

I. Biologisk aktive polysakkarider fra
Glinus oppositifolius (L.) Aug. DC

II. Ethnopharmacological survey in Mali

av

INGVILD AUSTARHEIM

HOVEDOPPGAVE

for graden

Cand. pharm

(Master of Pharmacy)



Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

Oktober 2007

School of Pharmacy, University of Oslo

I. Biologisk aktive polysakkarider fra

Glinus oppositifolius

II. Ethnopharmacological survey in Mali

av

INGVILD AUSTARHEIM

SAMMENDRAG

Første del i denne oppgaven tar for seg struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider fra *Glinus oppositifolius*, hvor arbeidet er blitt utført på en slik måte at det er enkelt å sammenligne resultatene med tidligere utført arbeid på samme plante av Inngjerdingen (2007), hvor pektinfraksjonene GOA1 og GOA2 ble isolert. Andre del tar for seg en etnofarmakologisk studie utført i områdene rundt Dioula og Koutiala i Mali i mars/april 2007.

Utgangspunktet for analyser av polysakkarider fra *G. oppositifolius* var et vann-ekstrakt isolert av Inngjerdingen. Dette materialet ble videre applisert på en ionebytterkolonne type DEAE Sepharose fast flow. Det var ikke mulig å dele pektinmaterialet i flere fraksjoner, derfor fulgte videre separering på en gelfiltreringskolonne type Sephacryl S-200. Dette resulterte i to sure fraksjoner, GA1 og GA2. Ettersom det kun ble detektert en topp etter ionebytter, hvor det i tidligere studier har blitt oppdaget to, gav dette en teori om fytokjemiske ulikheter i de forskjellige batchene av plantemateriale. Hovedfraksjonen GA1 ble så degradert med endo-1,4 α -D-polygalakturonase (pektinase). Etter degradering og separasjon på gelfiltreringskolonne type Bio-Gel P30 ble det isolert fire fraksjoner, GA1Fr1–4. Det ble tilsatt for lite enzym ved førstegangstilsetting av pektinase. GA1Fr1 og GA1Fr2 ble derfor degradert en gang til med samme enzym. I tillegg ble GA1Fr1 og GA1Fr2 ble degradert med α -arabinofuranosidase i kombinasjon med pektinase. Det ble utført strukturoppklaring ved hjelp av metanolyse og GC/MS. Resultater fra disse analysene indikerer en RG-I struktur med AG-II sidekjeder, og muligens også arabinan-sidekjeder. Alle fraksjonene ble testet med tanke på biologisk aktivitet i to assay. GA1Fr1 viste potent antikomplementær effekt og et potensial til å kunne stimulere makrofager. Det ikke funnet sub-akutte toksiske effekter *in vivo* etter oral administrering av pektinfraksjon GA, i konsentrasjon 200 mg/kg, over 21 dager.

I den etnofarmakologiske studien beskrevet i del 2 ble totalt 54 healere intervjuet om fem forskjellige planter, *Erythrina senegalensis*, *Opilia celtidifolia*, *Combretum glutinosum*, *Biophytum petersianum* and *Syzygium guineense*. De fire førstnevnte plantene var svært godt kjent for healerene, hvor de hyppigst nevnte indikasjonsområder for var for de respektive plantene: Amenoré, innvoldsorm, gulsott/malaria og malaria. Det ble utarbeidet en tabell på engelsk for alle resultatene vist i vedlegg A.

Innhold

Innhold	I
Forord	V
Forkortelser	VI
Reagensliste	IX
1 Innledning	1
1.1 Polysakkarider som immunmodulerende stoffer	1
1.1.1 Pektiner	2
1.1.2 Bioaktive pektiner i tradisjonell medisin	2
1.1.3 Studier på planter som inneholder bioaktive pektiner	2
1.1.4 Strukturtrekk knyttet til biologisk aktivitet av pektiner	3
1.2 <i>Glinus oppositifolius</i> (L.) Aug. DC	3
1.2.1 Systematikk	3
1.2.2 Botanikk	4
1.2.3 Habitat	4
1.3 Tidligere arbeid utført på <i>Glinus oppositifolius</i>	4
1.3.1 Tradisjonell bruk	4
1.3.2 Vitenskapelige struktur-aktivitetsstudier	6
2 Målsetting for oppgaven	8

