3Bb som deretter aktiverer C3 molekyler og spalter den til C3a og C3b fragmenter. C3b fragmentene binder seg til patogens overflaten. Inaktivert faktor B bindes til C3b og deretter spaltes av faktor D til alternative C3-konvertase (C3bBb). Dette enzymet er svært aktivt og spalter C3 til å produsere mer C3a og C3b fragmenter. De C3b fragmentene kan brukes enten til å danne mer C3 konvertase som forsterker aktiveringen av C3 eller fungerer som ligander for CR1-reseptorer på overflaten av fagocytterende celler (Parham, P. 2009).

### 3.2.2.4. Aktivering av lektinveien

Lektinaktiveringsvei er uavhengig av antistoff, men bruker et kalsiumavhengig lektin (MBL). Lektinvei (LP) komplementaktivering skjer via C4 komplement komponenten. Lektinaktiveringsvei benytter seg av deler av den klasiske aktiveringsveien (Parham, P. 2009). Manosebindende lektin (MBL) sirkulerer i serumet som komplekser med MBL-assosierte proteiner med fire strukturelle beslektete manosebindende lektin-serineprotease, MASPs: 1, 2 og 3 og en avkortet MASP2. Lektinvei (LP) er aktivert når enten manosebindende lektin (MBL) eller fikolin binder seg til manose på karbohydratdelen på overflaten av patogener som for eksempel sopp, bakterier, parasitter og virus. Binding til patogenoverflaten induserer konformasjonsendring som resulterer i autoaktivering av MASP2 som kløyver C4 å danne C4a og C4b fragmenter. C4b festes til overflaten av patogen induserer C2 å binde seg, som igjen spaltes ved MASP2 å danne C2b og C2a fragmenter. C4b og C2a har enzymatisk aktivitet og danner LP C3 Konvertase, C4bC2a, som er lik klassisk C3 konvertase. (Ward, P. A., et al., 2010). C4bC2a spalter C3 komponenten til C3a og C3b fragmenter. C3 merker overflaten for destruksjon og videre danner klassiske C5 konvertase, C4bC2aC3b, som spalter C5 komplementkomponenten i MAC, Membrane Attack Complex (Parham, P. 2009).

### 3.2.2.5. Komplementaktivering / komplementinhibering

Flere anti-komplementære plantepolysakkarider er identifisert og har komplement modulerende aktiviteter. Disse kan enten ha komplementaktiverende eller komplementinhiberende effekt som i begge tilfeller resulterer i redusert hemolyse i et indikatorsystem ved komplementfikseringstestsystemet.

Komplementaktivatorer aktiverer komplementet og forbruker komplementet og dermed reduseres komplementmengden som er igjen og som kan hemolysere sensibiliserte saueblodceller i systemet.

Komplementinhibitorer fører til hemming av et eller flere trinn i komplementaktiveringskaskaden og dermed redusert hemolyse i indikatorsystemet (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007). Så i begge tilfeller observeres komplementfikserende aktivitet. Derfor vil den observerte reduserte hemolysen i komplementfikseringstest være et resultat av både komplementaktivering og inhibering uten å kunne skille mellom disse to mekanismene (Alban, S., et al., 2002 ).

Komplementsystemet er involvert i både immunologisk forsvarsreaksjoner og inflammatoriske responser (Diallo, D., et al., 2002). Komplementaktivering genererer biologisk aktive C3a og C5a komponentfragmenter som har mange biologiske aktiviteter liksom aktivering av lymfocytter og makrofager, regulering av sykliske antistoffproduksjon (Yamada, H. 1994), økning av lokal vaskulær permeabilitet, indusering av opsonisering, degranulering av basofile og mastceller (Alban, S., et al., 1998).

I tillegg til inflammatoriske sykdommer vil overaktiveringen forårsake astma, revmatoid artritt og andre sykdommer (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007).

Siden aktivering av komplementsystemet vil bidra til inflammatoriske responser og immunologiske forsvarsreaksjoner så vil forbruk av komplement ved polysakkarid på grunn av komplementfiksering kunne være en god terapeutiske strategi for behandling av betennelses-sykdommer (Inngjerdningen, K. T., et al., 2005).

Hemming av komplementaktivering i betennelse ville være også en god terapeutiskstrategi for behandling av disse sykdommene (Yamada, H. and Kiyohara, H. 2007).

Aktivering av komplementsystemet spiller en viktig rolle i vertens forsvar mot mange mikrobielle patogener og kan støtte sårheling og til anti-tumorbehandling (Alban, S., et al., 2002).

### 3.2.2.6. Membrane Attack Complex

Det viktigste produktet av komplementaktivering kaskadeveiene er C3b fragmentet. C3b binder til den alternative C3 konvertase og danner alternativ C5 konvertase, C3b2Bb, et enzym som virker på komplement komponent C5. Når C5 binder seg til C3b komponenten av C5 konvertase spaltes den til løselige C5a og C5b fragmenter. Funksjonen til C5b er å initiere dannelsen av et kompleks av forskjellige terminale komplementkomponenter (C5, C6, C7, C8, C9) som kan lage hull i membraner av bakterielle patogener og eukaryoteceller. C5b initierer montering av terminale komplementkomponenter ved å binde til seg C6 etterfulgt av C7 og C8. Denne interaksjonen eksponerer den hydrofobiske siden til C7 og komplekset fester seg til membranen. Dette skjer for C8 når den binder seg til C5b også. Deler av C8 som nå er bundet til membranen vil indusere polymerisering av C9 (16 stykker) komponenten og for hvert molekyl av C9 som blir lagt til polymer eksponerer det et hydrofobisk område og setter seg inn i membranen og danner transmembran pore. Membrane Attack Complex (MAC) genererer porer i dobbeltlipid membranlaget som sprekker eller hemolyserer cellene (Parham, P. 2009).

### 4. Oppgavens målsetning

I denne masteroppgaven skulle det fokuseres på hvor reproducerbar testen er, og hvor robust den er når man forandrer ulike parametere som kan ha innflytelse på testsystemet. Målet er å finne ut hva som skjer i testen og hvilke parametere som har mest innflytelse på resultatene.

Den komplementfikserings-effekten av prøven skal undersøkes ved de ulike forsøkene, og resultatene skal sammenlignes i forhold til aggregert IgG som er en positiv kontroll. Det vil si hvor mye variasjon som er mellom dem.

Komplementfikseringstest er den hovedtesten som skal brukes under de ulike forandringene.

Parametere av betydning:

- LPS sin innflytelse på testsystemet
- Sensibiliseringsgrad (varierende antistoffmengde)
- ulike lyseringsgrader
- ulike sauceller i forhold til hverandre
- blodets alder
- temperaturendring
- preinkubasjonstid på kort og lang tid
- ulike komplementkilder
- ulike ristehastigheter
- følsomhet mellom testsubstanser

## 5. Metoder og materialer

### 5.1. Generelle metoder

#### 5.1.1. Hovedmaterialer og utstyr

##### 5.1.1.1. Innveiging av prøver

Analysevekt: Sartorius BP 121S

Alle testprøver/testsubstansen som ble brukt under forsøkene ble de veid med denne analysevekten.

1 eller 2 mg av testsubstansen ble veid og overført til et sterilt ependorfrør. 1 ml VB/BSA løsning (komplementbuffer) ble tilsatt til dette for å løse stoffet. Noen av de testprøvene som skulle brukes under forsøket løses helst en dag før bruk. Dette på grunn av at de er tungtløselige. Dette gjøres for å være helt sikker at stoffet er løst før man teste det.

##### 5.1.1.2. Sentrifuge

MULTIFUGE 3SR, (Thermo)

Ved sentrifugering av glassrør og mikrotitterplater med innhold av prøveløsninger under eksperimentene ble denne sentrifugen benyttet. Under forsøkene ble både mikrotitterplater eller rørene sentrifugert med program-4 i 5 minutter med 1000 x g.

##### 5.1.1.3. Blanding av løsninger

Mikser : *lab dencer vario*

For å få homogene løsninger ble den regulerbare mikseren benyttet til å blande nesten av alle løsninger i reagensrørene. Unntatt er serum, fordi når serum blandes med mikser er det fare for skumdannelse.

##### 5.1.1.4. Varmeskap med ristepate

PROBLOT 12S HYBRIDIZATION OVEN (Labnet)

Dette varmeskapet med regulerbare knapper for både temperatur og ristehastighet ble brukt under alle eksperimenter.

## 5.1.1.5 Absorbansmålinger

- Emax mikroplateleser (Molecular Devices)
- UV mini 1240 UV-VISSPECTROMETER

Absorbansen fra komplementfikseringstesten måles ved hjelp av Emax apparatet ved 405 nm. UV spekterometeren ble brukt til måling av IgG løsning for å finne konsentrasjonen av fortynnet løsning ved 280 nm.

## 5.1.1.6 Mikrotitterplatter

I alle forsøkene ble det brukt to typer mikrotitterplater.

- 96 brønner med rund og flat bunn (NUNC<sup>TM</sup> MICROWELL PLATE/NUNC<sup>TM</sup>: NUNCLON<sup>TM</sup> surface)

## 5.1.2. Reagenser

### 5.1.2.1. Destillert vann

Destillert vann ble brukt hele tiden i alle metoder når man ønsker å oppnå 100 % hemolyse av SRBC (sheep red blood cell) i systemet. Et apparatur ble brukt for å destillere vannet i laben.

### 5.1.2.2. Waaler

Waal er fosfatbuffer salt. Den er 20 ganger konsentrert i forhold til PBS. Man bruker den til å lage BPS (fosfatbuffer saltvann). Molariteten på løsningen er 0,15M og pH= 7,3.

### 5.1.2.3. PBS

PBS er fosfatbuffer saltvann som brukes til vasking av saueblodceller.

PBS lages ved å blande én enhet waaler og 20 enheter destillert vann. Det vil si i 1:20 forhold. pH-en i løsningen er 7,3 og molariteten det er 0,15M.

For å lage 1 liter bruker:

- 50 ml waaler
- 950 ml destillert vann

Løsningen oppbevares i kjøleskap til dagens bruk.

### 5.1.2.4. Veronalbuffer

Veronalbuffer kalles også komplementfikseringsbuffer. Den består av VB+BSA+NaN<sub>3</sub>.

- BSA (bovine serumalbumin 30 %) brukes som stabilisering av proteiner i reaksjonsblandinger.
- NaN<sub>3</sub> (0,02 % natriumazid) hindrer bakterievekst i løsningen. Den er giftig og må ikke inhaleres eller søles.

Veronalbuffer brukes til å vaske blodcellene, til fortynning av saueblodceller, fortynning av komplementkilder og prøvesubstanser som brukes under forsøkene.

VB inneholder Ca<sup>2+</sup> ioner og Mg<sup>2+</sup> ioner som stabiliserer komplementet, spesielt C1 komplekset.

For å lage 1 liter bruker:

- 2 ml 10 % NaN<sub>3</sub>
- 6.7 ml 30 % BSA
- 991 ml VB

Løsningen har pH = 7,2 og skal lagres i kjøleskap eller kjølerom i lengre tid opptil 6 måneder. Alt arbeidet skal utføres i avtrekkskap når man lager komplementbufferen på grunn av NaN<sub>3</sub>.

### 5.1.2.5. Humant serum

Tre forskjellige serumkilde fra 3 friske, frivillige og anonymiserte personer ble brukt som komplementkilder under forsøkene (se på tilberedning og oppbevarings punkter).

### 5.1.2.6. SRBC

Det ble brukt 3 ulike sauer som kilde for blodceller i forsøkene. Blodet ble levert i 8.5 mL antikuagulant vacutainer rør (ACD-A 1.5mL). Tappedato og nummeret til sauen skrives på røret. Blodet settes i kjøleskapet og lar det stå i 2 uker for å øke følsomheten av erythrocytter før man bruker det. Blodet kan oppbevares opptil 3 måneder. Er blodet for gammelt vil blodcellene bli for ustabile og ikke brukbar i testen.

### 5.1.2.7. Amboceptor

Dette er et kaninantistoff som brukes til sensibilisering av sauerytrocytter. Den reagerer med epitoper på erytrocytene og lager dermed et Ag:Ab kompleks.

Komplement fra mennesker kan binde seg til antistoffdelen på dette komplekset og bli aktivert som forårsaker dannelsen av Membrane Attack Complex (MAC) og dannelse av hull i cellemembranen. Ved hemolysing av røde blodlegemer frigjøres hemoglobuliner (Hb) slik at løsningen blir rød.

Den fortyndes i 1:2500 forhold i VB/BSA/ $\text{NaN}_3$  (komplementbuffer).

1  $\mu\text{l}$  av ufortynnet amboceptor tilsettes til 2.5 ml komplementbuffer. Løsningen blandes godt og beholdes i kjøleskapet for videre bruk i forsøkene. Den inneholder humant tetanus immunglobulin som aktivt stoff. Leverandøren for Tetagam er Aventis.

### 3.1.5. Tillaging av aggregert hIgG

Den aggregerte humant IgG ( $\Delta\text{hIgG}$ ) ble brukt som en positiv kontrollsubstans for å sammenligne testsubstansenes effekt med dette i testsystemet. IgG har en aktiverende evne og aktiverer den klassiske komplement veien. Testsubstansens aktivitet som brukes i testen vil sammenlignes med aggregert IgG sin aktivitet. Vi bruker aggregert humant IgG ( $\Delta\text{hIgG}$ ) som positiv kontroll.

Når vi skal lage  $\Delta\text{hIgG}$  brukes "Tetagam ampulle" som inneholder humant IgG fra immuniserte blodgivere som er rik på antistoffer mot tetanus.

Det er ikke en helt bestemt konsentrasjon i ampullen og den ligger mellom 100 til 170 mg/ml. Vi ønsker å lage totalt 5 ml stamløsning som har en konsentrasjon på 10 mg/ml. Hvis vi bruker den minste konsentrasjonen i ampullen, nemlig 100 mg/ml som startkonsentrasjon så ut fra formelen  $C_1.V_1 = C_2.V_2$  finner hvor mye skal ta ut av ampullen.

$$100 \text{ mg/ml} \times V_1 = 10 \text{ mg/ml} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

0,5 ml tetagam tas ut fra ampullen og blandes med 4,5 ml PBS/Azid. Dette gir en beregnet konsentrasjon på 10 mg/ml.

For å få den riktige konsentrasjonen i stamløsningen leser vi absorbansen og relaterer konsentrasjonen til OD (Optical Density) som måles i 1 cm lysvei ved 280 nm bølgelengden (punkt 5.1.1.5).



Man bruker  $OD/1.4 = X \text{ mg/ml}$  formelen for å måle konsentrasjonen i løsningen.

Resultat: OD-en som spekterometeren viser det er 20,7. Ut fra formelen konsentrasjonen i stamløsningen blir 14.8 mg/ml.

Løsningen varmebehandles i 30 minutter ved 63°C på vannbad for å danne aggregert IgG. Etter aggregering gelfiltrerer man både ubehandlet IgG og den varmebehandlet/aggregert IgG for å se om det har skjedd aggregering eller ikke. Man bruker en gelfiltreringskromatografi som dokumentasjon.

### Utstyr:

- Destillert vann: vasker kvartskyvetten.
- PBS/Azid: vasker kvartskyvetten, brukes som fortynningsmiddel og blindprøve.
- Tetagam 1 ml (250 IU/UI) ampulle, produsert fra Aventis
- UV Spektrofotometer
- Kvartskyvetten
- Vannbad med temperaturkontroll

### 5.1.4. HPLC-apparatur med skriver

#### Prinsipp

(Stig P.B. og Knut R. (2004). *Legemiddelanalyse*)

Kromatograf er samlenavn på separasjonsmetoder som skiller stoffer fra hverandre. Det er to faser i testsystemet. Det ene er mobilfase som bærer med seg løselige molekyler og den andre er stasjonærfase som består av faste partikler som er pakket i en kolonne. Funksjonen til stasjonærfasen ved gelfiltreringskromatografi er å bremse opp stoffene som er i løsningen med forskjellige molekylvekter. Dermed vil stoffene transporteres med forskjellige hastighet gjennom kolonne. Stasjonærfasen i gelfiltreringskromatografi består av porøse partikler med betemte porestørrelse som kan skille mellom ulike molekylvekter.

Makromolekyler som utestenges av porene kommer i "void volum" som er væskevolumet utenfor partiklene. Svært små molekyler oppfatter ikke porene som hindring i det hele tatt og kommer i total volumet ( $\pi r^2 h$ ) av søylen. Andre molekyler vil vandre i volumet  $V_e$  som er mindre enn  $V_t$  og større enn  $V_0$ . Alle molekyler som vanderer der er avhengig av molekylvekten.

Prøveløsningen må være blandbar med mobilfasen.

Prøveløsningen injiseres inn i kolonnen ved hjelp av en injektor. Separasjonen skjer ved at mobilfasen pumpes med konstant hastighet gjennom kolonnen. Når stoffene går forbi UV detektoren så vil detektoren gir en elektronisk respons for stoffene. Ved hjelp av en skriver får man ut gelfiltreringsprofilen (kromatogramet).

Apparatet ble brukt for å sammenligne ubehandlet IgG og varmebehandlet IgG som er laget over (metode 5.1.2.8), for å se om det har skjedd aggregering eller ikke.

### Utstyr

- HPLC apparatur: LKB, 2150 series
- Skriver: 2221 COMPUTING INTEGRATOR
- Kolonne: Superdex 200
  - Lengde 10 x 300-310 mm
  - Partikkelstørrelse 13  $\mu$ m
  - Kolonnevolum 24 ml
  - Flow hastighet 0,5 ml/min
- Injeksjonsvolum: 200  $\mu$ l
- Detektor: UV

### Reagenser

- Destillert vann:
- Mobilfasen: Den består av
  - 0,05 M tris/HCl buffer
  - 0,2 M NaCl
  - 2 mM Na-edetat
  - 0,02 % m/V Na-azid
  - pH 7,6
- IgG løsning med en konsentrasjon på 14,8 mg/ml

### Prosedyre

1. 3  $\mu$ l aggregert humant IgG ( $\Delta$ hIgG) ble fortynnet i ca 190  $\mu$ l tris/HCl buffer, blandet godt. Fylte en injeksjon og injiserte den i injektoren.
2. Skifter fra load posisjon til injeksjonposisjonen.
3. Pumpen startes og samtidig starter skriveren også.
4. Prosedyren tar 45 Minutter.

### 5.1.5. Plantematerialer

Prøver som ble brukt under de forskjellige forsøkene er isolert fra før. De er PMII (som ble isolert fra bladene av *Plantago major*) (Samuelsen, A. B., et al., 1998) og BPII (som ble isolert fra *Biophytum petersianum* klotzsch) (Grønhaug, T. E., et al., 2011 og Grønhaug, T. E., et al., 2008) polysakkaridfraksjoner fra medisinerplanter. PMII synes å være en aktivator både for klassiske og alternative veier (Michaelsen, T.E., et al., 2000).

### 5.1.6. Programvarer\_

Det ble brukt to typer programvarer for beregning og tegning av figurer. De er

- 1) Soft<sub>max</sub> PRO version 2.35
- 2) GraphPad Prism version 4.03, januar 21, 2005

## 5.2. Biologisk aktivitet av plantepolysakkarider

### 5.2.1. Generelt

Mange medisinerplanter som inneholder polysakkarider har vist seg å ha en rekke farmakologiske aktiviteter som immunmodulerende aktivitet, anti-komplementær aktivitet og andre aktiviteter (Paulsen, B. S. 2002).

### 5.2.2. Immunmodulerende aktivitet

Graden av immunmodulerende aktivitet fra plantepolysakkarider som ble brukt under forsøkene ble målt ved komplementfikseringstest og variasjon i parameterne som har innflytelse på testen.

### 5.2.3. Komplementfikseringstest (CFT)

#### Prinsipp

(Michaelsen, T.E., et al., 2000. Yamada & Kiohara, 2007. Samuelsen, A.B., et al., 2006)

Komplementfikseringstest brukes som en immunologisk screeningstest. Testen brukes opprinnelig til påvisning av antistoffer for smittsomme sykdommer og særlig virale sykdommer. Det er slik at man tilsetter mikrobe/mikrobeantigen i systemet som man skal teste antistoffrespons mot, hos en pasient som en diagnostisk test.