I	Biologisk aktive polysakkarider fra <i>G. oppositifolius</i>	10
3	Metoder	11
3.1	Generelle metoder	11
3.1.1	Vannkvalitet	11
3.1.2	Innveing	11
3.1.3	Volumreduksjon	11
3.1.4	Frysetørking	12
3.1.5	Avgassing/evakuering av luft	12
3.1.6	Sentrifugering	12
3.1.7	Filtrering	13
3.1.8	Blanding av løsninger	13
3.1.9	pH-målinger	13
3.1.10	Syrevasking av glassutstyr	13
3.1.11	Dialyse	14
3.1.12	Absorbansmålinger	16
3.2	Isolering av polysakkarider	16
3.2.1	Ionebytterkromatografi - DEAE Sepharose Fast flow	16
3.2.2	Gelfiltrering	19
3.3	Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinhold	25
3.3.1	Fenol-svovelsyretesten	25
3.3.2	Metanolyse	26
3.3.3	TMS (trimetylsilan) derivatisering	28
3.3.4	Gasskromatografi	29
3.4	Proteinbestemmelse	31
3.4.1	Proteinbestemmelse ved bruk av LOWRY-test	31
3.5	Strukturoppklaring	32
3.5.1	Molekylvektsbestemmelse	32
3.5.2	Enzymatisk degradering av pektin	34
3.5.3	Reduserende endebestemmelse	37
3.5.4	Karboksylysrereduksjon før metylering	38
3.5.5	Metylering med etterfølgende hydrolyse, reduksjon og acetylering	42

3.5.6	GC/MS	47
3.6	Biologisk aktivitet	48
3.6.1	Komplementfikseringstesten	48
3.6.2	Måling av NO-frigjøring fra makrofager	54
3.6.3	Akutt toksisitetstesting <i>in vivo</i> av mus	57
4	Resultater og diskusjon	58
4.1	Oversikt over utført arbeid	58
4.2	Sammenligningsgrunnlag	58
4.3	Isolering av polysakkarider	58
4.3.1	Separasjon på grunnlag av ionestyrke	60
4.3.2	Gelfiltrering på Sephacryl S-200 kolonne	60
4.4	Kvantitativ bestemmelse av mengde polysakkarider	62
4.4.1	Metanolyse	62
4.5	Strukturoppklaring	65
4.5.1	Enzymatisk degradering av GA1 med polygalakturonase	65
4.5.2	Bestemmelse av bindingstype mellom monosakkaridene i GA1Fr1-4	67
4.5.3	Videre enzymatisk degradering av GA1Fr1 og GA1Fr2	72
4.6	Molekylvektfordistribusjon	76
4.7	Proteinbestemmelse	79
4.8	Biologisk aktivitet	80
4.8.1	Komplementtesten	80
4.8.2	Makrofagstimulering	84
4.8.3	Sub-akutt toksisitetstesting <i>in vivo</i> på mus	85
II	Ethnopharmacological survey in Mali	86
5	Ethnopharmacological survey in Mali	87
5.1	Introduction	87
5.2	Ethnopharmacology	88
5.3	The department of traditional medicine (DMT) in Mali	88
5.3.1	Improved Traditional Medicines, ITMs	89

5.4	Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila and Koutiala.	89
5.5	Discussion of the survey carried out in the region of Dioila and Koutiala	92
5.5.1	<i>Erythrina senegalensis</i> A.Rich. (Leguminosae: Papilionoideae)	92
5.5.2	<i>Opilia celtidifolia</i> Endl. (Opiliaceae)	93
5.5.3	<i>Combretum glutinosum</i> Perr. (Combretaceae)	95
5.5.4	<i>Biophytum petersianum</i> Klotzsch (Oxalidaceae)	98
5.5.5	<i>Syzygium guineense</i> D.C. (Myrtaceae)	98
5.6	Explanation of different formulations used in the main table of the results from the survey	100
5.7	Explanation of some medical terms	100
6	Konklusjon	101
A	Results of survey in Mali	104
B	Sub- acute toxicity test	147
B.1	Chemical tested	147
B.2	Animals	147
B.3	Results	148
	Bibliografi	152

Forord

Del 1 av denne hovedoppgaven ble gjennomført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, UiO. Del to ble utført i Mali i perioden 10. mars til 10 april. Arbeidet med oppgaven har vært svært utfordrende og interessant.

I forbindelse med dette arbeidet ønsker jeg å takke følgende personer:

- Min hovedveileder Berit Smestad Paulsen for god oppfølging og høy faglig kompetanse.
- Min veileder for del 2, Drissa Diallo, for tilrettelegging og gjennomføring av feltarbeid i Mali.
- Torun Aslaksen for uvurderlig praktisk og teoretisk hjelp på laboratoriet.
- Odin Gramstad for hjelp til å typesette oppgaven i L^AT_EX, samt for korrekturlesing og hjelp til å lage plott til oppgaven i Matlab.
- Marit Inngjerdingen, Terje Michaelsen og Finn Tønnesen for faglig og praktisk veiledning.
- Alle ansatte og medstudenter for et trivelig hovedfagsår.

Oslo, oktober 2007

Ingvild Austarheim

Forkortelser

Ac	Acetylgruppe
AG I	Arabinogalaktan type I
AG II	Arabinogalaktan type II
AGP	Arabinogalaktanprotein
α	Alfa posisjon indikerer at -OH på C1 har samme posisjon som -OH på C6.
ALP	serum alkaline fosfatase
Ar	Argon
Ara	Arabinose
Araf	Arabiofuranose
Arap	Arabinopyranose
Araf-ase	Arabinofuranosidase
β	Betaposisjon, indikerer at -OH på C1 har motsatt posisjon som -OH på C6.
C1-6	Karbonatomnummer 1-6 i et monosakkarid.
CFA	Valuta i Mali
CMC	Carbodiimid
Da	Dalton
DEAE	Dietylaminoetyl
DMT	Départementde Médecines Traditionell
EtOH	Etanol
<i>f</i>	Indikerer at monosakkaridert foreligger i furanoseform
FHI	Folkehelseinstituttet
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Fuc	Fucose

Gal	Galaktose
Gal A	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
Glc	Glukose
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
L	Lengde
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
Me	Metylgruppe
MeGalA	Nativt metylert galakturonsyre
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
OH	Hydroksylgruppe
<i>p</i>	Indikerer at monosakkaridert foreligger i pyranoseform
PMII	<i>Plantago major</i> L. fraksjon 2
PG-ase	Pektinase
RG-I	Rhamnogalakturonan type I
RG-II	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
Rpm	Antall rotasjoner per minutt
SGOT	Serum glutamate oxalo acetate transaminase
SGPT	Serum glutamate pyruvate transaminase
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
T-	Terminal
Xyl	Xylose

Pektinfraksjoner fra *G. oppositifolius*:

GA	Sur fraksjon etter separasjon på ionebytter.
GA1	Fraksjon 1 etter separasjon av GA på ionebytter og sephacryl S-200 kolonne.
GA2	Fraksjon 2 etter separasjon av GA på ionebytter og sephacryl S-200 kolonne.
GA1Fr1	Fraksjon 1 etter PG-ase behandling av GA1 separert på Bio-Gel P30 kolonne.
GA1Fr2	Fraksjon 2 etter PG-ase behandling av GA1 separert på Bio-Gel P30 kolonne.

- GA1Fr3 Fraksjon 3 etter PG-ase behandling av GA1 separert på Bio-Gel P30 kolonne.
- GA1Fr4 Fraksjon 4 etter PG-ase behandling av GA1 separert på Bio-Gel P30 kolonne.
- A HMW fraksjon av GA1Fr 2 etter pektinase 2.
- B HMW fraksjon av GA1Fr 1 etter pektinase 2.
- C HMW fraksjon av GA1Fr 1 etter pektinase 2 og arabinofuranosidase.
- D HMW fraksjon av GA1Fr 2 etter pektinase 2 og arabinofuranosidase.
- GOA1 Fraksjon 1 etter ionebytter (Inngjerdingen, 2007).
- GOA2 Fraksjon 2 etter ionebytter (Inngjerdingen, 2007).
- GOA2-I Fraksjon 1 etter PG-ase behandling (Inngjerdingen, 2007).
- GOA2-II Fraksjon 2 etter PG-ase behandling (Inngjerdingen, 2007).

Reagensliste

0.9 % NaCl (aq) , steril	Braun
α -L-arabinofuranosidase 150 U/ml	Megazyme
Antistoff Amboceptor 9020	Virion
BSA - bovine serum albumin - 30 %, tilsatt 0.1 % NaN ₃ (aq)	Interchim
Dextran B512, Dex 40 T 8630 Fr 7 Mw: 19 000, Mn: 18 500	
Dextran B512, Fr 11640-I-IV Mw: 2360, Mn 2000	
Dextran standard 100 000	Fluka BioChemica
Dextran standard 50 000	Fluka BioChemica
Dextran standard 80 000	Fluka BioChemica
Dextran T 500 lot 9307, Mw: 475 000, Mn 153 000	
Dimetylsulfoksid	MERCK
Dinitrosalisylsyre	SIGMA
Di-phosphor-pent-oksid	MERCK
Endo-polygalacturonanase 5000U/ml, 800U/mg	Megazyme
PG-ase 1 (PG04 A. Acuatus) 8700 U/mg, 1.85 μ g/ml, 16 U/ml	
Erythrocytter fra sau 1	Hvit 131, 12.02.2007
Erythrocytter fra sau 2	Hvit 142, 17.02.2007
Etanol	MERCK
Fenol	MERCK
Folin ciocalteus reagens	MERCK