I den opprinnelige testen brukes marsvinserum som komplementkilde.

Komplementfikseringstest er basert på hemming av hemolyse av antistoff sensibilisert SRBC med humane sera.

I testen slik vi bruker den innkuberes prøver med ubehandlet humant serumkomplementkilde (punkt 5.2.3.6) som komplementkilde. Hvis prøvesubstanser interagerer med komplement systemet detekteres dette i testsystemet. Deretter tilsettes sensibiliserte SRBC (immunkompleks) til systemet. Når komplement binder seg til immunkomplekset vil komplementkaskaden aktiveres. Dette vil føre til dannelse av hull (perforering) i saueblodceller og dermed hemolyse av blodceller via MAC.

Polysakkarider fra testsubstansen kan ha aktiverende eller hemmende effekt på komplementsystemet som i begge tilfeller resulterer i reduksjon av komplementfaktorer i komplementkaskaden og dermed nedgang av hemolysegraden i indikatorsystemet. Så testen indikerer at testsubstansen har komplementfikserende aktivitet eller ikke. Testen kan ikke skille mellom aktiverende (komplement forbruk) eller hemmende mekanismen som står bak. Sussane Alban og medarbeidere (2000) påviste at med en modifisering (forskjellige preinkubasjonstid av testsubstansen og komplement) av testsystemet kan man skille mellom komplementaktivering og komplementinhiberings mekanismer.

Substansens innflytelse på humant komplementsystemet måles i prosent hemming av lyse, og aktiviteten registreres som  $IC_{50}$  som er den konsentrasjonen av testsubstansen som trengs for å hemme 50 % av hemolyse. Jo lavere  $IC_{50}$  verdi, jo høyere er komplementfiksert aktivitet. Graden av hemolyse måles som absorpsjon ved 405 nm. Resultatet sammenlignes med  $\Delta HlgG$  som er en positiv kontrollsubstans.

### Utstyr

- Sentrifuge, MULTIFUGE 3SR. (Thermo)
- Mikser (lab dencer)
- Mikrotitterplater både rund bunn og flatt bunn (NUNC™ MICROWELL PLATE/ NUNC™: NUNCLON™ surface) 96 brønner
- Varmskap med ristepate PROBLLOT 12S HYBRIZATION OVEN
- Pipetter både gul og blå
- Finn® - pipetter

### Reagenser

- Destillert vann
- PBS
- Veronall/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml BSA 30 % og 0,02 %  
natriumazid
- Saueblodceller 7001, 6110, 0024
- Komplementkilder: MK, ACV, ECG
- Positiv kontroll:  $\Delta$ hIgG

### 5.2.3.1. Tilberedning av serum til komplementfikseringstest

Serum fra 3 friske personer MK, ACV og ECG ble brukt under utføring av komplementfikseringstesten.

### Utstyr

- 4 x 8.5 ml vacutainer rør (SST II *Advance*) for hver donor person
- Sentrifuge, MULTIFUGE 3SR, (Thermo)
- Ependorfrør (100 ul og 200 ul)

### Prosedyre

- 1) Det ble tappet 4 vacutiner rør hvert med á 10 ml fullblod.
- 2) Blodet stått til koagulering 1 time ved rom temperatur.
- 3) Blodglassene ble sentrifugert i 2700 x g i 10 minutter ved 10°C.
- 4) Serum ble fordelt i 100 ul og 200 ul porsjon ependorfrør.
- 5) Ependorfrørene for hver donor plassert i en pose som merket med donorens navn, tappendato og initial til den som behandlet serumet.
- 6) Serumet ble frosset ned og oppbevart ved -70°C til videre bruk.
- 7) Tiden fra tapping til innfrissing av serumet ved -70°C var ca. 2,5 timer.

## 5.2.3.2. Tillaging av antistoff stamløsning

Kaninantistoff brukes til sensibilisering av pakkede SRBC. Den fortynnes 1:2500 i VB/BSA/ $\text{NaN}_3$ .

### Utstyr

- Finn<sup>®</sup>-pipetter med spiser (gule og blå farger)
- Blender: *lab dencer vario*
- Reagensrør med steril kork

### Reagens

- Veronal/BSA buffer CFT pH 7,2 med 2 mg/ml BSA 30% og 0,02% natriumazid
- Antistoff Virion 9020 Amboceptor

### Prosedyre

- 1) 1  $\mu\text{l}$  av ufortynnet Amboceptor Virion tilsettes til
- 2) 2,5 ml komplementbuffer i et tørt reagensrør
- 3) Disse blandes godt
- 4) Dagens dato og fortynningsforhold skrives på reagensrøret og beholdes i kjøleskapet for videre bruk i forsøkene.

## 5.2.3.3. Tillaging av 1 % saueblodcelleløsning

Man bruker saueblodceller som er minst 2 uker gammelt og opp til 2-3 måneders gammelt til utføring av testen.

### Utstyr

- Finn<sup>®</sup>-pipetter med spiser (gule og blå farger)
- Reagensrør: 10 ml
- Sentrifuge: MULTIFUGE 3SR<sup>+</sup> (Thermo)
- Blender: *lab dencer vario*
- Plast til å dekke toppen av reagensrøret
- Varmeskap

### Reagenser

- PBS
- VB/BSA
- Ubehandlet saueblod
- Fortynnet amboceptor i VB/BSA (1:2500)

### Prosedyre

#### A: Vasking av saueblodceller

- 1) Blodet tas ut fra kjøleskapet og blandes godt.
- 2) 300 til 500 ul av fullblodet overføres til et nytt reagensrør. Denne mengde blod er nok til en plate.
- 3) Blodet ble vasket 2 ganger med 5 ml PBS og 2 ganger med 5 ml VB/BSA (komplementbuffer). Mellom hver vask ble løsningen sentrifugert i 5 minutter ved 1000 x g. Supernatanten ble fjernet ved pipetering etter hver sentrifugering.
- 4) Etter siste sentrifugering alt supernatanten tas ut ved pipetering og vi får bare pakkede blodceller igjen i røret.

#### B: Sensibilisering av saueblodceller

- 1) I et reagensrør tilsettes 5925 ul komplementbuffer pluss 15 ul fortynnet amboceptor fra stamløsningen som er laget i punkt 5.2.3.2. Løsningen blandes godt. Til dette tilsettes 60 ul pakkede blodceller som er laget under punkt A.  
Alt blodet overføres til reagensrøret ved å trekke opp og ned væsken i pipettet.  
Løsningen blandes godt.
- 2) Reagensrøret dekkes med plast og settes på skrått på ristepalten i varmeskapet i 30 minutter ved 37°C.
- 3) Plasten tas av og røret sentrifugeres, punkt A,3 (over) gjentas på nytt.
- 4) Etter siste vask tas alt supernatanten ut av røret ved pipettering og tilsettes 5940 ul komplementbuffer. Vi har nå laget 1 % sensibiliserte saueblodcelleløsning.
- 5) Sensibiliserte saueblodceller som er laget kan bare brukes samme dag.
- 6) Hvis man lager flere rør med sensibiliserte saueblodceller av samme sau, kan man blander rørene sammen å beholde dem i kjøleskapet og bruke den i samme dag.

- 7) Det er viktig å skrive på røret/rørene sauenummer og dagens dato, for å ha kontroll på hva vi har i hvert rør.

### 5.2.3.4. Fortynning av prøver og positiv kontroll til komplementfikseringstest

- 1) I et ependorfrør plasseres 1 mg av prøvesubstansen eller kositiv kontroll. Dette løses i 1ml komplementbuffer hvis det ikke er noe annet gitt, slik får man en bestemt konsentrasjon av prøven eller positiv kontroll på 1 mg/ml.
- 2) Det lages en fortynningsrekke av prøven/prøver eller positiv kontrollen i komplementbuffer. Tabell 5.1

OBS! under alle forsøkene ble brukt 2-folds fortynningsrekke.

Rør Nr:	Veronal/BSA-buffer	Prøveløsning eller positiv kontroll med 1 mg/ml som konsentrasjon	Slutt konsentrasjon (ug/ml) i rørene
1	125 ul	125 ul	500
2	125 ul	125 ul fra rør nr.1	250
3	125 ul	125 ul fra rør nr.2	125
4	125 ul	125 ul fra rør nr.3	62.5
5	125 ul	125 ul fra rør nr.4	31.25
6	125 ul	125 ul fra rør nr.5	15.625

**Tabell 5-1:** Skjematisk fortynningsrekke for prøver og positiv kontroll. Tabellen viser hvordan fortynning av prøve/prøver og positiv kontrollen skjer.

### 5.2.3.5. Titreringskurve for komplementkilde

Vi lager en titreringskurve for å finne ut hvilken fortynning av serum som komplementkilde vi trenger. Til dette lages forskjellige fortynninger av komplement og VB/BSA-buffer (1:40, 1:50, ..., 1:130).

Rør nr:	Fortynningsforhold Komplement: Buffer	Veronal/BSA-buffer (ul)	Ubehandlet komplement (ul)
1	1:40	390	10
2	1:50	490	10
3	1:60	590	10
4	1:70	690	10
5	1:80	790	10
6	1:90	890	10
7	1:100	990	10
8	1:110	1090	10
9	1:120	1190	10
10	1:130	1290	10

**Tabell 5.2:** Tabellen viser hvordan man lager en titreringskurve for komplementkilde.



OBS! Ependorfrøret som inneholder serumet tines på bordet og settes på is før man tilsetter det i de forskjellige VB/BSA mengder (tabell 5.2). Man unngår å bruke mikser for å blande serumet på grunn av skumdannelse.

- 1) Alt arbeidet skal utføres på is.
- 2) Først settes VB/BSA-buffer til de 10 rørene. Rørene dekkes med plast på toppen.
- 3) 50 ul av VB/BSA-buffer tilsettes til 30 brønner i en rundbunn mikrotitterplate, etterfulgt av 6 brønner med 100 ul destillert vann (gir 100 % hemolyse), 6 brønner med 100 ul VB/BSA-buffer (blank) og 6 brønner med 150 ul VB/BSA-buffer.
- 4) Ubehandlet komplement serum fortynnes i egne ependorfrør og blandes godt med pippete før tilsetning på rørene.
- 5) 10 ul av komplementet serum overføres til hvert rør, blandes godt og overføres 50 ul av fortynnet serum i 3 brønner av hver. Man tar en fortynning av gangen.
- 6) En forseglingssteip festes godt på platetoppen og platen innkuberes i 30 minutter ved 37 °C under resting.
- 7) Etter innkubering så lenge en vil at prøven og serumfortynningen skal innkuberes under testen og tilsettes 50 ul 1 % blodcelleløsning til alle brønnene unntatt de brønnene som inneholder bare 150 ul komplementbuffer. Platen innkuberes igjen i 30 minutter ved 37 °C under resting.
- 8) Platen ble sentrifugert i 5 minutter ved 1000 x g. 100 ul fra hver brønn overført til en flatbunn mikrotitter plate. Platen sentrifugeres på nytt i 5 min for å fjerne tilstedværelse av luftbobler.
- 9) Platen leses av i mikroplateleseren ved 405 nm. Gjennomsnittet av de brønnene med 100 ul vann som gir 100 % hemolyse (tallet deles på 2 for å finne 50 % hemolyse). Gjennomsnitt og de tre brønnene for hver fortynningsrekke regnes ut også.
- 10) Man finner ut den fortynningen som gir nærmest 50 % hemolysering av erytrocyttene ut fra komplement fortynningsrekker. Denne fortynningen brukes ved utføring av komplementtesten.

### 5.2.3.6. Utføring av selve testen

- 1) Til en 96 rundbunn mikrotitterplate ble tilsatt 50 ul av hver prøvfortynning (metode 5.2.3.4) og 50 ul av positiv kontroll, altså 2 parallelle/duplikater av hver fortynning fra de rørene.
- 2) 4 brønner tilsettes 100 ul destillert vann som gir 100 % hemolyse når man tilsetter 50 ul 1 % blodcelleløsning. 4 brønner tilsettes 50 ul veronall/BSA-buffer som gir 50 % hemolyse når man tilsetter 50 ul av fortynnet serum (punkt 5.2.3.5) og 4 brønner med bare 100 ul veronall/BSA-buffer.
- 3) Man lager en bestemt mengde av komplementfortynning som gir 50 % hemolyse (punkt 5.2.3.5) som er nok til alle de brønnene som skal brukes under testen.
- 4) 50 ul av det fortynnete komplement serumet tilsettes til alle brønnene, unntatt de brønnene med 100 ul destillert vann og de med 100 ul VB/BSA-buffer.
- 5) Mikrotitterplaten dekkes med forseglingssteip og settes i varmeskapet i 30 minutter ved 37°C under risting. I noen tester brukte 45 eller 60 minutter inkubasjonstid istedenfor 30 minutter inkubasjonstid.
- 6) 50 ul 1 % blodcelleløsning ble tilsatt til alle brønnene. Mikrotitterplaten dekkes med ny forseglingssteip og innkuberes i varmeskapet ved 37°C i 30 minutter under risting.
- 7) Platen sentrifugeres i 5 minutter ved 1000x g.
- 8) 100 ul fra hver brønn overføres til flatbunnmikrotitterplate. Platen sentrifugeres igjen i 5 minutter ved 1000 x g.
- 9) Absorbansen måles ved 405 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Tabell 5.3:** Skjematisk tegning av en mikrotitterplate som brukes under komplementfikseringstest med de forskjellige reagenser som settes i brønnene.

50 ul fortynnet prøve eller positiv kontroll + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**Blank:** 100 ul VB/BSA-buffer + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**100 % hemolyse:** 100 ul destillert vann + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**50 % hemolyse:** 50 ul VB/ BSA-buffer + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

### 5.2.3.7. Beregninger

**A: Lyseringsgrad:** Det er serumet sin evne til å hemolysere erythrocytter i forhold til 100 % hemolyse. Den regnes ut fra formelen:

$$\text{Lyseringsgrad} = (\text{Abs}_{\text{kontroll}} / \text{Abs}_{\text{Destillert vann}}) \times 100 \%$$

**B: % hemming fra ekstrakt regnes av formelen:**

$$\% \text{ hemming fra ekstrakt} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontroll}} - \text{Abs}_{\text{Prøve}}}{\text{Abs}_{\text{kontroll}}} \times 100\%$$

En lav absorbanse fra prøven i testsystemet vil si at testprøven er aktiv og færre blodceller vil bli hemolysert.

For eksempel hvis en testprøve hemmer 95 % hemolysering av blodet, vil si at prøven er veldig aktivt og den forbruker eller hemmer mye av komplementet.

### **C: ICH<sub>50</sub>-verdien:**

ICH<sub>50</sub> er den konsentrasjonen av testsubstansen som gir 50 % hemming av hemolyse. Jo lavere ICH<sub>50</sub> verdien er jo mer aktiv er stoffet.

## **5.3. LPS og komplementfikseringstest**

### **5.3.1. Generell**

Lipopolysakkarider (en bakteriell endotoksin) er en hovedkomponent i den ytre membran av gramnegative bakterier. Sensing av LPS ved hjelp av medfødte immunsystemet celler er viktig for vertens forsvar mot gramnegative bakterier ([Thierry, R., et al., 2008](#)).

LPS er en velkjent stimulator for makrofager og aktivator av komplement via den alternative veien. Den er allestedsnærværende og ofte forurenses biologiske materialer/preparater ([HETLAND, G., et al., 2000](#)).

LPS består av en svært biologisk aktive lipid A som er bundet til bakterie membranen og karbohydrat delen som stikker ut fra celleoverflaten ([Inngjerdningen, K.T., et al., 2005](#)).

Det er rapportert at LPS har innflytelse på den alternative veien, men for at denne aktiveringsveien skal fungere må serumet ikke være fortynnet mer enn 1:1 eller 1:2.

Det er mulig at de prøvene som brukes under forsøket er kontaminert med LPS og dermed er det viktig å ha god kontroll på LPS mengden i prøvene. I komplementfikseringstestene som ble utført med tilstedeværelse av LPS i denne masteroppgaven vi tilsatt med vilje en bestemt konsentrasjon/mengde LPS til en testsubstans som er renses for LPS ved hjelp av detoksi-gel søyle (se under), men også i tillegg til IgG som brukes som positiv kontroll for å se om LPS har noe innflytelse på komplementfiksering eller ikke. Det vil si om testsubstansens biologiske aktivitet endrer seg eller ikke.

Utføring av selve testen er beskrevet i punkt 6.4.



## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1. Komplementfikseringstest

Komplementfikseringstest er en in vitro testmetode som benyttes for å undersøke testsubstansens biologiske aktivitet og/eller komplementfikserende aktivitet ved tilstedeværelse av humant komplement og sensibiliserte røde blodceller fra sau.

Testsubstansen kan ha en rekke immunmodulerende effekter blant annet de som virker på komplementsystemet. Prøvene har enten aktiverende eller hemmende effekt på komplementet og i begge tilfeller medfører til reduksjon av hemolyse av sensibiliserte røde blodceller i testsystemet.

Det er viktig å være oppmerksom på at testen ikke kan skille mellom aktivering (forbruk av komplement) og hemming av komplementsystemet.

Testsubstansens komplementfikseringsaktivitet måles i % hemming av hemolyse i testsystemet og den uttrykkes som  $ICH_{50}$ -verdi.  $ICH_{50}$  er den konsentrasjonen av testsubstansen som gir 50 % hemming av hemolyse i indikatorsystemet.

### 6.2. Oppbygning av komplementfikseringstesten

#### Reagenser:

- 1 % SRBC
- VB/BSA
- PBS
- Destillert vann
- Amoceptor
- Komplementserum fra 3 friske, frivillige personer

#### Metode:

- Metoden som brukes under utføring av testen er en hemolyse inhibisjonstest og består av flere trinn. Trinne er vist på neste side.

## Trinn 1:

### Saueblodceller

- Vasking av saueblodceller (metode 5.2.3.3 del A).
- Sensibilisering av SRBC med amboceptor (Kanin antistoff mot røde blodceller fra sau). Se metode 5.2.3.3 B.

## Trinn 2:

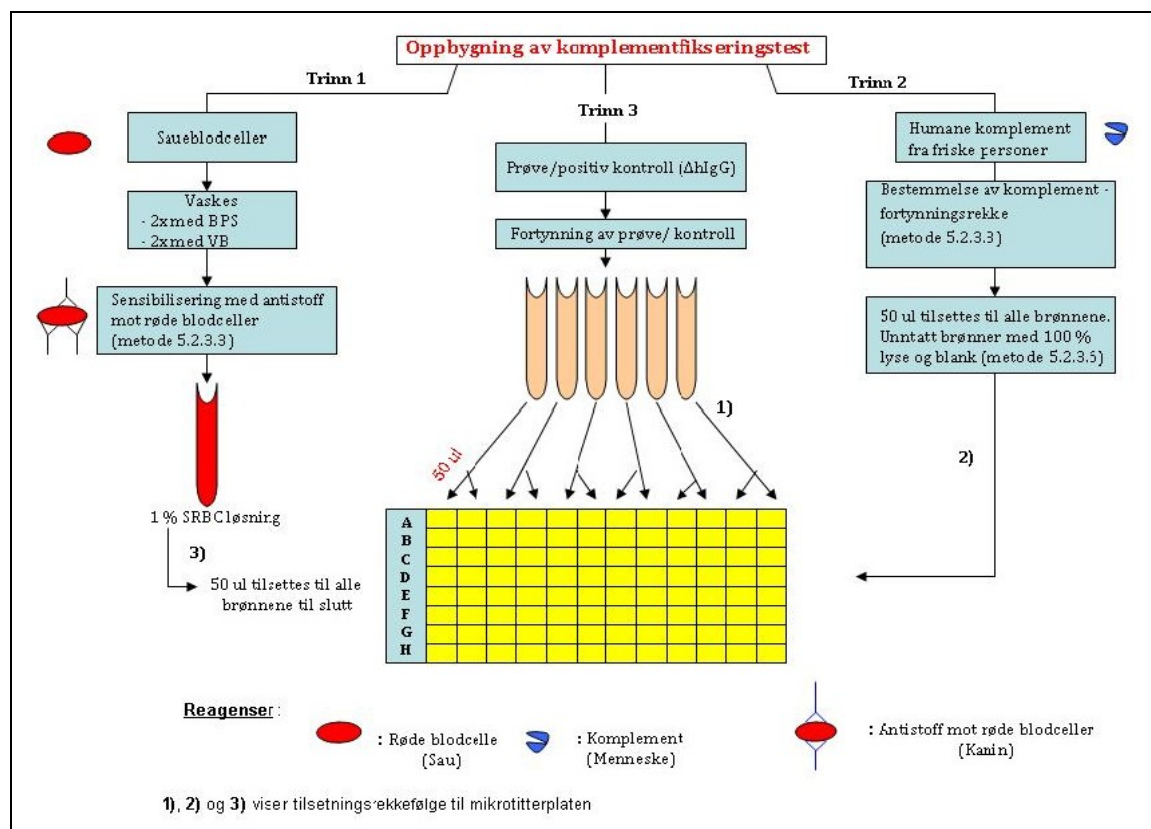
### Humant komplementkilde

- Serum fra normale personer (metode 5.2.3.1).
- Fortynningsrekke. Man ønsker å finne fortynning av humant komplementkilde som gir 50 % hemolyse (metode 5.2.3.5).
- Vi lager masse av fortynnet komplementserum. Tilsettes 50 ul til alle brønnene unntatt brønner som gir 100 % hemolyse og blank (tabell 5.3).