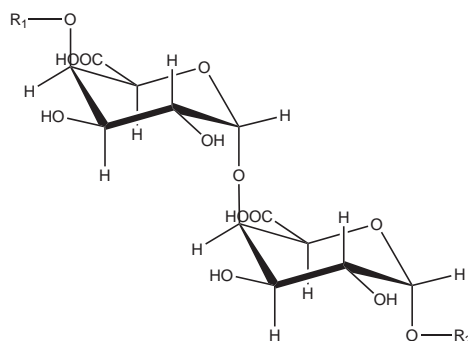
Heksametyldisilazan (HMDS)	ALDRICH
Humant komplement ECG, 29.11.2005	Folkehelseinstituttet
Imidazole	Fluka
Kaliumnatriumtartat	Kebo
Kloroform	Prolabo
Kobber(II)sulfat-5-hydrat	MERCK
Mannitol	SIGMA
MES (2-(N-Morfolino) etan sulfonsyre)	SIGMA
Metyljodid	Fluka
Narium hydroksid (NaOH)	AnalaR§
Natium klorid (NaCl (s))	AnalaR§
Natrium borodeuterid 98 atom % D (NaBD ₄)	SIGMA-ALDRICH
Natrium borohydrid 99 % (NaBH ₄)	SIGMA-ALDRICH
Natriumazid >99 %	KEBOLab
Natrium-desoxycholol	MERCK
Natriumkarbonat, vannfri	MERCK
Natriumthiosulfat 5-hydrat	MERCK
N-Cyclohexyl-N-(2-morpholinoethyl)carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate (CMC)	ALDRICH
<i>Plantago major</i> L, fraksjon II (PMII ₅₀)	Folkehelseinstituttet
Pyridin	MERCK
Saltsyre (HCl)	MERCK
Svovelsyre	MERCK
Sølvnitrat	MERCK
Toulen	MERCK
Trikloreddiksyre	MERCK
Trimetylklorosilan (TCMS)	Supelco
Tri-natriumcitrat-2-hydrat	MERCK
TRISMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan)	SIGMA
Veronal buffer for CFT pH 7.2	Folkehelseinstituttet

Kapittel 1

Innledning

1.1 Polysakkarider som immunmodulerende stoffer

De første biologiske testene på polysakkarider ble utført så tidlig som i 1961. Disse testene ble utført på glukansers potensiale til å modulere komplementsystemet gjennom faktor P (Pre-obrazhenskaia *et al.*, 1961). Selv om dette var revolusjonerende, så tok ikke interessen for biologisk aktive polysakkarider av før ca 30 år seinere. Mye av grunnen til at interessen for biologisk aktive polysakkarider ikke tok av tidligere er nok teknologisk begrunnet. Det behøves avansert teknologi for å muliggjøre avanserte separasjonsprosesser, fremstilling av spesifikke enzymer samt avanserte biologiske testsystemer. Da teknologien som var påkrevet begynte å komme på plass, bidro de spennende og lovende farmakologiske effektene av bioaktive polysakkarider til en rask økning av antall publiserte artikler på dette feltet. I 1995 kom kosttilskuddet NBG[®]24:7 med 1,3/1,6-glukaner isolert fra *Saccharomyces cerevisiae* på markedet i Japan og USA, og noe senere også i Norge. I gammel kinesisk medisin har Shiitake-soppen *Lentinus edodes* vært produsert og solgt i flere tusen år. Virkestoffet i denne soppen er seinere vist å være 1,3/1,6 β -glukaner, det samme som i NBG[®]24:7. Som naturlegemiddel forekommer glukane i urensset form i motsetning til i kosttilskuddet NBG[®]24:7 som selges i dag. Æren for (re)oppdagelsen av bioaktive β -1,3/1,6-glukaner er gitt til Robertsen *et al.* (1990) som viste at fiskens forsvar mot infeksjoner ble kraftig styrket når glukane av denne typen ble tilsatt fiskeforet. Grunnet denne oppdagelsen har det også siden 1992 vært rutine å tilsette en grovrenset form for NBG[®] til fiskefor, noe som har gjort at norsk oppdrettsfisk holder seg friskere. Firmaet Immunocorp konsentrere seg nå om å videreutvikle preparater med 1,3/1,6 β -glukaner



Figur 1.1: Alle pektiner inneholder D-galakturonsyre i pyranoseform bundet sammen med α -1,4-bindinger.

til kreftterapi og sårbehandling (Nbg24:7, 2007).

1.1.1 Pektiner

Pektiner er en spesiell gruppe polysakkarider som generelt sett inneholder store mengder α -1,4-bundet GalA (se figur 1.1) og forgrenede regioner bestående av en rhamnogalakturonan kjerne substituert med sidekjeder som arabinogalaktaner, arabinaner, galakto-oligosakkarider og arabinooligosakkarider (Yamada & Kiyohara, 1999).

1.1.2 Bioaktive pektiner i tradisjonell medisin

Plantematerialer har blitt benyttet som medisin i mange tusen år uten at man har hatt kunnskap om hvilke stoffer som har gitt opphav til de observerte effektene. Nye moderne teknikker har vist at mange av disse plantene inneholder bioaktive polysakkarider som lett vil kunne ekstraheres ut ved tilberedning av plantematerialet på en tradisjonell måte. Ved tilberedning på en tradisjonell måte mener man som oftest et infus eller et dekokt. I følge Yamada (1996) har pektiner vist å ha flere farmakologiske aktiviteter som immunstimulerende aktivitet, anti-ulcer aktivitet, anti-cancer aktivitet, kolesterolsenkende effekt og anti-inflammatorisk aktivitet.