## Trinn 3:

### Fortynning av prøver og kontroll

- Prøve/prøvene og positiv kontroll fortynnes i forskjellige konsentrasjoner (metode 5.2.3.4) og 50 ul tilsettes til mikrotitterplaten (figur 6.1).



**Figur 6.1:** Skjematisk tegning av de trinnene som skjer under komplementfikseringstest. Tallene 1), 2) og 3) viser tilsetningsrekkefølgen til mikrotitterplaten.

### 6.3. Ulike parametere som kan innvirke på komplementfikseringstesten

Vi ønsker å se på ulike parametre for å se om de har noe innflytelse på testsystemer eller ikke.

- 1) LPS kontaminering i prøver
- 2) Endring på ristehastighet under inkubasjonsfasene.
- 3) Ulike mengder kanin antistoff (amboceptor) mot saueblodceller i testsystemet
- 4) Endring av temperatur under testen
- 5) Bruk av ulike sauer for isolering av SRBC
- 6) Endring av preinkubasjonstid
- 7) Bruk av ulike hemolyseringsgrader av saueblodcellene.
- 8) Bruk av forskjellige personer som komplementkilder

Vi vil se på testens robusthet og reproduserbarhet.

**Definisjon på robusthet:** Robusthet er innflytelse av variasjon av parameterne. Det vil si hvor følsomhet er systemet for endring av parameterne. For eksempel hvis vi endrer på preinkubasjonstider under samme forsøk i samme dag da kan vi se på om testen er robust eller ikke. Hvis det skjer variasjon i systemet med endring av parameterne og vi får endring i resultatene sier vi at testen er ikke robust for samme dag, men når det er ingen endring i testresultatene (variasjon i resultatene) sier vi at testen er robust for samme dag.

**Definisjon på reproduserbarhet:** Reproduserbarhet er gjentakelse av samme målemetode med nøyaktig samme materialer (for eksempel reagenser) som gjøres likt flere ganger under varierende betingelser (for eksempel ved ulike preinkubasjonstider) enten på samme dag eller på flere dager. Testresultatene sammenlignes med hverandre for å se om testresultatene er det samme eller om de varierer underveis.



## 6.4. Bruk av aggregert IgG som positiv kontroll

I alle forsøkene som ble utført under komplementfikseringstesten ble aggregert humant IgG ( $\Delta$ hIgG) brukt som en positiv kontrollsubstans for å sammenligne testsubstansenes aktivitet/effekt i forhold til kontrollsubstansens sin aktivitet.

Vi ønsker å se om det er dannet  $\Delta$ hIgG eller ikke når løsningen ble varmebehandlet i 30 minutter ved 63 °C.

Den  $\Delta$ hIgG oppfører seg som immunkompleks (Ag:Ab) som aktiverer komplementet via den klassiske aktiveringsvei.

For å vise dannelsen av  $\Delta$ hIgG under varmebehandling ble både ubehandlet og varmebehandlede hIgG testet på HPLC med Superdex 200 gelfiltrering som kolonne. Ved gelfiltrering separeres IgG bestanddeler etter molekylvektstørrelse.

Resultatene fra HPLC brukes som dokumentasjon om det har skjedd aggregering eller ikke.

### Forsøksbetingelser:

#### - Mobilfase:

Den standardbufferen som brukes her i gelfiltrering består av ulike komponenter:

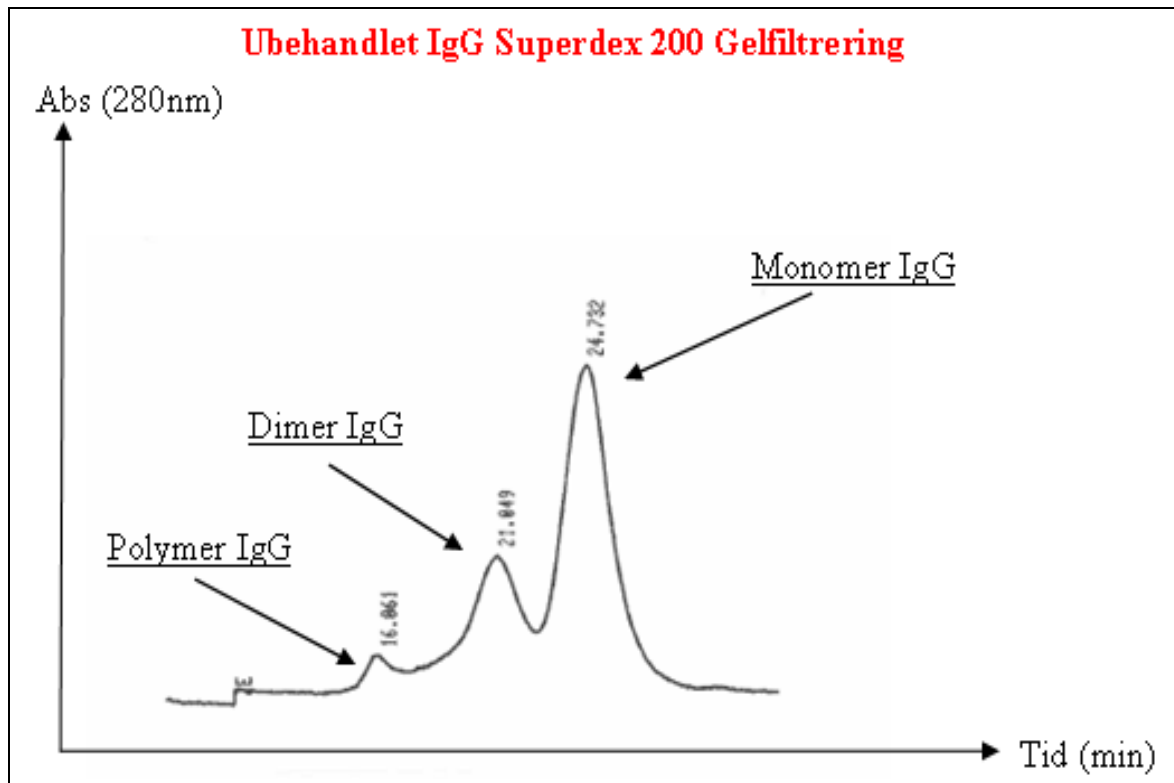
0,05 M tris/HCl buffer  
0,2 M NaCl  
2 mM Na-edetat  
0,02 % m/V Na-azid  
pH 7,6

Bufferen sterilfiltreres (0,22  $\mu$ m sterilfilter) og degases ved vannsug før bruk.

#### - Utstyr og reagenser:

- Stasjonerfase: Superdex 200
- Tris/HCl
- Leverandør av Superdex 200 kolonne: Pharmacia Biotech
- Identifikasjonsnummer til søylen: 0134042
- HPLC apparatur
- Elueringshastighet: 0,5 ml/min
- Tid: 45 minutter
- Absorbansmåling: 280 nm
- Ubehandlet IgG løsning
- Aggregert IgG løsning

Figur 6.2 og 6.4 viser resultatene for gelfiltreringskromatografi etter HPLC kjøring..



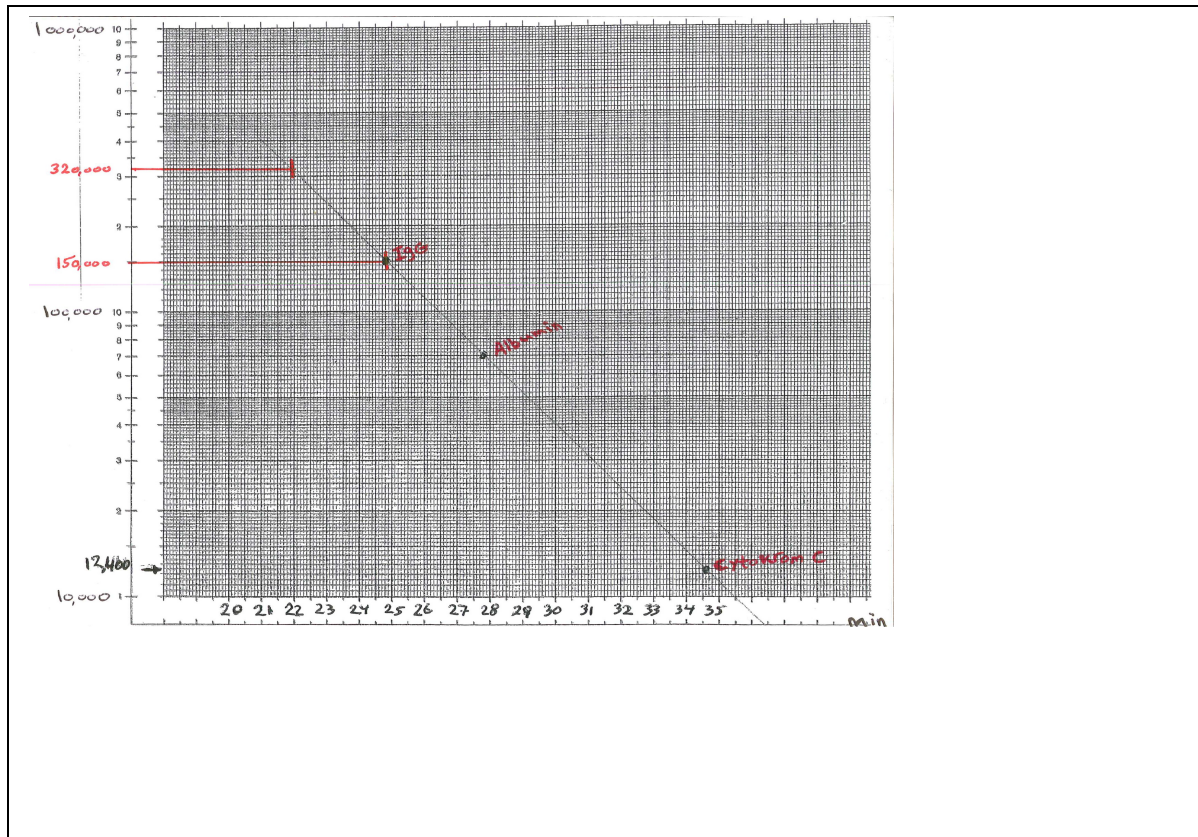
**Figur 6.2:** Gelfiltreringsprofil for ubehandlet IgG. Eluert med tris/HCl buffer på superdex 200 kolonne. Absorbansen er målt ved 280 nm. Tallene på toppen viser retensjonstiden i minutter.

Gelfiltrering av utgangspunkt IgG før aggregering viser monomere, dimere og polymere IgG fraksjoner (figur 6-2). Den består av store mengder monomer IgG (høyre toppen), små mengder av dimer IgG (midt toppen) og enda mindre mengder av polymer IgG (venstre toppen). Den polymeren (med høyere molekylvekt) kommer ut først, deretter kommer dimere og tilslutt monomere (lavere molekylvekt) fraksjoner. Tallene på toppene viser retensjonstiden i minutter når de kommer ut fra søylen.

Ved hjelp av en standardkurve (figur 6-3) kan man finne molekylvektene på de over nevnte bestanddeler i ubehandlet hIgG.

Standardkurven (figur 6.3) ble konstruert ved å gel-filtrere en standard blanding av tre stoffer med kjente Mw nemlig Cytokrom C, albumin og IgG som brukes til kalibrering.

- Cytokrom-C presenterer en Mw på 12400 Da (tallet er vist på Y-aksen)
- Albumin presenterer en Mw på 70000 Da
- IgG presenterer en Mw på 150000 Da



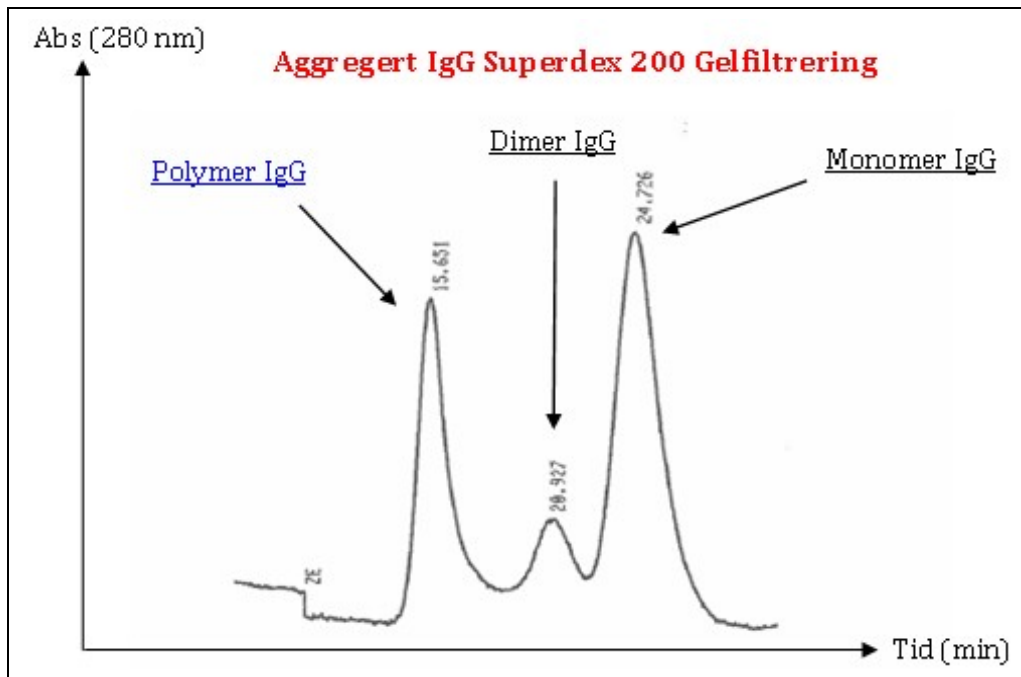
**Figur 6.3:** Skjematisert bilde for standardkurve. En blanding av tre standarder med kjent Mw ble brukt nemlig Cytokrom C, albumin og IgG. På X-aksen er det retensjonstiden i minutter til de standardene som kommer ut fra søylen. Kalibreringskurven brukes til å finne Mw av stoffer.

Ut fra figur 6.2 ser vi at monomere IgG molekylerne er kommet ut etter 24,7 minutter (tallet er vist på toppen). Ut fra standardkurven tilsvarer dette en Mw på 150000 Da.

Dimere IgG molekylerne kommer ut etter 21,8 minutter. Mw er på 320000 Da.

Polymere IgG molekylerne kommer ut etter 16 minutter. Her er Mw uendelig stor (ikke vist i figur 6.3), den går ikke i porene og blir liggende på utsiden i void volume ( $V_0$ ).

Etter varmebehandling ved 63 °C i 30 minutter viste gelfiltreringskromatografi separasjon av over fornevnte bestanddeler i aggregert hIgG. Ut fra figur 6.4 ser vi en tydelig økning av polymer IgG etter varmebehandling av løsningen (se metode 5.1.3).



**Figur 6.4:** Gelfiltreringsprofil for aggregert hIgG ( $\Delta$ hIgG). Eluert med tris/HCl buffer på superdex 200 kolonne. Absorbansene ble målt ved 280 nm. Tallene på topper viser retensjonstiden i minutter.

Ut fra gelfiltreringsprofil figurene kan vi se at den aggregerte IgG-én som ble brukt i alle komplementfikseringstestene ble den aggregerte under varmebehandling. Men en stor del av hIgG ble ikke varmeaggregert og er derfor resistent for varmeaggregering (Figur 6.4, monomer toppen).

Figur 6.4 viser at den  $\Delta$ hIgG toppen er kraftig øket i forhold til når den ikke er varmebehandlet.

## 6.5. LPS og komplementfikseringsaktivitet

Hensikten med denne testen er å måle  $IC_{50}$  verdien for ren LPS alene med en startkonsentrasjon på 100  $\mu$ g/ml for å se om ren LPS har aktivitet i testsystemet eller ikke. I tillegg  $IC_{50}$  verdiene for  $\Delta$ hIgG og BPII (både når den er rensset for LPS og når den ikke er rensset for LPS) ble bestemt. Disse  $IC_{50}$  verdiene ble brukt videre under metode 6.5.2. LPS løsningen ble fortynnet i VB/BSA (metode 5.2.4.3) og testet i punkt 6.5.1 del1.

Aggregert hIgG lages ut fra et medisinsk preparat (Tetagam). Dette må være fritt for LPS og derfor ble ikke aggregert IgG kjørt på polymyxin B søylen.

Testen ble utført både på gammelt og ferskt blod fra samme sau for å se om blodets alder har noe å si om testsubstansens biologiskaktivitet eller ikke. Det vil si om blodets alder virker på  $IC_{50}$  verdien eller ikke. Komplementfortynningsresultater for både gammelt og ferskt blod ble bestemt og benyttet i testen for å finne  $IC_{50}$  verdiene for både positiv kontrollen ( $\Delta$ hIgG) og

BPII som er rensset og ikke rensset for LPS.

## 6.5.1. Utføring av tester

Totalt kjører man to forskjellige forsøk for å se på LPS sin innflytelse i testsystemet.

- 1) I dette forsøket ønsker man å finne  $IC_{50}$  verdien for ren LPS. Man tester LPS-en direkte for å se om ren LPS alene har i seg selv noe effekt eller ikke. Man starter med en høy konsentrasjon (for eksempel 100 ug/ml) av LPS og fortynner den i VB/BSA med 2 eller 4 folds fortynning, det vil si fortynning av bare rent LPS. Dette er en kontroll.

I tillegg i samme plate tester  $\Delta$ hIgG og BPII både når den er rensset og ikke rensset for å finne  $IC_{50}$  verdiene som skal brukes under test nr:2 (neste side).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Tabell 6.1:** Skjematisk tegning av en mikrotitterplate som brukes under komplementfikseringstesten.

**A:** 50 ul fortynnet BPII (ikke rensset for LPS)+ 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon.

**B:** 50 ul fortynnet BPII (renset for LPS) + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon.

**C:** 50 ul fortynnet  $\Delta$ hIgG + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**D:** 50 ul fortynnet LPS + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**Blank:** 100 ul VB/BSA-buffer + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**100 % hemolyse:** 100 ul destillert vann + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**50 % hemolyse:** 50 ul VB/ BSA-buffer + 50 ul fortynnet komplementserum + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

- 2) I dette forsøket bruker en varierende mengde testsubstans og varierende mengde  $\Delta$ hIgG (positiv kontrollen). Disse titreres ned i en fortynningsbuffer som inneholder LPS (10 ug/ml). Det vil si bufferen har bevist LPS. Partallet med den kjører man en helt vanlig fortynning av testsubstansen og  $\Delta$ hIgG i komplementbuffer uten tilsetning av LPS.

**A:** 50 ul BPII (renset for LPS)+ 50 ul fortynnet komplement + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon.

**B:** 50 ul BPII (tilsatt konstant mengde LPS) + 50 ul fortynnet komplement + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon.

**C:** 50 ul  $\Delta$ hIgG (ikke tilsatt LPS)+50 ul fortynnet komplement +50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**D:** 50 ul  $\Delta$ hIgG (tilsatt konstant mengde LPS) + 50 ul fortynnet komplement + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon.

**Blank:** 100 ul VB/BSA-buffer + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**100 % hemolyse:** 100 ul destillert vann + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

**50 % hemolyse:** 50 ul VB/ BSA-buffer + 50 ul fortynnet komplement + 50 ul 1 % blodcellesuspensjon

6.5.2. Alder på saueblodceller til testen

1) Brukt gammelt blod

Figur 6-5 og tabell 6-2 viser doseresponskurvene og ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG, ren LPS fortyning og BPII både når den er renset og når den ikke er renset for LPS.

Det er brukt gammelt blod (60 dager).

**Forsøksbetingelser:**

Komplementfortynning: 1:55

Blodets alder: 60 dager

Startkonsentrasjon på både BPII renset og ikke renset for LPS : 100 ug/ml

Startkonsentrasjon for ΔhIgG: 20 ug/ml

Startkonsentrasjon for LPS: 100 ug/ml

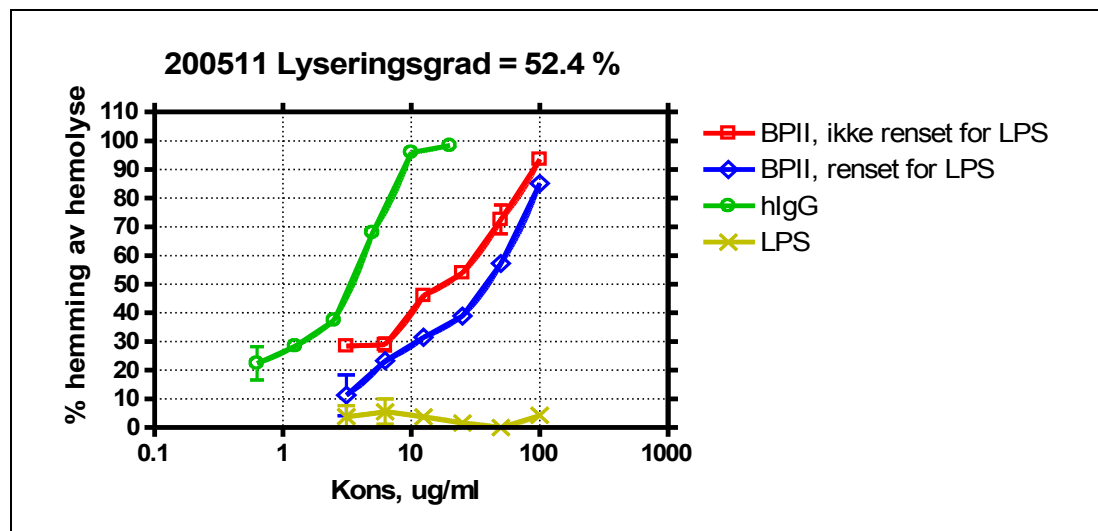
Preinkubasjonstid: 30 min

Temperatur i varmeskap: 37 °C

Ristehastighet: 150 rpm

Saueblod: 7001

Komplementkilde: ECG



Figur 6-5: Doseresponskurver for testsubstansene og ren LPS når man bruker **gammelt blod**

Testsubstanser	ICH <sub>50</sub> verdiene i ug/ml
BPII er <b>ikke renset</b> for LPS innhold	18,7
BPII er <b>renset</b> for LPS innhold	40,1
ΔhIgG	3,5
LPS	Ikke aktivitet

Tabell 6-2: ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII, ΔhIgG og ren LPS når ble det brukt **gammelt blod**.

Tabell 6-2 viser at  $ICH_{50}$  verdien for BPII som er rensset for LPS har nesten dobbelt så mye som  $ICH_{50}$  verdien for BPII som er ikke rensset for LPS. Det vil si BPII rensset for LPS er nesten 2 ganger mindre potent i biologiskaktivt enn ikke rensset BPII.

### **Hypotese:**

En hypotese er at inn i ikke-rensset BPII kan det være ukjente komponenter som kan ha betydning å gi aktivitet i testsystemet. Sannsynligvis ble den/disse komponentene adsorbent av polymyxin søylen under rensing av BPII, men vi vet ikke hva kan det være. For å støtte den hypotesen kan vi skylle søylen og undersøke fikseringsaktiviteten på det/de som er adsorbent til polymyxin søylen. I tillegg kan det være mulig at noen av de aktive komponentene i BPII er adsorbent til polymyxin søylen under rensing.

**Reproduserbarhet:** Samme forsøk under samme betingelser ble utført flere ganger (på forskjellige dager).  $ICH_{50}$  verdiene for testsubstansene og positiv kontrollen viste seg å være nesten likt fra dag til dag. Dette viser at testen er god med hensyn på reproduserbarhet.

**Robusthet:** Når vi rensset BPII for LPS innhold ser vi at det skjer endring i testsystemet som innflyter på  $ICH_{50}$  verdien. Vi sier at testen er litt robust med henblikk på fjerning av LPS fra BPII når vi bruker gammelt blod.

**Oppsummering:** Testen er dag til dag reproduserbar og variasjon i  $ICH_{50}$  verdiene for testsubstansene er liten fra dag til dag.

Resultatene for LPS viser at ren LPS har ikke noen innflytelse eller aktivitet på testsystemet når startkonsentrasjonen er 100 ug/ml og når man bruker gammelt blod.

## **2) Brukt ferskt blod**

### **Forøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* 1:65

*Blodets alder:* 16 dager

*Startkonsentrasjon på både BPII rensset og ikke rensset for LPS :* 100 ug/ml

*Startkonsentrasjon for  $\Delta hIgG$ :* 20 ug/ml

*Startkonsentrasjon for LPS:* 100 ug/ml

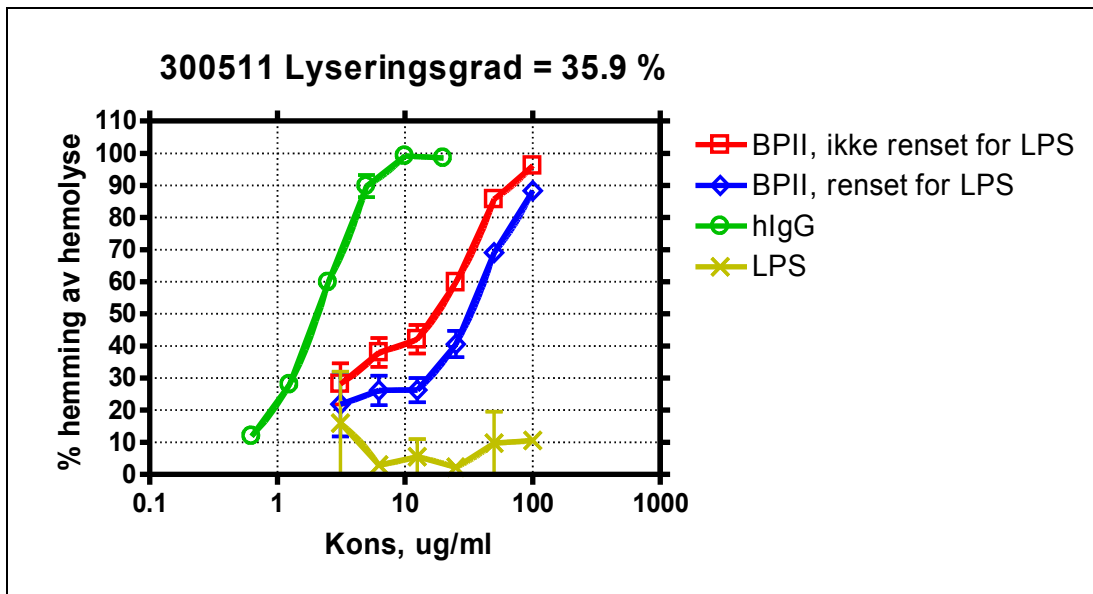
*Preinkubasjonstid:* 30 min

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 150 rpm

*Saueblod:* 7001

*Komplementkilde:* ECG



Figur 6-6: Doseresponskurver for testsustanser og ren LPS når man bruker *ferskt blod*.

Testsubstanser	ICH <sub>50</sub> verdiene i ug/ml
BPII er <i>ikke renset</i> for LPS innhold	18,2
BPII er <i>renset</i> for LPS innhold	33,3
ΔhIgG	2,1
LPS	Ikke aktivitet

Tabell 6-3: ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII, ΔhIgG og ren LPS når ble det brukt *ferskt blod*.

ICH<sub>50</sub> verdiene er litt mindre når vi bruker ferskt blod i forhold til gammelt blod både for BPII som er renset for LPS og ΔhIgG. Det er kanskje litt forskjell men det er sannsynligvis ikke statistisk signifikant (tabell 6.3).

BPII som er ikke renset for LPS er mer potent og er nesten 2 ganger mer biologisk aktivt enn ikke renset BPII. Her observeres samme situasjon som forrige test.

**Reproduserbarhet:** Dag til dag reproduserbarhet i testen ble observert når forsøket er utført flere ganger under samme forsøksbetingelser. ICH<sub>50</sub> verdiene for testsustansene og positiv kontrollen (ΔhIgG) viste seg å være nesten likt fra dag til dag. Dette viser at testen gir god reproduserbart.

**Robusthet:** Når vi renser BPII for LPS innhold ser vi at det skjer endring i testsystemet som innflyter på ICH<sub>50</sub> verdien. Disse endringene er ikke så stor siden vi bruker ferskt blod. Vi sier at testen er litt robust med henblikk på fjerning av LPS fra BPII når vi bruker ferskt blod.



**Total Oppsummering:** En total oppsummering av de to utførte testene viser at de to testene har god reproducerbarhet. Men de er litt robust med henblikk på LPS rensing fra BPII. Ren LPS som brukes her som en testsubstans sammen med gammelt eller ferskt blod har ikke aktivitet eller innflytelse på testsystemet.

Forurensningen av LPS som finnes i planter/pektiner vil ikke være så høy som man har testet her.

Men hvis vi bevisst kontaminerer testsubstansene  $\Delta$ hIgG og BPII med LPS bufferløsning (10ug/ml) så kan det hende at den har innflytelse på testsystemet. Da brukes testen som ble beskrevet i punkt 6.5.1 del 2 og 6.5.3.

Det er ikke observert statistisk signifikant forskjell for testsubstansene når man bruker ferskt eller gammelt blod i testen. Siden vi ikke har gjort en statistisk beregning, dermed kan vi ikke si at ferskt blod er bedre enn gammelt blod i dette tilfellet. Hvis man skal være helt sikker at gammelt blod fungerer dårligere enn ferskt blod må man kjøre flere forsøk (f.eks mer enn 10 forsøk) under samme betingelser.

### 6.5.3. LPS sin innflytelse på testsubstanser

For å se om den biologiske aktiviteten til BPII endrer seg med tilstedværelse av LPS eller ikke, tilsettes bevisst en bestemt mengde LPS (10 ug/ml) til BPII som er renset for LPS og resultatet sammenlignes med BPII som også er renset for LPS men ikke tilsatt noe LPS.

Så hensikten med dette forsøket er å se om tilstedværelse av LPS som en kontaminant i testsubstansen (her BPII) har noe innflytelse/aktivitet på komplementfikseringstest eller ikke. Dette gjelder også for  $\Delta$ hIgG (se punkt 6.5.1 del 2). Vi sammenligner to parallelle testsubstanser med hverandre.

Testene ble utført både med gammelt og ferskt blod fra samme sau. De ble analysert hver for seg for å se om blodets alder også har noe virkning på testsubstansens  $IC_{50}$  verdi eller ikke.

Som kontroll brukes både  $\Delta$ hIgG og BPII som er ikke tilsatt noe LPS, det vil si prøvene titreres i komplementbufferen (VB/BSA) som ikke inneholder LPS.

6.5.3.1.

**Titring av  $\Delta$ hIgG og BPII (renset) i en LPS bufferløsning (10 ug/ml).**

**1) Brukt gammelt blod**

**Forsøksbetingelser:**

Komplementfortynning: 1:55

Blodets alder: 63 dager

Startkonsentrasjon på både BPII renset og ikke renset for LPS : 100 ug/ml

Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG: 20 ug/ml

Konsentrasjon for LPS i bufferet : 10 ug/ml

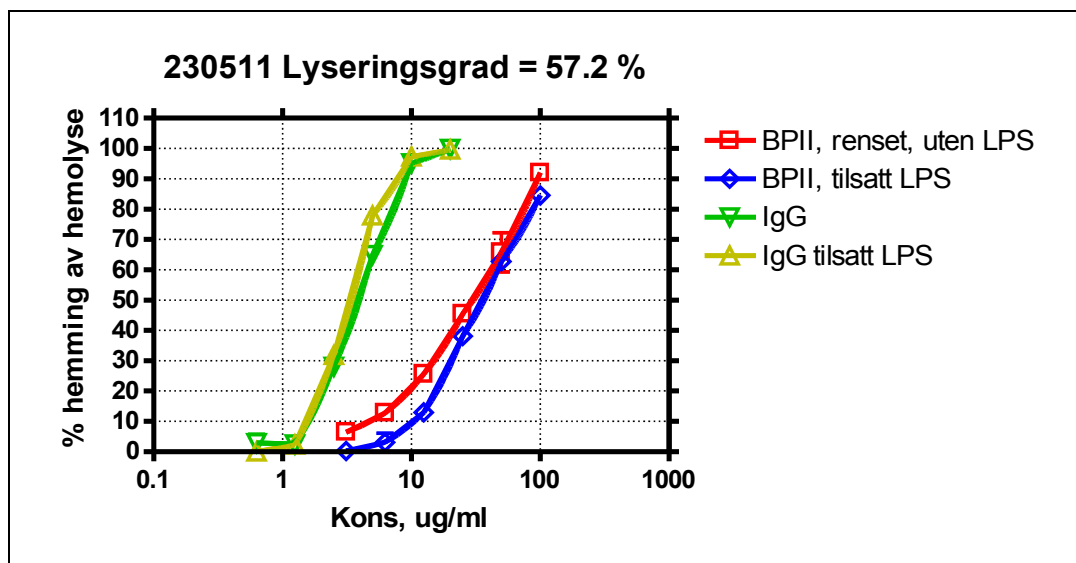
Preinkubasjonstid: 30 min

Temperatur i varmeskap: 37 °C

Ristehastighet: 150 rpm

Saueblod: 7001

Komplementkilde: ECG



**Figur 6-7:** Sammenligning av komplementfikseringsaktivitet av testsubstansene når det er brukt **gammelt blod**.

Testsubstanser	ICH <sub>50</sub> verdiene i ug/ml
BPII er renset for LPS, (ikke tilsatt LPS)	30,6
BPII er renset for LPS men tilsatt 10 ug/ml konstant LPS i løsningen	37,1
$\Delta$ hIgG ikke tilsatt LPS	4,0
$\Delta$ hIgG tilsatt LPS	3,5

**Tabell 6-4:** ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII,  $\Delta$ hIgG både med og uten LPS tilstedet. Brukt **gammelt blod**.

Figur 6-7 og tabell 6-4 viser resultatene for rensset BPII og  $\Delta$ hIgG både med tilsatt konstant mengde LPS og ikke tilsatt LPS. Her er brukt gammelt blod (63 dager).

Testen over ble utført flere ganger fra dag til dag og  $ICH_{50}$  verdien den ligger mellom;

- (30,6 ug/ml – 33,8 ug/ml) for BPII rensset for LPS
- (37,1 ug/ml – 46,6 ug/ml) for BPII rensset for LPS, men tilsatt konstant mengde LPS
- (3,2 ug/ml – 4,0 ug/ml) for  $\Delta$ hIgG ikke tilsatt LPS
- (3,2 ug/ml – 3,5 ug/ml) for  $\Delta$ hIgG tilsatt konstant LPS

Ved tilsetning av konstant mengde LPS løsning i systemet vil  $ICH_{50}$  verdien for BPII være litt større enn  $ICH_{50}$  verdien for BPII som ikke er tilsatt konstant LPS. Forskjellene her er veldig små og ikke signifikant.  $ICH_{50}$  verdiene for  $\Delta$ hIgG med og uten LPS er nesten like (tabell 6.4).

**Reproduserbarhet:** Det ble observert små forskjeller i  $ICH_{50}$  verdien for både BPII og  $\Delta$ hIgG med og uten LPS tilstedet fra dag til dag (forsøk til forsøk) under samme betingelser. Det viste seg at testen er dag til dag god reproduserbar.

**Robusthet:** Vi ser av resultatene at testen er robust for  $\Delta$ hIgG, men kanskje ikke så mye for BPII (med og uten tilsatt LPS) med henblikk på tilsetning av LPS i systemet.

**Oppsummering:** Tilstedværelse av LPS med en konstant konsentrasjon på 10 ug/ml har ikke så stor innflytelse på testsubstansenes aktivitet og dermed  $ICH_{50}$  verdiene når det gjelder  $\Delta$ hIgG og BPII og når vi bruker gammelt blod. Testen er robust for  $\Delta$ hIgG og kanskje for BPII i mindre grad. Reproduserbarhet ble også påvist for både BPII og  $\Delta$ hIgG.

## 2) Brukt ferskt blod

### **Forsøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* 1:65

*Blodets alder:* 17 dager

*Startkonsentrasjon på både BPII rensset og ikke rensset for LPS:* 100 ug/ml

*Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG:* 20 ug/ml

*Startkonsentrasjon for LPS:* 10 ug/ml

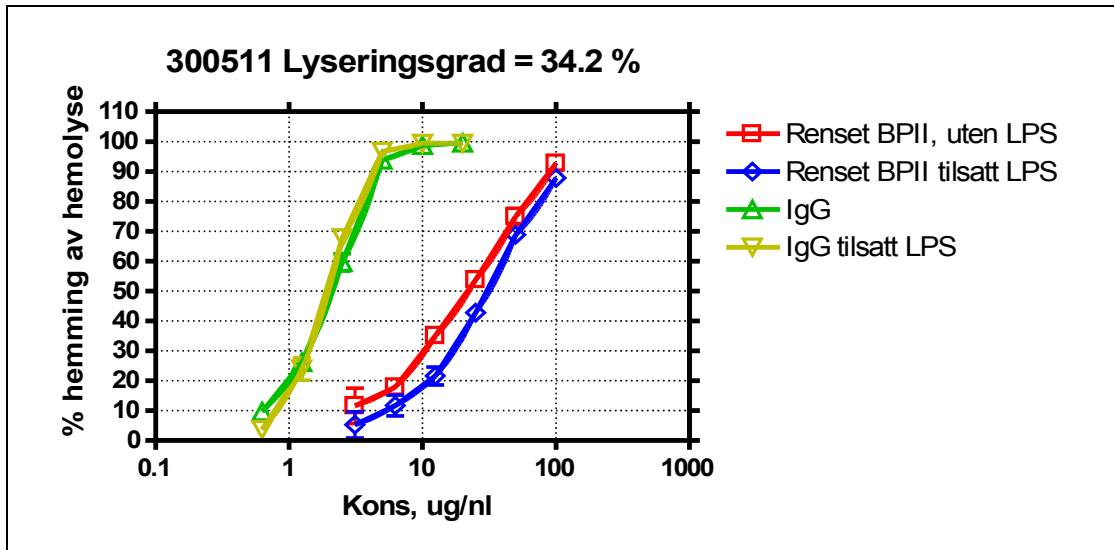
*Preinkubasjonstid:* 30 min

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 150 rpm

*Saueblod:* 7001

*Komplementkilde:* ECG



Figur 6-8: Sammenligning av komplementfikseringsaktivitet av testsubstansene når det er brukt **ferskt blod**

Testsubstanser	ICH <sub>50</sub> verdiene i ug/ml
BPII er renset for LPS ( <b>ikke tilsatt</b> LPS)	22.5
BPII er renset for LPS men <b>tilsatt</b> 10 ug/ml konstant LPS i løsningen	32,0
<b>ΔhIgG</b> <b>ikke tilsatt</b> LPS	2,1
<b>ΔhIgG</b> <b>tilsatt</b> LPS	2,0

Tabell 6-5: ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII, ΔhIgG både med og uten LPS tilstedet. Brukt **ferskt blod**.