1.1.3 Studier på planter som inneholder bioaktive pektiner

Det finnes flere fremgangsmåter for å identifisere planter med bioaktive pektiner. I følge Paulsen & Barsett (2005) har de fleste studiene en etnofarmakologisk fremgangsmåte som utgangspunkt. Det har da blitt fokusert på planter til bruk i behandling av sår og hudlidelser

samt ulcer og tumorer. For å videre kunne studere bioaktivitet av de identifiserte plantene, er komplementfikseringstesten ofte første testsystem man velger ettersom det er en enkel og lite tidkrevende test. Denne testen gir en indikasjon på om pektinet har en modulerende effekt på en viktig del av det medfødte immunsystemet (se metode 3.6.1). Andre *in vitro* bioassays er også mye brukt, eksempelvis måling av effekt på makrofager (se metode 3.6.2), proliferasjon av lymfocytter, måling av cytokine mRNA fra makrofager og NK celler samt påvirkning av Peyer's patch celler.

1.1.4 Strukturtrekk knyttet til biologisk aktivitet av pektiner

Bioaktive pektiner har svært sammensatte strukturer med molekylvekter fra 5000 Da til 6.000.000 Da, noe som tilsvarer 30 - 36.000 monosakkaridenheter koblet sammen (Yamada & Kiyohara, 1999). Det er av den grunn svært vanskelig å gi en eksakt struktur av et pektin, men det er mulig å finne strukturtrekk som går igjen og som kan ha betydning for immunmodulerende egenskaper. Paulsen & Barsett (2005) utarbeidet en oversikt over strukturelementer og bioaktivitet av 20 planter. Det ble da funnet at storparten av pektinene inneholdt rhamnogalakturonan I med hovedsaklig arabinogalaktan II (AG II) sidekjeder, men også noen arabinogalaktan I (AG I) sidekjeder. En annen egenskap som kan ha betydning for bioaktivitet *in vivo* er mucoadhesiv effekt, det vil si evne til å binde seg til overflateceller. Man kan da få en økt virkning av polysakkaridene når de passerer tarmen, ettersom de forblir lenger på virkestedet (Paulsen & Barsett, 2005).

1.2 *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC

1.2.1 Systematikk

(Burkill, 1997; Diallo, 2000)

Glinus oppositifolius blir også beskrevet under navnene *Mollugo oppositifolia* L. og *Mollugo spergula* L. (Inngjerdingen, 2000). Grunnen til dette er at plantene har, ettersom mer informasjon om slekt har blitt kjent, endret slektsnavn. En annen grunn er at flere personer har navngitt samme plante uten å vite at planten allerede hadde et navn. Det er mange år siden denne planten fikk sitt navn, og på den tiden var kommunikasjon ikke så god som i dag.

Rike:	Planter
Divisjon:	Angiosperm
Klasse:	Dicotyledons
Underklasse:	Caryophyllidae
Orden:	Caryophyllales
Familie:	Aizoaceae
Slekt:	<i>Glinus</i>
Art:	<i>oppositifolius</i> (L.) Aug. DC

1.2.2 Botanikk

Glinus oppositifolius (L.) A. DC. har en tynn stengel som vokser oppadgående eller kryper bortover bakken. Stammen kan bli opp mot 40 cm lang og planten er ettårig. Som navnet tilsier sitter bladene motstående 1 mot 1 i kranser av 4-6 blad. De er 2-3 cm lange, delvis sukkulente, glatte og lett taggete ut mot tuppen. Blomstene mangler kronblad, men de 5 begerbladene er hvite til grønne og 4-5 mm lange. Blomsterstilken er 1.5 cm lang. Frøene er små og brune med granulære vortelignende forhøyninger (se figur 1.2) (Inngjerdingen, 2000; Burkill, 1997).

1.2.3 Habitat

Glinus oppositifolius er utbredd i mange deler av verden, særlig i tropiske og subtropiske strøk, men den er ikke vanlig. Den lever i områder med forbigående overfladisk vann, elver eller lignende. Det vil si der det finnes overflatevann i kun deler av året, hovedsakelig i regntiden samt en stund etter. Den liker sandholdig, fuktig jord som er fattig på nitrogen, rik på fosfor og har en lav pH (Burkill, 1997; eFloras, 2007). I Mali er *Glinus oppositifolius* å finne flere steder i regntiden, mens den i tørketiden kun er å finne ved innsjøer i Gourma-området (Diallo, 2000)

1.3 Tidligere arbeid utført på *Glinus oppositifolius*

1.3.1 Tradisjonell bruk

I Mali ble den medisinske bruken av *G. oppositifolius* ikke kjent før 1992, etter en etnobotanisk studie i Gourma-distriktet. Av denne studien gikk det frem at denne planten var en svært vanlig



Figur 1.2: *Glinus oppositifolius* (L.) A. DC. (Aizoaceae)

plante å bruke mot malaria, men den hadde også andre indikasjonsområder som mot abdominal smerte, gulsott, appetittstimulerende, inflammasjonshemmende, diaré, feber, hudproblemer og sår (Diallo, 2000). *G. oppositifolius* er fremdeles en viktig medisinsplante i det nordlige Mali hvor den selges på markeder. Mange planter i samme slekt (*Glinus* spp.) har mange av de samme bruksområdene som *G. oppositifolius*, noe som kan tyde på disse plantene kan ha mange felles biosyntesespor.