Testen over ble gjort flere ganger fra dag til dag og ICH<sub>50</sub> verdien den ligger mellom;

- (21,7 ug/ml – 22,5 ug/ml) for BPII renset for LPS
- (25,6 ug/ml – 32 ug/ml) for BPII renset for LPS, men tilsatt konstant mengde LPS
- (2,1 ug/ml – 2,2 ug/ml) for ΔhIgG ikke tilsatt LPS
- (2,0 ug/ml – 2,0 ug/ml) for ΔhIgG tilsatt konstant mengde LPS

Ut fra doseresponskurvene over ser vi at ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII med og uten LPS tilstedet vil være litt forskjellig akkurat som i den første testen. Her er det litt forskjell mellom parallellene og det er ikke sikkert at den har noe påvirkning i testsystemet. ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG med og uten LPS de er helt like. Med andre ord ser vi at ved tilstedeværelse av LPS med en konstant mengde (10 ug/ml) så har den ingen innflytelse på testsubstansenes aktivitet og dermed ICH<sub>50</sub> verdien.

**Reproduserbarhet:** Dag til dag god reproduserbarhet er observert når det gjelder BPII eller ΔhIgG med og uten tilsatt LPS under samme forsøksbetingelser.

**Robusthet:** Vi ser av resultatene at testen er robust for  $\Delta$ hIgG, men kanskje ikke så mye for BPII (med og uten tilsatt LPS) med henblikk på tilsetning av LPS i testsystemet.

**Oppsummering:** Tilstedværelse av LPS med en konstant konsentrasjon på 10 ug/ml har ingen innflytelse på testsubstansenes aktivitet og dermed  $ICH_{50}$  verdiene når det gjelder  $\Delta$ hIgG og BPII og når vi bruker ferskt blod. Testen er robust for  $\Delta$ hIgG og kanskje for BPII i mindre grad. Reproduserbarhet ble også påvist for både BPII og  $\Delta$ hIgG.

**Total oppsummering** av disse to tabellene (tabell 6-4 og 6-5) viser at når man bruker ferskt blod i forsøket vil  $ICH_{50}$  verdiene for både  $\Delta$ hIgG og BPII reduseres i forhold til gammelt blod uavhengig av om det er LPS tilstedet eller ikke. Men forskjellene er veldig små og ikke signifikant. Det vil si at blodets alder ikke har veldig mye innflytelse på  $ICH_{50}$ . Reduksjon i  $ICH_{50}$  verdiene er mer tydelige for  $\Delta$ hIgG (nesten 2 ganger forskjell) enn BPII (liten forskjell). Disse to testene viser god reproduserbarhet for både BPII og  $\Delta$ hIgG (med og uten LPS tilstedet) når det er gammelt eller fersk blod. Testen er robust for IgG, men ikke så mye for BPII. Blodet alder kan ha mer betydning når det gjelder  $\Delta$ hIgG enn når det gjelder BPII med og uten LPS tilstede.

### 6.6. Styrken på risting under testen

Etter flere tester som er utført under komplementfikseringstesten oppstod ideen om å forandre ristehastigheten på risteplaten i varmeskapet under innkubering av platene fra rundt 150 rpm til 3 nye forskjellige ristehastighet. En serie prøver under samme betingelser ble testet for ingen risting (0-rpm), mellom risting (100-rpm) og kraftig risting (300-rpm). Målet var å se om risting har noen effekt eller ikke på testsubstansens komplementfiserende aktivitet og dermed  $ICH_{50}$  verdien.

#### Viktige punkter:

- For å hindre lekkasje fra brønnene under sterk risting festes forseglingssteipet godt på toppen av mikrotitterplaten.
- Mikrotitterplaten festes på underlaget med teip. Under forsøkene ble det oppdagatat hvis platen ble festet så hardt på underlaget så vil platen bevege seg med samme hastighet som underlaget. Dermed vil væsken i brønnene komme lett i kontakt med forseglingssteipet og mest sannsynlig vil det skje lekkasje av løsningen. Hvis vi fester platen litt løs med underlaget så kan vi skape litt friksjon mellom mikrotitterplaten og underlaget som gjør at platen beveger seg med mindre hastighet enn underlaget. Dette er ikke en standardisert metode, men er noe som er funnet ut når flere tester ble utført.
- En annen ting som skjer i en sånn situasjon (når platen festes litt løs på underlaget) det er at blodcellene vil ikke falle ned til bunnen i løpet av inkubasjonstiden. Dette er spesielt viktig når man rister platen med 300-rpm.

Hele hensikten er å holde blodcellene i systemet under inkubasjonstiden uten at de ble sedimentert til bunnen.

Under sensibilisering av saueblodceller og bestemmelsen av komplementfortynningen brukte en ristehastighet på 100 rpm. Resultatet ble brukt under de tre forskjellige ristehastighetene.

## Forsøksbetingelser:

Komplementfortynning: 1:55

Blodets alder: 30 til 35 dager

Startkonsentrasjon på BPII som testsubstans: 48 ug/ml

Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG: 7,1 ug/ml

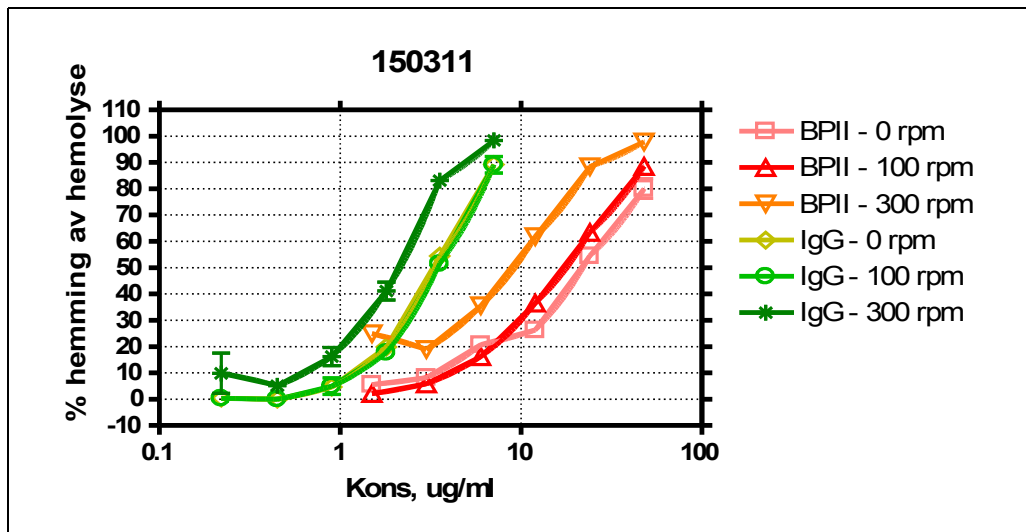
Preinkubasjonstid: 30 min

Temperatur i varmeskap: 37 °C

Ristehastigheter: 0 rpm, 100-rpm, 300-rpm

Saueblod: 7001

Komplementkilde: ECG



Figur 6-9: Doseresponskurver for testsubstanser som er testet i de tre forskjellige ristehastighetene ved 0, 100 og 300 rpm.

Testsubstanser	ICH <sub>50</sub> verdiene i ug/ml
BPII med 0-rpm	22
BPII med 100-rpm	18
BPII med 300-rpm	9,3
$\Delta$ hIgG med 0-rpm	3,7
$\Delta$ hIgG med 100-rpm	3,5
$\Delta$ hIgG med 300-rpm	2,2

Tabell 6-6: ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII,  $\Delta$ hIgG.

Resultatene over viser at ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII ble redusert kraftig ved full risting (300 rpm), i forhold til null risting og mellomristing. Så kraftig risting har innflytelse på testsystemet når det gjelder BPII. Det vil si BPII er mer sensitivt når det er full risting. Men når det gjelder  $\Delta$ hIgG den har ikke noe betydelig innflytelse på testsystemet og ICH<sub>50</sub> verdiene for IgG i alle forsøkene er det nesten det samme. Samme forsøk ble utført 3 ganger.

**Reproduserbarhet:** ICH<sub>50</sub> verdiene for både BPII og ΔhIgG var nesten det samme fra forsøk til forsøk ved de forskjellige ristehastighetene. Det vil si testen er dag til dag reproduserbar for både BPII og ΔhIgG.

**Robusthet:** Testen er robust for ΔhIgG, men ikke for BPII med henblikk på variasjon av ristehastighet.

**Oppsummering:** Testen over vil si at kraftig risting har en betydning for BPII og den har innflytelse på BPII resultatene, men har ikke så mye betydning for IgG.

For å bekrefte funnet over kan videre undersøkelse med andre komplement, saueblodceller og testsubstanser utføres på nytt ved å sammenligne resultatene med hverandre.

### 6.7. Endring i amboceptormengde i komplementfikseringstest

Under sensibilisering av SRBC bruker kaninantistoff såkalte amboceptor.

I forsøkene under ble det brukte 10ul, 15ul og 20ul amboceptor mengde.

Hensikten med denne testen er å se på om varierende sensibiliseringsgrad (antistoffmengden blir mer eller mindre) har noe innflytelse på testsystemet eller ikke med forskjellige hemolyseringsgrader (40, 50 og 60 %) av de røde saueblodcellene.

Under bestemmelse av fortykning av komplementkilde ble SRBC ble sensibiliserte med 10, 15 eller 20 ul amboceptor. Komplementfortynningene for hver av disse ble benyttet for å oppnå 50 % hemolyse og deretter bestemte 40 og 60 % hemolyse (Tabell 6-7).

#### **Forsøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* 1:55

*Blodets alder:* 30 til 35 dager

*Startkonsentrasjon på PMII som testsubstans:* 250 ug/ml

*Startkonsentrasjon for ΔhIgG:* 10 ug/ml

*Preinkubasjonstid:* 30 min

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 300-rpm

*Saueblod:* 7001

*Komplementkilde:* ECG



### Ulike amboceptor (10 ul, 15ul, 20ul) ved forskjellige % hemolyse (40 %, 50 %, 60 %)

% hemolyse	sau	Fortynning av komplementkilde når man bruker 10, 15 og 20ul amboceptor			Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: PMII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: ΔhIgG i ug/ml		
		10 ul	15 ul	20 ul	10 ul	15 ul	20 ul	10 ul	15 ul	20 ul	10 ul	15 ul	20 ul
40 %	7001	1:55	1:65	1:60	<u>45.6</u> %	<u>31.5</u> %	<u>41.8</u> %	.....	8	10.2	1.8	1.8	2
50 %	X	1:50	1:55	1:50	<u>50</u> %	<u>43.3</u> %	<u>52.7</u> %	11	11	23.1	2.5	1.9	2.8
60 %	X	1:40	1:50	1:45	<u>85.7</u> %	<u>60</u> %	<u>65.5</u> %	17.9	13.2	21.2	3.5	2.6	3.1

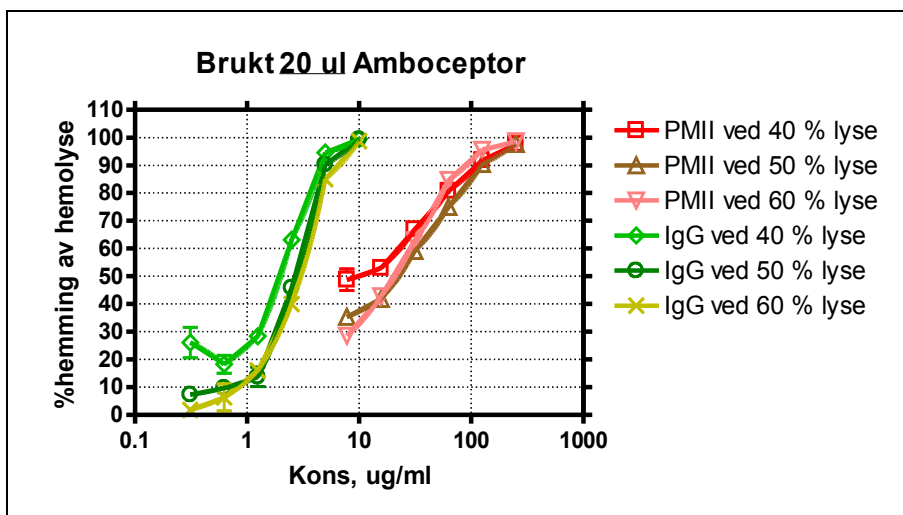
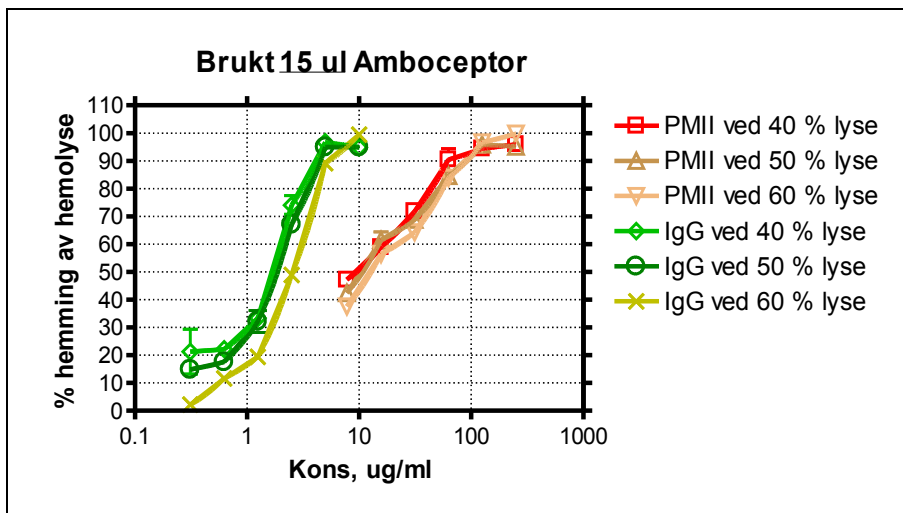
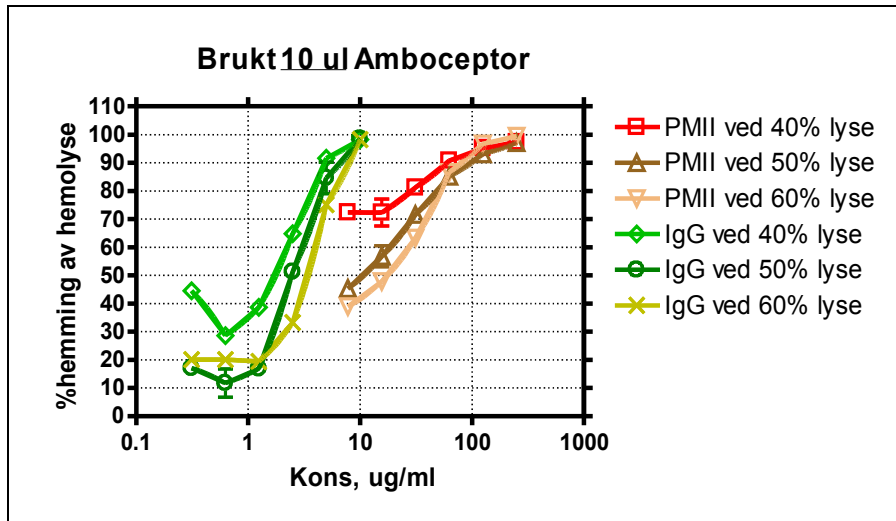
**Tabell 6-7:** Tabellen viser ICH<sub>50</sub> verdiene for PMII og ΔhIgG og de forskjellige lyseringsgradene som ble oppnådd ved tilstedeværelse av forskjellige amboceptor mengde ved forskjellige hemolyse.

Resultatene fra tabellen viser at det er ikke så stor forskjell mellom komplementfortynningene ved tilstedeværelse av forskjellige antistoffmengder i de forskjellige % hemolyseringer (40, 50 og 60 %). Så serum mengden som brukes for å oppnå de ulike hemolyseringene ikke er veldig mye avhengig av amboceptor konsentrasjonen.

De lyseringsgradene som observeres under hver hemolyse er litt forskjellige enn det man forventer å se. Man forventer å se 40, 50 og 60 % hemolyseringer.

En grunn for det, det er at noen ganger er det vanskelig å finne den eksakte verdien som tilsvarer 50 % hemolysering under titeringskurve (punkt 5.2.3.5), noe som kan virke på bestemmelsen av fortynning av komplementkilde som gir 40 % og 60 % hemolysering.

En annen grunn kan det være blodets alder. Det er slik at når vi har et gammelt blod må man bruke mer komplementserum i testsystemet (d.v.s mindre komplementfortynning) for å oppnå 50 % hemolyse enn når det er ferskt blod (d.v.s mer komplementfortynning). Se for eksempel på resultater under punkt 6.5.



**Figur 6-10:** Doseresponskurver for testsubstansen (PmII) og positiv kontroll ( $\Delta$ hIgG) som ble testet med samme saueblodceller som er sensibilisert med forskjellige mengder amboceptor nemlig **10**, **15** eller **20 ul**. Ved ulike % hemolysering.

Tabell 6-7 viser at lyseringsgradene varierer med økende % hemolyse. En forklaring for dette er at ved høyere % hemolyse brukes mer komplement i systemet enn når det er mindre % hemolyse (F.eks 40 eller 50 %) for å oppnå samme effekt. Dette gjør at mye av de sensibiliserte saueblodcellene hemolyseres fordi at det er liten substans tilstedet for å kunne påvirke hemmende på komplementet og dermed vil lyseringsgraden økes på grunn av at det er ikke nok substans i systemet i forhold til komplement. Verdiene for hemolyseringsgradene i de andre forsøkene som ble utført (resultatene er ikke vist her) varierte på samme måte som her.

I dette forsøket og de andre utførte forsøkene PMII varierte litt opp og ned ved de forskjellige % hemolysene.

De  $IC_{50}$  verdiene for aggregert IgG de er ganske stabile og det er veldig liten variasjon mellom tallene.

**Oppsummering:** Testene over vil si at det skal ikke være så mye forskjell når man bruker 10, 15 eller 20 ul amboceptor i forsøkene.  $IC_{50}$  verdiene vil påvirkes mer eller mindre med økende % hemolyse som nevnt over.

**Reproduserbarhet:** Selve forsøket ble utført 3 ganger under samme betingelser og resultatene var nesten det samme for de forskjellige % hemolysene i de forskjellige amboceptor mengdene. Det vil si testen er dag til dag reproduserbart for PMII og  $\Delta$ hIgG.

**Robusthet:** Testen er robust for  $\Delta$ hIgG under hver antistoffmengde og under hver % hemolyse. Testen er også robust for PMII i den testen og de andre testene som er utført.

### 6.8. Temperaturendring i komplementfikseringstest sammen med ulike serumkomplementkilde.

Varmeskapet som tidligere ble brukt under mange av de utførte forsøkene, viste seg å variere opp eller ned 2 til 3 grader celsius. Den normale temperaturen i varmeskapet skal det være 37 °C under inkubasjonstiden hvis ikke noe annet er gitt.

For å se om temperaturendring (enten under eller over 37 °C i varmskapet) har noe innflytelse eller betydning på testresultater ble det bestemt å kjøre noen forsøk med tre ulike temperaturer på 35, 37 og 40 °C under ellers samme betingelser. En helt nytt varmeskap som gir mer stabil temperatur ble benyttet under forsøkene.

## Forsøksbetingelser:

Komplementfortynning: Se tabellen under

Blodets alder: 42 til 48 dager

Startkonsentrasjon på PMI som testsubstans: 250 til 500 ug/ml

Startkonsentrasjon på BPII som testsubstans: 240 til 340 ug/ml

Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG: 10 ug/ml

Preinkubasjonstid: 30 min

Temperaturendring i varmeskap: 35, 37 og 40 °C

Ristehastighet: 300-rpm

Saueblod: 7001

Komplementkilder: MK, ACV og ECG

### Ulike komplement (MK, ACV, ECG) og ulike temperatur (35, 37, 40 °C) når preinkubasjonstid er 30 minutter

Temp	sau	Fortynning av komplementkildene			Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: PMII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: BPII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: $\Delta$ hIgG i ug/ml		
		MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG
35 °C	7001	1:45	1:60	1:70	42 %	45,2 %	32,4 %	.....	79,8	11,9	....	80,5	11	3,4	2,3	1,6
37 °C	X				44 %	40,4 %	15,2 %	207	37,4	8,0	259	50,2	11	3,8	1,9	1,3
40 °C	X				38,8 %	26,1 %	7,7 %	298	16,4	.....	184	21,3	5,0	3,5	1,6	1,2

**Tabell 6-8:** Tabellen viser ICH<sub>50</sub> verdiene for PMII, BPII og  $\Delta$ hIgG og lyseringsgrader for de ulike komplementkildene når man bruker forskjellige temperatur i varmeskapet.