Den medisinske effekten av *G. oppositifolius* er også kjent i andre land foruten Mali. I Kenya brukes planten mot hodepine og mageproblemer. I Tanganyika rapporteres det om at friske blader blir blandet sammen med smør og brukes mot hovne tær og fingre (mot ødem). I Zaire kuttet bladene i mindre biter og brukes som et sårhelende middel. I India er det sagt at den virker styrkende på magen og at den kan brukes ved forstoppelse, samt at den har gode antiseptiske egenskaper og er derfor bra til å behandle hudinfeksjoner. *G. oppositifolius* blir også brukt til mat. På Filippinene blir hele planten utenom roten spist som en grønnsak. Det er nødvendig med lang koketid for å bli kvitt den bitre smaken. Planten inneholder mye jern og kalsium (Burkill, 1997). Det er blitt presentert bevis for at *G. oppositifolius* er giftig for kveg dersom de spiser store mengder av planten (eFloras, 2007).

1.3.2 Vitenskapelige struktur-aktivitetsstudier

Høymolekylære forbindelser

De første struktur-aktivitetstestene av *G. oppositifolius* ble utført av Debes (1998). Det ble arbeidet med 50°C vannekstrakt av to ulike batcher av planten, GOA og GOB, innhentet fra ulike årstider og steder i Mali. Nøytrale og sure fraksjoner ble isolert ved hjelp av ionebytter-kromatografi. De sure fraksjonene viste et høyt innhold av uronsyrer, og i tillegg Ara, Rha og Gal i betydelige mengder. Xyl, Man og Glc var tilstede i små mengder. De sure fraksjonene viste potent komplementær aktivitet. Disse studiene ble videreført av Inngjerdingen (2000) hvor batch GOB ble benyttet for å opparbeide mer rensset pektin for å utføre flere forsøk. Isolering av polysakkarider ble utført på lik måte. For å finne ut mer om strukturaktivitet ble enzymatisk degradering utført etterfulgt av strukturanalyser. Etter ionebytter ble materialet delt inn i sure og nøytrale fraksjoner, hvor monosakkarid-sammensetningen tilsvarte det Debes (1998) fant. Det ble funnet potent komplementær effekt for alle de sure fraksjonene, men kun en svært svak effekt for de nøytrale. RG-I ble påvist og den antikomplementære aktiviteten

ble tilskrevet de forgreinede områdene med sine nøytrale sidekjeder.

Mer utfyllende studier på biologisk aktivitet og struktur har i etterkant blitt utført av Inngjerdingen (2007). Et 50°C vannekstrakt ble separert på ionebytter, hvor to sure fraksjoner ble isolert, GOA1 og GOA2. For begge disse pektinfraksjonene ble det utført grundige strukturoppklaringer samt biologiske aktivitetstester. Resultatet av de biologiske testene var en markert økning av mRNA for IL-1 β i makrofager og for IFN- γ i NK-celler. GOA1 viste også stimulerende egenskaper på Peyer's patch celler, som igjen kan stimulere beinmarg-celler. Inngjerdingen konkluderte med at det så langt ikke er mulig å gi noen klar informasjon om optimal struktur for effekt, men at tredimensjonal struktur, fleksible sidegreiner og molekylvekt er viktige faktorer .

Lavmolekylære forbindelser

Det har blitt utført en del vitenskapelig arbeid på denne planten tidligere under synonymnavnene *Mollugo spergula* og *Mollugo oppositifolius*. Før 1998 dette var det hovedsakelig isolering av stoffer som saponiner, flavanoider, alkaloider og alkaner som ble utført Singh *et al.* (1982*a,b*). Det første vitenskapelige arbeidet gjort på kjemiske innholdstoffer ble utført av Chakrabarti & Barua (1964), hvor spergulagenin A, et triterpenoid saponin, ble oppdaget. Etter dette ble det isolert flere andre saponiner fra planten (Diallo, 2000).