Hensikten med dette forsøket er å finne ut om temperaturendring har noe innflytelse på testsystemet eller ikke. Samtidig ønsker man å sammenligne følsomheten mellom PMII og BPII i de forskjellige temperaturene.

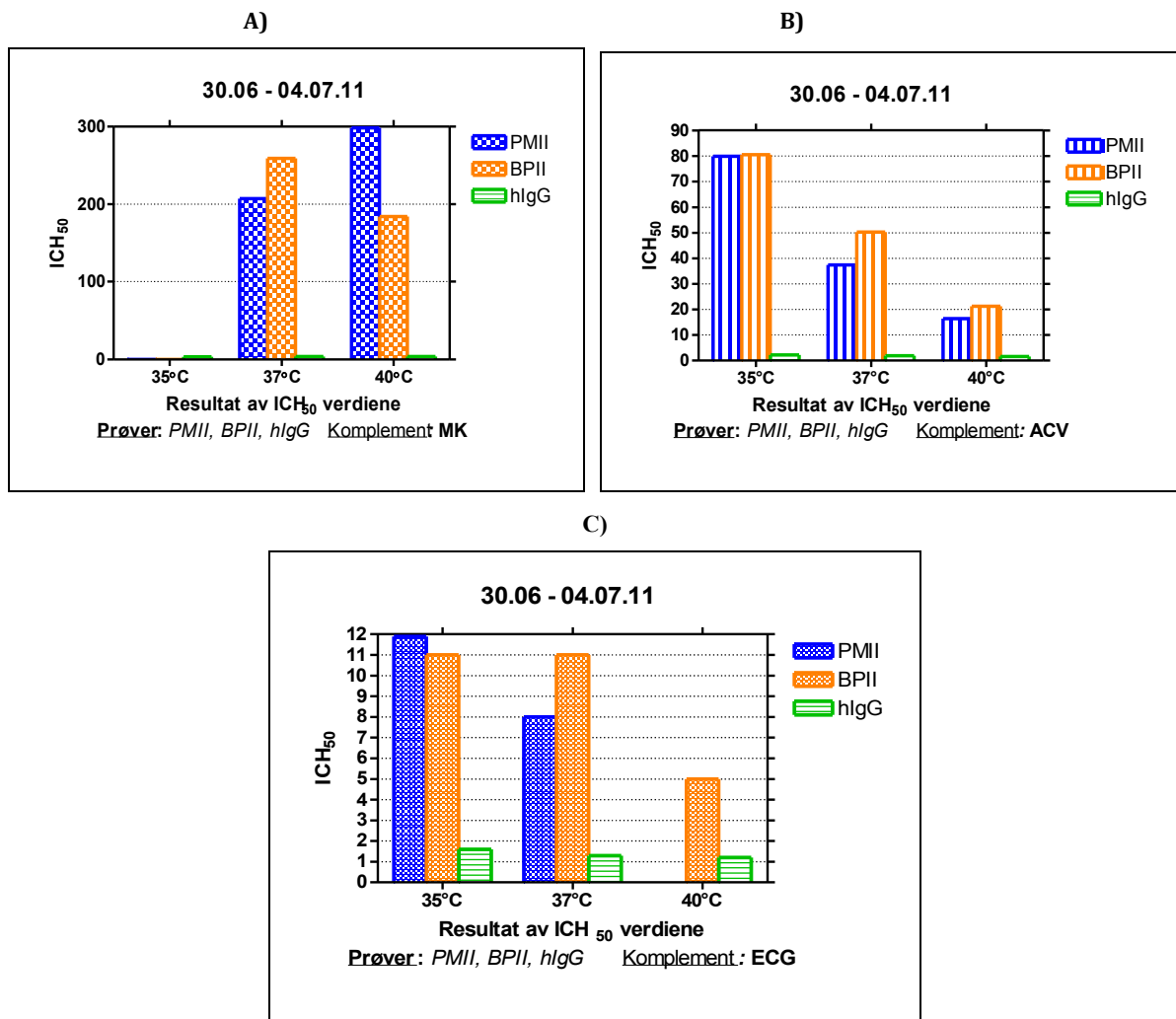
Fortynning av komplementkildene ble bestemt ved 37 °C i 30 minutter for de ulike komplementkildene. Resultatene ble benyttet i de tre forskjellige temperaturene.

Det ble observert mer eller mindre variasjon for lyseringsgradene for disse tre komplementkildene ved de ulike temperaturene i alle testene som ble utført. Vi observerer at lyseringsgrader for ECG komplementet varierer og reduseres betydelig med økende temperatur. Men variasjoner er mindre for ACV og MK i forhold til ECG. Det er vanskelig å forstå hvorfor det er sånn. En hypotese kan være kanskje på grunn av stabiliteten av ECG serumet. Dermed anbefales å gjøre forsøk på stabilitet av fortynnet serum av ECG og kanskje ACV serumene.

ICH<sub>50</sub> verdiene for testsubstansene (PMII og BPII) varierte mer eller mindre avhengig av komplementkildet med økende temperatur. Når det gjelder MK komplementet er det ikke så mye endring og det er vanskelig å bruke dette serumet på grunn av ujevn varisjon. Når det er ACV komplementet så ser vi at det er store endringer i ICH<sub>50</sub> verdiene når temperaturen økes. Når det gjelder ECG komplementet er det ikke så mye endring, men den er kanskje så følsom .

ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG viser relativt liten endring for alle de tre komplementkildene. Variasjonen i ICH<sub>50</sub> verdiene er små under de tre forskjellige temperaturen endringene.

Både i dette forsøket og de to andre forsøkene (resultatene er ikke vist her) som ble utført under samme betingelser, ble det observert at når temperaturen økes kunne ikke ECG komplementet tåle høyere temperaturer enn 37 °C og den begynner å bli mer følsom. Konsekvenser for dette er at man får ingen eller veldig liten ICH<sub>50</sub> verdi for testsubstansene (BPII og PMII ).



**Figur 6-11:** Figurene over viser % hemming av hemolyse når man bruker forskjellige temperaturer på 35, 37 eller 40 °C.

### Reproduserbarhet:

Figur 6-11 A) viser store variasjoner i  $ICH_{50}$  verdiene både for BPII og PMII fra gang til gang når det gjelder MK komplementet, men har en stabil  $ICH_{50}$  verdi for  $\Delta hIgG$ . Den er ikke dag til dag reproduserbart når det gjelder både BPII og PMII. Den er dag til dag reproduserbart for  $\Delta hIgG$ .

Figur 6-11 B) viser at når det gjelder ACV serumkomplementkilden ble det observert jevnt redusering av  $ICH_{50}$  verdiene både for BPII, PMII og  $\Delta hIgG$  med økende temperatur både i dette forsøket og de to andre forsøkene. Ut fra resultatene ses at testen er dag til dag reproduserbart for BPII, PMII og  $\Delta hIgG$ .

Figur 6-11 C) viser at variasjon i  $ICH_{50}$  verdiene for ECG serumkomplementkilden når det gjelder BPII, PMII og  $\Delta hIgG$  er veldig liten og er ganske stabilt fra forsøk til forsøk. Testen er dag til dag godreproduserbar for BPII, PMII og  $\Delta hIgG$ .

### Robusthet:

- Når det gjelder MK serumkomplementkilden testen er ikke robust for PMII og BPII, men er robust for IgG med henblikk på temperaturendring i varmeskapet.
- Når det gjelder ACV serumkomplementkilden testen er ikke robust for PMII og BPII, men den er robust for IgG med henblikk på temperaturendring i varmeskapet.
- Når det gjelder ECG serumkomplementkilden testen er kanskje litt robust for PMII og BPII, men testen er robust for IgG med henblikk på temperaturendring i varmeskapet.

### Følsomhet:

PMII og BPII viser seg å være nesten like følsomme for ACV og ECG komplementkildene her i dette forsøket og de to andre forsøkene. Men når det gjelder MK komplementet vil variasjonene være enda større og for å oppnå  $ICH_{50}$  verdiene for BPII og PMII må man bruke veldig mye større konsentrasjon av testsubstansene enn for de to andre komplementene. Det viser at dette komplementet er ikke så bra for å kunne bruke det når det gjelder temperaturendring.

**Oppsummering:** Resultatene over vil si at temperaturendring kan virke på testen avhengig av hvilken serumkomplementkilde man bruker og hvor mye temperaturen er økt.

$ICH_{50}$  verdiene for BPII og PMII reduseres mer (ACV komplementet) eller mindre (ECG komplementet) med økende temperatur, men er ustabil for MK serumkomplementkilden.

ACV serumkomplementkilden viste seg å være mer sensitivt med økende temperatur enn de to andre serumkomplementkildene når vi bruker BPII eller PMII.

Resultatene viser at både PMII og BPII er like følsomme og de blir mer sensitive når temperaturen økes. Men sensitiviteten er avhengig av hvilket serumkomplementkilde som er til stedet. Variasjon i  $ICH_{50}$  verdiene for  $\Delta hIgG$  er relativt liten og nesten stabilt fra forsøk til forsøk avhengig av serumkomplementkilde.

### 6.9. Forskjell i preinkuberingstid mellom prøvene og komplementserumkilder

Hensikten med dette forsøket er å se på at ulike preinkubasjonstider (30, 45 og 60 minutter) har noe innflytelse på testresultatene eller ikke.

I tillegg vil vi sammenligne BPII og PMII for å se om de er like følsomme for variasjon i preinkubasjonstiden og variasjon i komplementkilder.

De to testsubstansene og aggregert hIgG skal sammenlignes i forhold til hverandre. Aggregert hIgG fungerer som en positiv kontroll (for de andre testsubstansene) for å se på at systemet fungerer til hensiktene. Aggregert IgG virker aktiverende men ikke hemmende via den klassiske veien.

Testen er tidligere utført av Susanne Alban og medarbeidere i 2002. Det ble brukt helt andre reagenser, komplementer og de brukte kanineblodceller for å se om testsubstansen har aktiverende eller hemmende effekt i testsystemet.

Komplementfortynninger for 30, 45 og 60 minutter (preinkubasjonstid) ble bestemt for hvert komplementserum.

#### **Forsøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* Se tabellen under

*Blodets alder:* 40 til 45 dager

*Startkonsentrasjon på PMII :* 250 til 500ug/ml avhengig av serumkomplementkilde

*Startkonsentrasjon på BPII :* 240 til 340 ug/ml avhengig av serumkomplementkilde

*Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG:* 10 ug/ml

*Preinkubasjonstid:* 30, 45 og 60 minutter

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 300-rpm

*Saueblod:* 7001

*Komplementkilder:* MK, ACV og ECG

### Ulike preinkubasjonstid (30, 45 og 60 min) og ulike komplementkider (MK, ACV, ECG) tilstede

Preinkubasjons tid	sau	Fortynning av Komplementkildene			Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: PMII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: BPII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: ΔhIgG i ug/ml		
		MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG	MK	ACV	ECG
30 min	7001	1:45	1:60	1:70	47,1 %	51 %	41,8 %	.....	50	17,5	240	44,2	17	2,8	2,0	1,7
45 min	X	1:45	1:55	1:60	47,1 %	54,2 %	36,9 %	187	21,4	8,3	154	23,5	9,0	2,9	1,5	1,6
60 min	X	1:45	1:50	1:50	42,3 %	66,1 %	46,1 %	151	5,5	5,0	84,1	6,7	5,1	2,1	1,0	1,7

**Tabell 6-9:** Tabellen viser ICH<sub>50</sub> verdiene for PMII, BPII og ΔhIgG ved de tre forskjellige preinkubasjonstider, når man bruker tre forskjellige komplementkilder.

De komplementfortynningene som er funnet over er de samme for MK, men er forskjellige for ECG og ACV. De reduseres med økende preinkubasjonstid. Vi kan si det ble brukt mer komplement for ECG og ACV og fortynningen er avhengig av preinkubasjonstid.

Når vi sammenligner tabell 6-8 og 6-9 ser at lyseringsgraden for ECG i tabell 6-9 er ikke endret mye i forhold til tabell 6-8, dette viser at ECG serumet er egentlig stabilt, men når preinkuberingstiden økes så vil den være mer sensitiv. Dette er noe som gjør det vanskelig å diskutere hvorfor er det sånn. En hypotese kan være at reaksjonshastigheten mellom testsubstansen og ECG komplementkilden er så lav og derfor tar det lang tid for å få full effekt.

ICH<sub>50</sub> verdiene for PMII og BPII varierer mer (ACV viser en stor endring) eller mindre (ECG litt endring) avhengig av komplementkilden med økende preinkubasjonstid. De blir mer sensitive med økende preinkubasjonstid og ICH<sub>50</sub> verdiene blir mindre. Men det ble observert ujevn variasjon for MK komplementkilden.

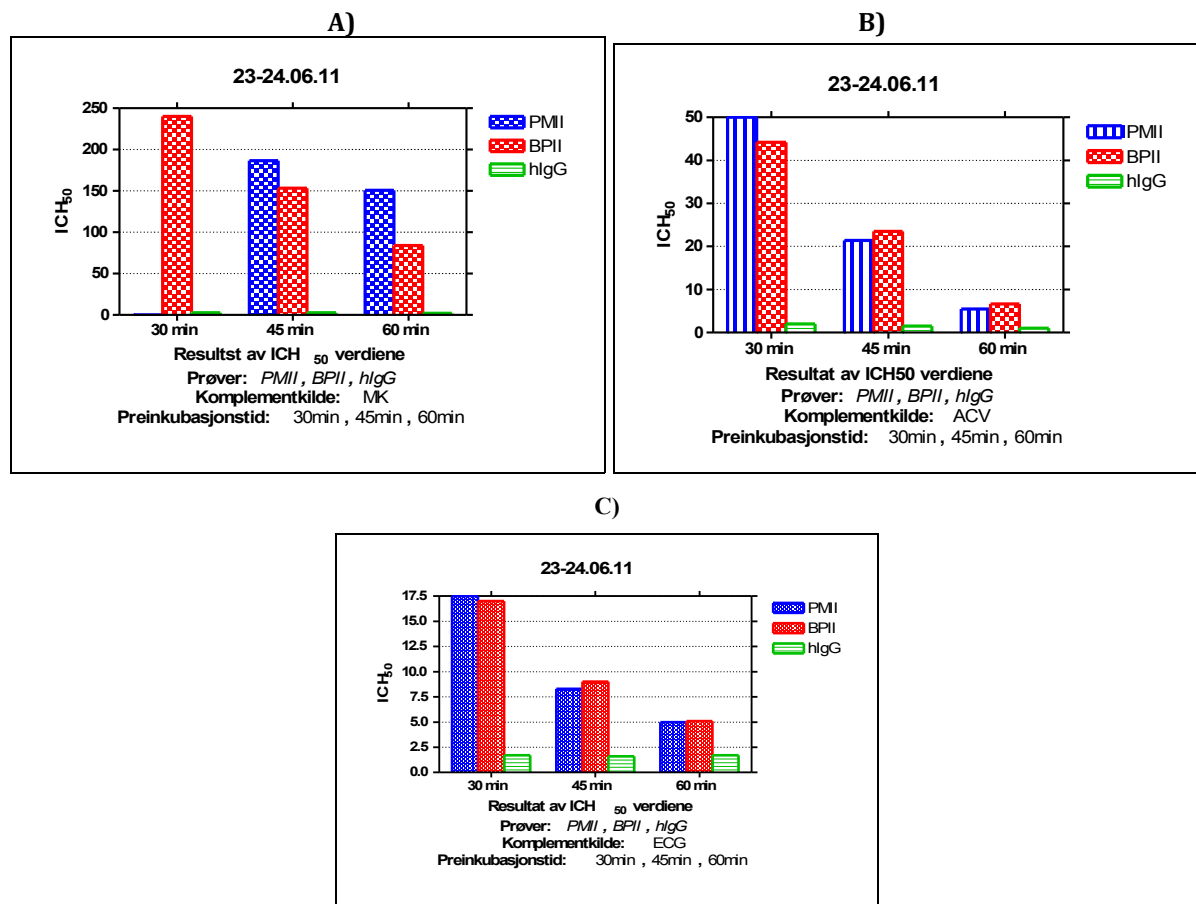
ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG er relativt liten og nesten stabil for alle de tre komplementkildene ved de forskjellige preinkubasjonstidene både i dette forsøket og de andre forsøkene (ikke vist her) som ble utført. Vi kan si at ΔhIgG reagerer mye fortere og etter 30 minutter alt er brukt.

**Reproduserbarhet:** Det ble observert dag til dag god reproduserbarhet for PMII og BPII for både ECG og ACV komplementkildene men ikke for MK under samme preinkubasjonstid. Testen er reproduserbar for både ECG og ACV komplementkildene, men ikke for MK komplementet.



## Robusthet:

- Når det gjelder ECG serumkomplementkilden og PMII, BPII testen er litt robust, men for IgG testen er robust med heblikk på variasjon av preinkubasjonstiden.
- Når det gjelder ACV serumkomplementkilden og PMII, BPII testen er ikke robust, men for IgG testen er robust med heblikk på variasjon av preinkubasjonstiden.
- Når det gjelder MK serumkomplementkilden og PMII, BPII testen er ikke robust, men testen er robust for IgG, med heblikk på variasjon av preinkubasjonstiden.



**Figur 6-12:** Figurene over viser % hemming av hemolyse i forskjellige **preinkubasjonstid** på **30, 45 og 60** minutter med ulike komplementkilder og forskjellige testsubstanser.

**Oppsummering** : Serumet og pektinene (BPII og PMII) blir enda mer sensitive når preinkubasjonstiden økes. Graden av sensitivitet er avhengig av hvilket serum som ble brukt. Aktiveringshastigheten av komplement er veldig hurtig for aggregert IgG så vil alt komplementet brukes i løpet av 30 minutter. Dermed er det ingen komplement til videre bruk i 45 eller 60 minutter preinkubasjonstid. Det vil si preinkubasjonstid ikke påvirker veldig mye på inkubasjon av aggregert IgG og serumkomplementkilden. Aktiveringshastigheten ser ut til å være lav for

BPII og PMII og den er avhengig av tilstedværelse av type komplementkilden som benyttes i testen. Det er slik at etter 30 minutter preinkubasjon har ikke pektinene gjort jobben sin. Dermed vil disse pektinene bli mer sensitiv videre ved preinkubering i 45 eller 60 minutter og vi får lavere  $ICH_{50}$ .

Resultatene viser at aggregert IgG og testsubstansene oppfører seg forskjellig i testsystemet.

Tidligere studier av Professor Michaelsen og medarbeidere (Michaelsen, T. E., et al., 2000) viste at PMII er en komplementaktivator og den aktiverer komplementet via både klassiske og alternative veier. Det er brukt metode A (fortynnet serum) og det viste seg å være 200-folds variasjon i sensitivitet av  $ICH_{50}$  fra ulike personer som brukes til komplementkilde. Samme personserum ble brukt mot aggregert IgG og  $ICH_{50}$  variasjonen her var veldig liten.

I dette forsøket viste både PMII og BPII seg å være nesten like følsom når vi bruker samme komplement i samme preinkubasjonstid. Siden PMII har vist seg å være komplementaktiverende for både klassiske og alternative veien, så har mest sannsynlig også BPII samme komplementaktiverende effekt som PMII.

Inngjerdingen og medarbeidere (Inngjerdingen, K. T., et al., 2005) har tidligere testet de to testsubstansene sammen med andre BPII fraksjoner og de har funnet at BPII er mer aktiv enn PMII, men her er det omvendt. Dette kan skyldes mest sannsynlig at de har brukt den BPII-en fra en annen batch enn det som ble brukt her. Den kan være plukket på en annen årstid på et annet sted. For å finne svaret er videre forsøk nødvendig med samme betingelser som over av de to testsubstansene.

**Oppsummering av testen:** Preinkubasjonstiden har innflytelse på testsystemet når det gjelder PMII og BPII og innflytelsen er avhengig av komplementkilder og deres interaksjon med testsubstans og interaksjon med indikatorsystemet. Den har veldig liten innflytelse når det gjelder  $ICH_{50}$  verdien for  $\Delta hIgG$  i de forskjellige preinkubasjonslengene.

## 6.10. Test av ulike saueblod ved ulike hemolysering i forskjellige preinkubasjonstid

De ulike saueblodceller som brukes i komplementfikseringstesten er biologiske materialer som kan variere fra sau til sau med blodets alder.

Målet med dette forsøket er å se på hvor mye er det variasjon mellom  $\Delta$ hIgG i forhold til BPII når vi bruker de ulike saueblodcellene ved de ulike % hemolysene. I tillegg ønsker å se på variasjon mellom sauene. Vi ønsker å sammenligne blodceller fra tre sauer nemlig 7001, 0024 og 6110.

### 6.10.1. Sau Nr: 7001

Komplementfortynningen ble beregnet i 30 minutter preinkubasjonstid for 50 % hemolyse.

Utfra dette beregnet komplementfortynningene for 40% og 60 % hemolyse. Resultatene ble brukt for preinkubasjonstider i 30, 45 og 60 minutter i hovedtesten.

#### **Forsøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* Se tabellen under

*Blodets alder:* 35 dager

*Startkonsentrasjon på BPII som testsubstans:* 48 ug/ml

*Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG:* 10 ug/ml

*Preinkubasjonstider:* 30, 45 og 60 minutter

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 300-rpm

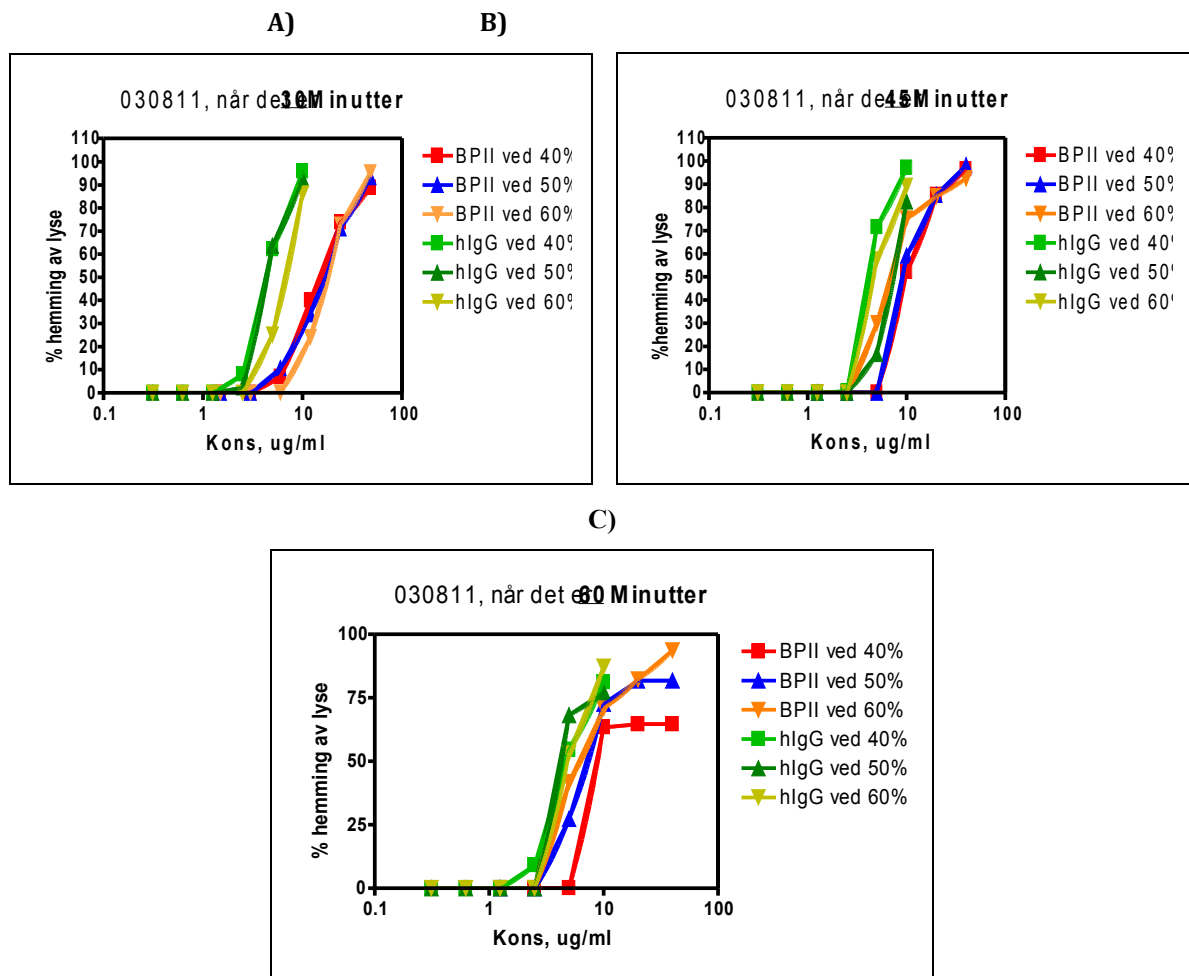
*Saueblod:* 7001

*Komplementkilde:* ECG

### Ulike hemolysering (40 %, 50 %, 60 %) i forskjellige preinkubasjonstid (30, 45 og 60 min) når det er sau Nr:7001

% hemolyse	Sau	Fortynning av komplementkilde	Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: BPII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: $\Delta$ hIgG i ug/ml		
			30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min
40 %	7001	1:60	32,5%	9,3 %	0,8 %	15,6	9,9	9,0	4,4	4,2	4,8
50 %	X	1:50	48,5%	14,8%	1,6 %	17,1	9,2	7,5	4,4	7,5	4,3
60 %	X	1:40	65 %	24,4%	5,3 %	18,4	7,2	6,4	7,0	4,7	4,9

**Tabell 6-10:** Tabellen viser resultater for hemolyseringsgrader og ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII og  $\Delta$ hIgG ved de forskjellige preinkubasjonstidene og de ulike % hemolysene når man bruker sau Nr: 7001.



**Figur 6-13:** Figurene over viser % hemming av hemolys når man bruker forskjellige preinkubasjonstider på 30, 45 og 60 minutter med de ulike % hemolysene. Når det er sau Nr: 7001.

Dette forsøket er utført 2 ganger under samme forsøksbetingelser.

Tabellen viser en god del variasjon i lyseringsgrader ved de ulike inkubasjonstider.

Ut fra analysegraden observeres at fortytning av ECG komplementserumet reduseres avhengig av økende % hemolyse og dermed vil mer komplement brukes i systemet.

Lyseringsgradene reduseres veldig mye med økende preinkubasjonstiden for hver av de % hemolysene. En hypotese for dette kan det være at serumet og komplement komponenter er så pass ustabil ved høyere preinkubasjonstid enn når det er i kortere preinkubering. For å bekrefte eller avkrefte denne hypotesen kan vi innkubere ufortynnet ECG serumet i 30, 45 og 60 minutter for å vise at serumet er stabilt eller ustabil når man innkuberer serumet med prøven. Men når komplementet er fortynt kan det hende at den ble mer ustabil.

Den observerte  $IC_{50}$  verdiene for BPII varierer med nesten 2 til 3 ganger forskjell. Det vil si BPII blir mer sensitivt når det er lengst preinkubasjonstid både ved 40, 50 og 60 % hemolyse. Dette tyder på at BPII kan ha komplementaktiverende aktivitet sånn som  $\Delta hIgG$ .

ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG viser at det er en del variasjon, men den varierer relativt lite avhengig av % hemolyse og preinkubasjonstid. Det viser seg at reaksjonshastigheten til ΔhIgG er veldig hurtig og alt brukes hurtig i løpet av 30 minutter og dermed er det ingen endring av resultater ved å forlenge preinkubasjonstiden til 45 eller 60 minutter når det gjelder ΔhIgG.

Det andre forsøket (resultatet er ikke vist her) under samme forsøksbetingelser som over, viste også akkurat den samme forandringen som i dette forsøket.

**Oppsummering:** Testen viser at preinkubasjonstiden mellom 30 og 60 minutter har store innflytelse på lyseringsradene. Det vil si at følsomheten øker med økende preinkubasjonstid når det gjelder ECG som serumkomplementkilde.

Preinkubasjonstiden har liten innflytelse på ΔhIgG og BPII.

**Reproduserbarhet:** Ut fra resultatene når det gjelder BPII og ΔhIgG så vil testen være dag til dag reproduserbart med hensyn til preinkubasjonstider og % hemolyse.

**Robusthet:** Testen er robust når det gjelder både BPII og ΔhIgG med henblikk på hver preinkubasjonstid og % hemolyse.

### 6.10.2. Sau Nr: 0024

Fortynning av komplementkilden ble beregnet i 30 minutter preinkubasjonstid for 50 % hemolyse. Utfra dette beregnet komplementfortynningene for 40 % og 60 % hemolyse. Resultatene ble brukt for preinkubasjonstider i 30, 45 og 60 minutter i hovedtesten.

#### **Forsøksbetingelser:**

*Komplementfortynning:* Se tabellen under

*Blodets alder:* 29 dager

*Startkonsentrasjon på BPII som testsubstans:* 48 ug/ml

*Startkonsentrasjon for ΔhIgG:* 10 ug/ml

*Preinkubasjonstider:* 30, 45 og 60 minutter

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 300-rpm

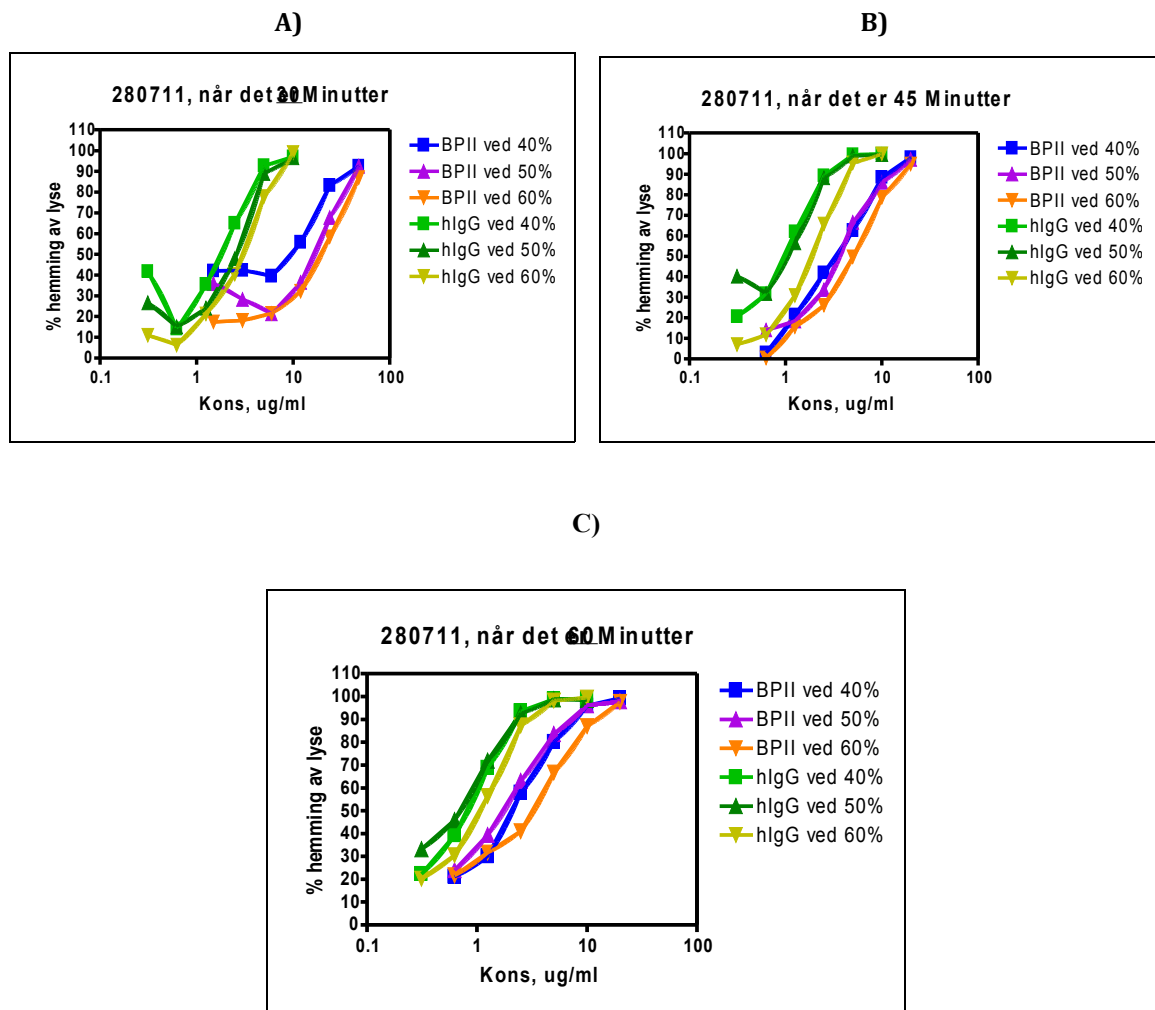
*Saueblod:* 0024

*Komplementkilde:* ECG

**Ulike hemolysering (40 %, 50 %, 60 %) i forskjellige preinkubasjonstid (30, 45 og 60) når det er sau Nr: 0024**

% hemolyse	Sau	Fortynning av komplementkilde	Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: BPII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: ΔhIgG i ug/ml		
			30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min
40 %	0024	1:60	28 %	24,7 %	14,6 %	9,8	3,5	2,2	1,9	1,0	0,9
50 %	X	1:55	41,8 %	33 %	21,1 %	17,2	3,8	1,8	2,6	1,1	0,7
60 %	X	1:45	64,5 %	53,7 %	35,9 %	20,2	5,1	3,4	3,1	2,0	1,1

**Tabell 6-11:** Tabellen viser resultater for hemolysingsgrader og ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII og ΔhIgG ved de forskjellige preinkubasjonstidene og de ulike % hemolysene når man bruker sau Nr: 0024.



**Figur 6-14:** Figurene over viser % hemming av hemolys når man bruker forskjellige preinkubasjonstider på 30, 45 og 60 minutter med de ulike % hemolysene. Når det er sau Nr: 0024.

Tabellen over viser en god del variasjoner her også når det gjelder lyseringsgrader ved de ulike preinkubasjonstider. Men variasjonene er mindre enn når man testet saueblod nummer 7001. Her observeres at når preinkubasjonstiden økes vil lyseringsgradene reduseres og varierer mer eller mindre for 40, 50 og 60 % hemolyse. Samme hypotese som er nevnte over for sau Nr:7001 er gyldig her også.

ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII viser 11 ganger forskjell. BPII blir nesten 2 ganger mer sensitivt når det er lengst preinkubasjonstid fra 40 % til 60 % hemolyse. Dette tyder på at BPII har komplementaktiverende aktivitet sånn som ΔhIgG, men de to kan oppføre seg helt forskjellig i aktiverings vei av komplementkaskaden.

Sensitiviteten for komplementet og/eller BPII økes med økende preinkubasjonstiden ved de forskjellige % hemolysene.

Når det gjelder ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG vises at det er relativt liten variasjon. Det vil si aktiveringshastigheten er hurtig og alt brukes i de første 30 minuttene. Dermed vil inkubasjon av ΔhIgG og komplement ikke påvirke mye med preinkubasjonstiden.

**Oppsummering** Preinkubasjonstider har innflytelse på lyseringsgradene, det vil si at følsomheten øker med økende preinkubasjonstid. Den har liten innflytelse på ΔhIgG, men har mer innflytelse på BPII. Mest sannsynlig vil BPII oppføre seg som komplementaktiverende på lik linje med ΔhIgG. Men aktiveringen kunne skje på en helt andre måte mellom disse to. Variasjon i BPII i denne testen er også mer avhengig av preinkubasjonstid enn for aggregert IgG.

**Reproduserbarhet:** Dette forsøket er utført 3 ganger under samme forsøksbetingelser med liten variasjon i resultatene både for BPII og ΔhIgG. Testen er dag til dag reproduserbart med hensyn til preinkubasjonstider og % hemolyse.

**Robusthet:** Testen er veldig robust både for BPII og ΔhIgG for samme dag med henblikk på hver preinkubasjonstid og % hemolyse.

## 6.10.3. Sau Nr: 6110

Tidligere forsøk med samme blod viste at dette blodet kan varieres noe under komplementfikseringstesten i forhold til de to over nevnte saueblodcellene. Komplementfortynningen ble beregnet i 30 minutter preinkubasjonstid for 50 % hemolyse. Ut fra dette beregnet komplementfortynningene for 40 % og 60 % hemolyse. Resultatene ble brukt for preinkubasjonstider i 30, 45 og 60 minutter i hovedtesten.

### Forsøksbetingelser:

*Komplementfortynning:* Se tabellen under

*Blodets alder:* 32 dager

*Startkonsentrasjon på BPII som testsubstans:* 48 ug/ml

*Startkonsentrasjon for  $\Delta$ hIgG:* 10 ug/ml

*Preinkubasjonstider:* 30, 45 og 60 minutter

*Temperatur i varmeskap:* 37 °C

*Ristehastighet:* 300-rpm

*Saueblod:* 6110

*Komplementkilde:* ECG

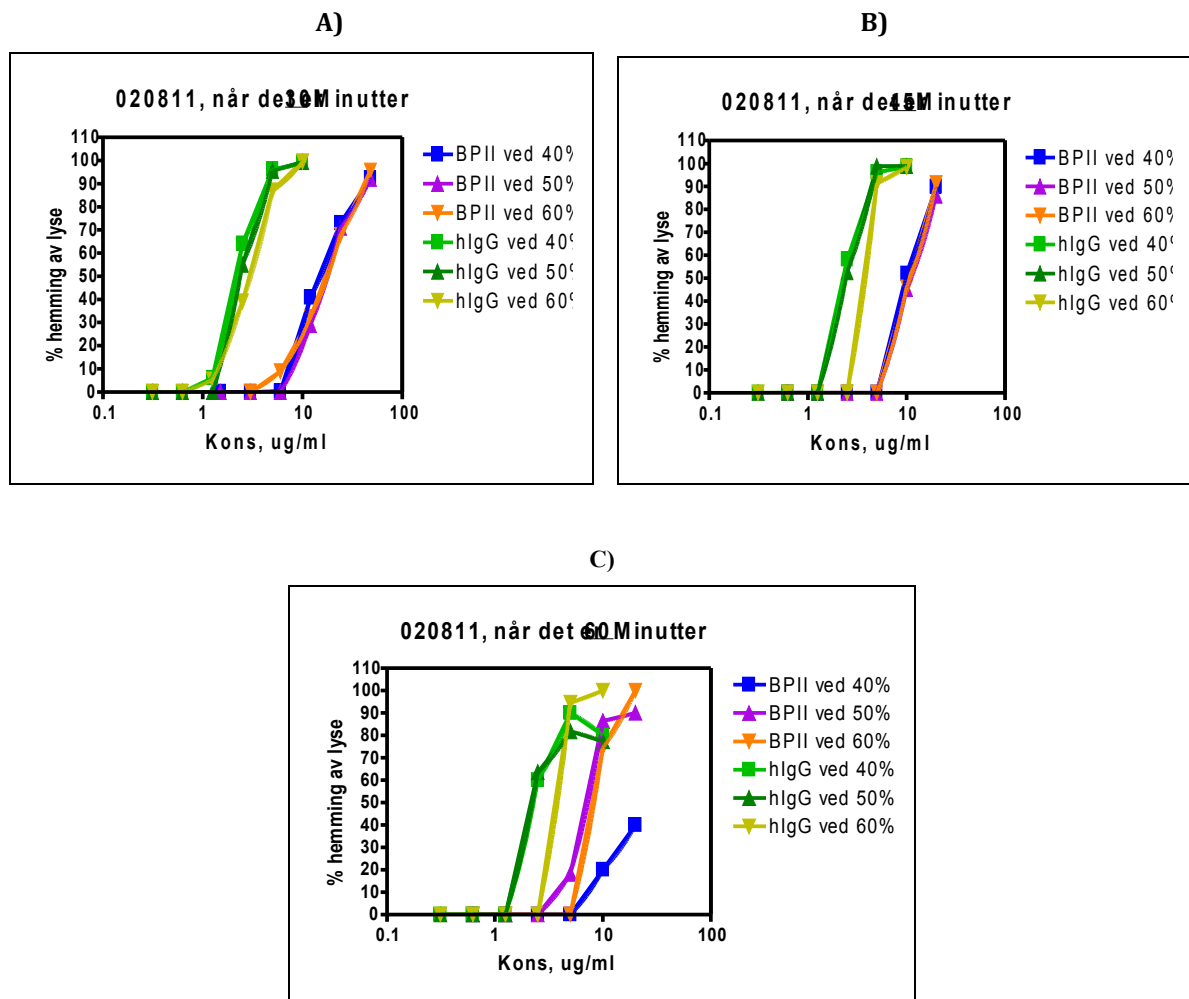
### Ulike hemolysering (40 %, 50 %, 60 %) i forskjellige preinkubasjonstid (30, 45 og 60) når det er sau Nr: 6110

% hemolyse	Sau	Fortynning av komplementkilde	Lyseringsgrad av SRBC: når man bruker			ICH <sub>50</sub> for: BPII i ug/ml			ICH <sub>50</sub> for: $\Delta$ hIgG i ug/ml		
			30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min	30 min	45 min	60 min
40 %	0024	1:60	22,1 %	4,9 %	0,6 %	15,4	9,8	.....	2,2	2,3	2,3
50 %	X	1:55	28,6 %	5,7 %	1,3 %	18	11,2	7,3	2,4	2,5	2,2
60 %	X	1:45	50,7 %	20,5 %	3,1 %	18	10,9	8,4	3,1	3,9	3,8

**Tabell 6-12:** Tabellen viser resultater for hemolysingsgrader og ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII og  $\Delta$ hIgG ved de forskjellige preinkubasjonstidene og de ulike % hemolysene når man bruker sau Nr: 6110.