Studier av biologisk aktivitet har blitt utført for flere av saponinene. Antimalaria aktiviteten har blitt målt *in vitro* av Traore-Keita *et al.* (2000). Metanol- og vannekstraktet viste ingen aktivitet, mens de alkaloidholdige kloroformekstraktene viste en potent antiproliferasjonsaktivitet på både klorokinsensitive og klorokinresistente stammer av *Plasmodium falciparum*. Traore *et al.* (2000) fikk lignende resultater, hvor det ren-isolerte saponinet glinocide A hadde dårligere effekt (ICH₅₀ = 42.30 mg/ml) enn ekstraktet (ICH₅₀ = 31.80 mg/ml).

G. oppositifolius har også tidligere blitt undersøkt for antifungal, larvisidal, molluscidal, antioksidant og radikal scavenging aktivitet av Diallo *et al.* (2001). Det ble funnet en positiv respons i alle disse metodene.

Kapittel 2

Målsetting for oppgaven

Dette er en todelt oppgave hvor første del tar for seg bioaktive polysakkarider i planten *Glinus oppositifolius*(L.) Aug. DC., hvor prøveopparbeidelse, strukturoppklaring og biologiske tester står sentralt. Del nummer to tar for seg etnofarmakologisk arbeid i Mali.

Det overordnede målet for oppgaven er å evaluere potensialet til maliske medisinsplanter. Kunnskaper om planten samles igjennom etnofarmakologiske studier, men også gjennom laboratoriarbeid hvor det utføres *in vitro* og *in vivo* tester. Resultatet av dette arbeidet vil være viktig for å kunne bedre legemiddelbehandling i Mali.

Mange av de farmakologiske virkningene til *G. oppositifolius* er tilskrevet bioaktive pektiner, og en del forskningsarbeid er alt utført på dette området. Målet til denne oppgaven er i all hovedsak å repetere og videreføre deler av arbeidet tidligere utført på denne planten. Resultatene kan gi en indikasjon på om polysakkaridinnholdet endrer seg om for eksempel vekstvilkår endres. Dette kan være viktig for biologisk effekt. Plantematerialet som ble benyttet i denne oppgaven ble høstet i Gourma, 1998. Plantematerialet benyttet i tidligere studier ble hovedsakelig høstet i Diré, 1996.

Del 1

Utgangspunktet for analyser av *G. oppositifolius* var et vannekstrakt isolert av Inngjerdingen i 2005. Dette materialet hadde blitt ekstrahert med 96 % EtOH, så 80 % EtOH, og videre med 50°C vann. Det vandige ekstraktet ble applisert på en gelfiltreringskolonne type P-6 (eluert med 10 mM NaCl(aq)). Det ble kun en markert topp, og det er polysakkaridene i denne toppen

dette arbeidet baseres på. Oppgavens mål kan oppsummeres slik:

1. Utføre enzymatisk degradering av pektinet.
2. Finne informasjon om strukturelle trekk i den isolerte pektinfraksjonen.
3. Utføre biologiske tester *in vitro* for å teste de isolerte pektinenes evne til å modulere viktige deler av immunforsvaret.
4. Sammenligne resultater med det som tidligere er funnet.
5. Undersøke om pektinekstraktet etter ionebytter kan gi akutte toksiske reaksjoner *in vivo*. Dette har ikke vært utført tidligere.

Del 2

Det ble bestemt å utføre en etnofarmakologisk studie i Mali på fem planter (*Opilia celtidifolia* Endl., *Biophytum petersianum* Klotzsch., *Combretum glutinosum* Perr., *Erythrina senegalensis* A.Rich. og *Syzygium guineense* D.C.). Det har alt blitt utført flere studier på disse plantene tidligere. Hovedmålene i del 2 kan beskrives slik:

1. Kartlegge ny informasjon om tradisjonell bruk av plantene. Indikasjoner, plantedel benyttet, formulering og doseringsregimer er informasjon som er ønskelig å øke kunnskapen om.
2. Undersøke om det er en god korrelasjon mellom hva som har blitt fortalt i tidligere studier om disse 5 plantene.
3. Utarbeide en detaljert tabell om bruken av plantene for seinere publikasjon.

Del I

Biologisk aktive polysakkarider fra
Glinus oppositifolius (L.) Aug. DC.

Kapittel 3

Metoder

3.1 Generelle metoder

3.1.1 Vannkvalitet

Alt vann som ble benyttet var destillert med Elix[®] millipore med Progard[®] 2 w/o polyfenol filter.

3.1.2 Innveiing

Analysevekt: Sartorius BP 221S.

Skålvekt: Model no. CT 1200V, OHAUS[®] corporation, USA Florham park.

3.1.3 Volumreduksjon

Det var ofte ønskelig å fjerne alt eller deler av løsemiddelet. Grunner for dette var ønske om oppkonsentrering, tørking eller fjerning av lett flyktige stoffer som toluen. Dette ble gjort på flere måter, enten ved hjelp av Buchi rotavapor og vannbad, avblåsning med nitrogen på varmemantel type PIERCE Reacti-therm 3 og Reacti-vap 3 eller ved hjelp av frysetørker (se metode 3.1.4). Flere av disse metodene ble benyttet i kombinasjon, eksempelvis volumreduksjon ved bruk av rotavapor før frysetørring.