Tabell 6.12 viser store variasjoner i lyseringsgrader med økende preinkubasjonstider. Her observeres akkurat den samme profil som for saueblodcelle Nr:7001 (tabell 6-10). Variasjonen er fra 0,6 % til 50,7 % avhengig av inkubasjonstiden og % hemolyse.





**Figur 6-15:** Figurene over viser % hemming av hemolys når man bruker forskjellige preinkubasjonstider på 30, 45 og 60 minutter med de ulike % hemolysene. Når det er sau Nr:6110.

Ut fra grafen observeres at lyseringsgradene reduseres veldig mye med økende preinkubasjonstiden for hver av de % hemolysene (figur 6.15). Samme hypotese som nevnt over er gyldig for saueblod Nr:7001 også.

ICH<sub>50</sub> verdiene for BPII varierer 2 til 3 ganger forskjell. Resultatene viser at BPII blir mer sensitivt når det er lengst preinkubasjonstid ved de ulike % hemolysene. Det viser at BPII har komplementaktiverende aktivitet som ΔhIgG.

ICH<sub>50</sub> verdiene for ΔhIgG varierer relativt veldig lite med økende preinkubasjonstiden for hver av de ulike % hemolysene. Her er det aktiveringshastigheten for ΔhIgG også veldig hurtig og alt IgG brukes når det er 30 minutter preinkubasjonstid. Dermed vil inkubasjon mellom komplement og ΔhIgG ikke påvirke mye med de ulike preinkubasjonstidene.

**Oppsummering av forsøket:** Testen viser at preinkubasjonstiden mellom 30 og 60 minutter har store innflytelse på lyseringsraden. Det vil si følsomheten øker med økende preinkubasjonstid. Variasjon i BPII er mer avhengig av preinkubasjonstid enn for  $\Delta$ hIgG. Preinkubasjonstiden har ingen innflytelse på  $\Delta$ hIgG, men noe mer på BPII.

**Reproduserbarhet:** Et annet forsøk ble utført under samme betingelser for å se på om testen er reproduserbar. Resultatene viste seg å være forskjellig av en eller annen grunn, noe som gjorde vanskelig å konkludere om testen er reproduserbar eller ikke.

**Robusthet:** Testen er robust når det gjelder BPII og  $\Delta$ hIgG med henblikk på hver preinkubasjonstid og % hemolyse.

**Hovedoppsummering av de tre utførte forsøkene over:** Preinkubasjonstiden og % hemolyse har ingen innflytelse på  $\Delta$ hIgG og komplementet når de inkuberes sammen i alle de tre forsøkene med de tre ulike saueblodcellene. Når det gjelder BPII og komplement preinkubasjonstiden viste seg å ha innflytelse på resultatene i alle de forsøkene mer eller mindre, avhengig av type blodceller som ble brukt i forsøket.

BPII blir mer sensitivt med økende preinkubasjonstiden.

Variasjon mellom  $ICH_{50}$  verdiene for BPII i forhold til  $ICH_{50}$  verdiene for  $\Delta$ hIgG var ikke så stor ved tilstedeværelse av de ulike saueblodcellene og de ulike % hemolysene (40, 50 og 60 %).

$\Delta$ hIgG i testsystemet fungerer som komplementaktiverende og mest sannsynlig vil BPII ut fra tidligere resultater i denne masteroppgaven fungere også som komplementaktiverende, men de to kan oppføre seg helt forskjellig under aktivering av komplementet.

Resultatene viser at ECG som komplementkilde ikke kan være så pass ustabil når man innkuberer serumet i mer enn 30 minutter. Det vil si at serumet mest sannsynlig vil være stabilt når den innkuberes over 30 minutter. Videre forsøk anbefales for serumet (se under "videre forsøk" punktet).

Resultatene viser at sensitiviteten er høyere for saueblod Nr: 0024 i forhold til saueblod Nr:7001 og 6110.

Saueblod Nr:7001 og 6110 er like sensitive for hver preinkubasjonstid når det gjelder BPII.

## Konklusjon

Ved utførelse av komplementfikseringstest under ulike forsøksbetingelser ble det observert at endring i noen av disse parameterne har innflytelse på testresultater. Disse endringene kan virke på robusthet og reproduserbarhet i testen.

Ting som vi mener det er viktig og som har størst innflytelse på testresultatene er

- 1) Preinkubasjonstid, det vil si tiden prøven er i kontakt med komplementserum før sensibiliserte saueblodceller tilsettes (30, 45, 60 minutter).
- 2) Ristehastighet i inkubasjonstrinnene (0, 150 og 300 rpm)
- 3) Ulike komplementserumkilder (ECG, ACV og MK)
- 4) Ulike sensibiliserte saueblodceller (sau NR: 7001, 0024 og 6110)
- 5) Temperaturendring i varmeskapet

Andre parametere virker å ha bare litt eller ingen innflytelse på testresultatene.

**Preinkubasjonstid:** Resultatene viser at preinkubasjonstid har veldig stor betydning i testsystemet. Sensitiviteten av testsubstansene (PM og BPII) øker og blir omtrent 2-3 ganger mer sensitiv avhengig av serumkomplementkilde med økende preinkubasjonstid. Testen er ikke robust med henblikk på preinkubasjonstid men den er dag til dag reproduserbar for disse testprøvene.

Preinkubasjonstid har ingen innflytelse på  $\Delta$ hIgG og sensitiviteten er nesten det samme. Det vil si testen er robust med henblikk på preinkubasjonstid. Det kan tyde på at  $\Delta$ hIgG og disse testsubstansene virker aktiverende, men aktiveringshastigheten er lav for både BPII og PMII. Den er derimot hurtig for  $\Delta$ hIgG. Aktiveringshastigheten er avhengig av hvilket komplement vi bruker.

**Ristehastighet:** Testen er utført med BPII som testsubstans og  $\Delta$ hIgG som positiv kontroll. Resultatene viser at  $ICH_{50}$  verdiene for BPII går kraftig ned (nesten halvert) med økende risting. Det vil si kraftig risting har innflytelse og testsubstansens sensitivitet øker med økende risting. Testen er ikke robust for BPII, men er dag til dag reproduserbar. Når det gjelder aggregert IgG har risting ikke noe innflytelse på testsystemet. Testen er robust og dag til dag reproduserbar for  $\Delta$ hIgG.

**Ulike komplementkilder:** Komplementkildene som ble brukt er serum fra 3 frivillige personer har viste seg å ha betydning i testsystemet. Noen av disse serumkomplementkildene viste seg å være mer følsomme eller mer sensitive enn de andre komplementkildene.

For eksempel viste ECG serumkomplementet seg å ha større variasjon både i hemolyseringsgrad og  $ICH_{50}$  verdiene i noen av forsøkene under for eksempel ulike preinkubasjonstid og temperaturendring.

Det var vanskelig å forstå hvorfor er det slik, men det viste seg at variasjonen er dag til dag reproduserbar. Mest sannsynlig vil fortykning av dette serumet virke på stabiliteten. Dermed anbefales videre forsøk av stabilitet av serumet.

**Ulike sauer:** 3 forskjellige saueblodceller fra 3 ulike sauer ble brukt under samme betingelser. Det ble observert variasjon i testresultatene avhengig av type saueblodceller som ble brukt i forsøkene. Det ble observert lik sensitivitet for sau Nr:7001 og 6110, men høyere sensitivitet for saueblod Nr: 0024 for de preinkubasjonstidene som ble brukt i testen. I alle forsøkene dag til dag reproduserbarhet ble observert både for  $\Delta hIgG$  og BPII. Robusthet i testen er derfor avhengig av hvilken sau vi bruker i testen.

**Temperaturendring:** Temperaturendring i varmeskapet viste seg å ha innflytelse på testresultater avhengig av hvilke serumkomplementkilder som ble brukt og hvor mye temperaturendring ble økt. Testsubstansenes sensitivitet øker med økende temperatur for både PMII og BPII, men sensitiviteten er sammen for  $\Delta hIgG$ . Testen er ikke robust for BPII og PMII, men er robust for  $\Delta hIgG$  med henblikk på serumkomplementkilder og temperaturendring. Testen er dag til dag reproduserbar både for PMII, BPII og  $\Delta hIgG$ .

Andre parametere som er testet og viste seg å ha mindre innflytelse er:

**Ulike antistoffmengde:** Ulike mengde (10, 15, 20 ul) kanin antistoff (amboceptor) ble brukt til sensibilisering av SRBC. Resultatene viser at antistoffkonsentrasjon ikke har stor innflytelse på testresultater ved de ulike % hemolysene som ble brukt i forsøket. Testen er dag til dag reproduserbar og robust for PMII og  $\Delta hIgG$  under hver antistoffmengde ved de forskjellige % hemolysene.

**BPII og PMII følsomhet:** Følsomhet for de to testsubstansene ble undersøkt underveis og de observerte testresultatene viser at de to testprøvene er like følsom både når det gjelder temperaturendring i varmeskapet og når det er ulik preinkubasjonstid. Testens reproduserbarhet og robusthet ble påvist under hver av disse parameterne.

**LPS sin aktivitet i testsystemet:** Resultater viser at LPS ikke har noen betydning i testsystemet med (bevist kontaminering av prøven) og uten tilsetning av LPS. Det vil si bevisst kontaminering av prøven med LPS øker ikke aktiviteten. Testen er robust for  $\Delta hIgG$  men litt robust for BPII.

**Blodets alder:** I noen av forsøkene ble det sammenlignet ferskt og gammelt blod. Det ble observert veldig liten forskjell som er ikke signifikant. Man kan si at blodets alder ikke har stor innflytelse på testsystemet i de forsøkene som ble utført under bestemt forsøksbetingelser. Det ble observert reduksjon av  $IC_{50}$  for BPII og  $\Delta hIgG$  når det ferskt blod i forhold til gammelt blod.

### Videre forsøk

Komplementfikseringstestene som er utført i masteroppgaven viste at noen parameterne i forsøket gav store utslag i testsystemet. En av disse parameterne var preinkubasjonstider.

For å forstå bedre hvorfor det skjer variasjoner i inkubasjonstiden, foreslå videre forsøk av de serumene som ble brukt i testene.

Som forslag, anbefales det en videre arbeid av under vente punkter:

- 1) Undersøkelse av stabilitet av ufortynnet og fortynnetserum. De seraene som ble brukt i komplementfikseringstest kan testes i forskjellige preinkubasjonstider og temperatur for å se på stabilitet.
- 2) Undersøkelse om detoxigel søylen kan brukes for å isolere eventuelt komponenter utenom LPS som kan ha aktivitet i komplementfikseringstesten.

## 9. Referanser

Alban, S., Classen, B., Brunner, G., Blaschek, W. (2002). **Differentiation Between the Complement Modulating Effects of an Arabinogalactan-Protein from *Echinacea purpurea* and Heparin.** *Planta Med.* 68, 1118-1124.

Caffall, K. H., Mohnen, D. (2009). **The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides.** *Carbohydrate Research.* 344, 1879-1900.

Diallo, D., Sogn, C., Samake'. F. B., Paulsen, B.S., Michaelsen, T. E., and Keita, A. (2002). **Wound Healing Plants in Mali, the Bamako Region. An Ethnobotanical Survey and Complement Fixation of water Extracts from Selected Plants.** *Pharmaceutical Biology.* 40, 117-128.

Hetland, G., Samuelsen, A. B., Lovik, M., Paulsen, B. S., Aaberge, I. S., Groeng, E. C., & Michaelsen, T. E. (2000). **Protective Effect of *Plantago major* L. Pectin Polysaccharide against Systemic *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice.** *Scandinavian Journal of Immunology.* 52, 348-355.

Hotchkiss, A., Rastall, R., Gibson, G., Eliaz, I., Liu, L.S and Fishman, M. (2009). **New bioactive and biobased product applications of pectin.** From **Pectins and Pectinases**, ISBN: 90-8686-108-3. 305-312.

<http://www.clongen.com>

Grønhaug, T. E., Kiyohara, H., Sveaass, A., Diallo, D., Yamada, H., Paulsen, B. S. (2011). **Beta-D-(1→4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. Contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages.** *Phytochemistry.* 72, 2139-2147.

Grønhaug, T. E., Ghildyal, P., Barsett, H., Michaelsen, T. E., Morris, G., Diallo, D., Inngjerdingen, M., and Paulsen, B. S. (2010). **Bioactive arabinogalactans from the leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. Ex Walp. (Opiliaceae).** *Glycobiology*. 12, 1654-1664.

Grønhaug, T. E., Glæserud, S., Skogsrud, M., Ballo, N., Bah, S., Diallo, D., and Paulsen, B. S. (2008). **Ethnopharmacological survey of six medicinal plants from Mali, West-Africa.** *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. 4, 26 (open access).

Inngjerdingen, K.T., Coulibaly, A., Diallo, D., Michaelsen, T.E., and Paulsen, B.S. (2006). **A Complement Fixing Polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a Medicinal Plant from Mali, West Africa.** *Biomacromolecules*. 7, 48-53

Inngjerdingen, K. T., Debes, S. C., Inngjerdingen, M., Hokputsu, S., Harding, S. E., Rolstad, B., Midiaelsen, T. E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2005). **Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization.** *Journal of Ethnopharmacology*. 101, 204-214

Inngjerdingen, K., Kiyohara, T., Matsumoto, H., Petersen, T. D., Michaelsen, T. E., Diallo, D., Inngjerdingen, M., Yamada, H., Paulsen, B. S. (2007). **An immunomodulating pectic polymer from *Glinus oppositifolius*.** *Phytochemistry*. 68, 1046-1058.

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., and Paulsen, B. S. (2008). **Pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch, and their activation of macrophages and dendritic cells.** *Glycobiology*. 18, 1074-1084.

Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Hogasen, K., Paulsen, B.S. (2000). **Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L.** *Scandinavian Journal of Immunology*. 52, 483-490.

Mohnen, D. (2008). **Pectin structure and biosynthesis.** *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 266-277.



Parham, P. (2009). **The immune system**. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, Publishing. THIRD EDITION. ISBN 978-0-8153-4146-8

Paulsen, B. S. (2002). **Biologically active polysaccharides as possible lead compounds**. *Phytochemistry Reviews*. 1, 379-387.

Paulsen, B.S., Barsett, H. (2005). **Bioactive pectic polysaccharides**. *Advances in Polymer Science*. 186, 69-101.

Pedersen, B.S og Rasmussen, K. E. (2004). **legemiddelanalyse**. Fagbokforlaget. ISBN 82-7674-844-9.

Perez, S., Rodriguez C. M. A., Doco, T. (2003). **A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function**. *Biochimie*. 85, 109-121

RASHMI SRIVASTAVA and DINESH K. KULSHRESHTHA. (1989). **Bioactive polysaccharides from plants**. *Phytochemistry*. 28, 2877-2883.

Ridley, B. L., Malcolm A. O'Neill, Mohnen, D. (2001). **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling**. *Phytochemistry*. 57, 929-967.

ROS, J.M., SCHOLS, H.A., LAENCINA. J and VORAGEN, A.G.J. (2000). **Pectic hairy regions of lemon fruits: a polysaccharide with potential bioactivity?**

From **Bioactive carbohydrate polymers** ISBN: 0-7923-6119-9. Edited by Paulsen. B.S. 44, 129-145.

Samuelsen, A. B., Lund, I., Djahromi, J. M., Paulsen, B. S., Wold, J. K., Knutsen, S. H. (1999). **Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L.** *Carbohydrate Polymers*, 38, 133-143.

Scheller, H.V., Jensen, J.K., Serensen, S.O., Harholt, J., Geshi, N. (2007). **Biosynthesis of pectin**. *Physiol Plant*, 129, 283-295.

Thierry, R., Froidevaux, C., Didier, Le. R., Marlies, K. R., Chanson, A. L., Mauri, D., Burns, K., Riederer, B. M., Akira, S., and Thierry, C. (2008). **Protection from lethal Gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4**. 106, 2348-2352.

Togola Adiaratou, Inngjerdingen, M., Diallo, D., Barsett, H., Rolstad, B., Michaelsen, T. E., Paulsen, B. S. (2007). **Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation**. *Journal of Ethnopharmacology*. 115, 423-431.

Vincken, J. P., Schols, H. A., Ronald, J.F.J.,O, McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., and Visser, R. G.F. (2003). **If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture**. *Plant physiology*. 132, 1781-1789.

Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P and Schols, H. A. (2009). **Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls**. *Structural Chemistry*. Computational and Experimental studies of Chemical and Biological Systems. 20, 263-275

VORAGEN, A.G.J., DAAS, P.J.H and SCHOLS, H.A. (2000). **Enzymes as tools for structural studies of pectins**.

From **Bioactive carbohydrate polymers**. ISBN: 0-7923-6119-9. Edited by Paulsen. B. S. 44, 129-145.

[Ward](#), P. A., [Sarma](#), J. V. (2010). **The complement system**. From the issue entitled "Innate Immunity". *Cell and Tissue Research*. 343, 227-235.

Xubo, F., Jiang, B and Wang, X. (2006). **Purification and Partial Characterization of an Acidic Polysaccharide with Complement Fixing Ability from the Stems of *Avicennia Marina***. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 39, No. 5, 546-555

Yamada, H. and Kiyohara, H. (2007). **Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures**. *Comprehensive Glycoscience, From Chemistry to Systems Biology*. J. P. Kamerling, G.-J. Boons, Y. C. Leet al, Elsevier Ltd. 4, 663-671.

YAMADA, H. **Bioactive plant polysaccharides from Japanese and Chinese traditional herbal medicines**. (2000). From **Bioactive carbohydrate polymers**, ISBN: 0-7923-6119-9. Edited by Paulsen, B. S. 44, 129-145.

Yamada, H. (1994). **Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity**. *Carbohydrate Polymers* 25, 269-276.