3.1.4 Frysetørking

Prinsipp

Vann kan fjernes på en skånsom måte fra frosne prøver ved hjelp av sublimasjon. Dette skjer under lavt trykk (0.05 mp). Frysetørking er en velegnet metode for tørking av blant annet polysakkarider, ettersom produktet blir mer porøst og lettere å jobbe med. Løselighetshastigheten øker også, noe som er ønskelig.

Utstyr

- Metanolbad Hetofrig nedkjøler (Heto Birkerød).
- Alpha I-6 frysetørker(Christ).

Prosedyre

1. Prøvematerialet ble frosset ned under rotasjon i metanolbadet (-40°C) dersom rundkolber ble benyttet. Dersom mengden som skulle tørkes var liten, ble prøven satt i fryseboks noen timer til den var frossen.
2. Prøver i rundkolber ble festet utenpå frysetørker, mens prøver i andre beholdere ble dekket med perforert parafilm og satt inn i frysetørkeren.

3.1.5 Avgassing/evakuering av luft

Uønsket tilstedeværelse av O₂/luft ble fjernet ved en av disse metodene:

1. Vakuum fra vannstråle eller pumpe.
2. Fortregning ved bruk av Nitrogen, Helium eller Argon.

3.1.6 Sentrifugering

Følgende sentrifuger har blitt benyttet:

- Multifuge 4KR Hearaeus.
- MSE Minor centrifuge nr 57, England.
- Christ 901 (FHI).
- CP Centrifuge (Beckmann) (FHI).

3.1.7 Filtrering

Membranfilter:

- Millex[®] HA - Syringe driven Filter Unit, 33 mm, 0.45 μm (Millipore).
- Millex[®] AA - Syringe driven Filter Unit, 33 mm, 0.80 μm (Millipore).
- Acro[®] 50 A - Filter device, 5 μm Versapor membrane[®] (Pall life science).
- Acrodisk[®] - 37 mm syringe filter, 1 μm , glassfiber membrane. (Pall life science)

Sprøyte med filterenhet for filtrering av mindre volum, mens nutsj og vannstråleoppsats ble benyttet for større væskemengder. Ved bruk av nutsj ble MFTM - membrane filter, 0.45 μm HA (Millipore) benyttet.

3.1.8 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet ved hjelp av Vibrax-VXR (IKA labortechnik), Whirlimixer (Fisions) og MS2 Minishaker (IKA).

3.1.9 pH-målinger

pH ble målt ved hjelp av pH-papir, universalindikator pH: 0-14 (Merck) eller Orion pH-meter modell 420 A (Orion reserch inc. USA) med Heidolph MR 1000 elektrode. Kalibrering av apparatet ble utført med Orion buffer: pH 4.01, 7.00 og 10.01.

3.1.10 Syrevasking av glassutstyr

Glassutstyr til som ble brukt til blant annet metanalyse og metylering ble syrevasket for å unngå kontaminasjon av polysakkarider. Syrevasking vil spalte og ødelegge polymerene og etterfølgende skylling med vann vil fjerne restene av polysakkarider fra glassutstyret.

Utstyr

- Varmeskap Functionline (Heraus Instruments).
- pH-papir.
- Beskyttelsesutstyr.

Reagenser

- Konsentrert HCL (37 %).
- Springvann og destillert vann.

Prosedyre

1. Utstyret som skulle vaskes ble plassert i en egnet beholder i avtrekk og dekket med saltsyre. Dette ble satt til henstand i 30 min.
2. Utstyret ble først skylt under rennende vann til pH 5-6, samme pH som springvannet.
3. Utstyret ble så skylt to ganger i destillert vann.
4. Utstyret ble tørket i varmeskap (80°C) i 2-3 timer.

3.1.11 Dialyse

(Spektrum, 2005)

Prinsipp

Dialyseslangene består av en semipermeabel membran, med en gitt "cut off" verdi. I denne forbindelse vil det si at alle molekyler over denne verdien forblir inne i slangen, mens molekylene med en lavere molekylvekt vil diffundere ut av slangen i en hastighet som er avhengig av den osmotiske gradienten. Dette gjør det nødvendig å skifte vann ofte dersom det er mye lavmolekylære stoffer i vannet. Tørre, nye slanger kan inneholde cellulose, løselige karbohydrater og glyserol. Slangene blir derfor vasket grundig før bruk.

Reagenser

- 2 % NaOH (aq).
- Destillert vann.
- 0.05 % NaN₃ (aq).
- Toluen.
- Mettet AgNO₃ (aq).

Utstyr

- Kokeplate.
- Store begerglass.
- Glasstaver.
- Dialyseslanger: Spectra/por[®] MWCO: 3500 (Spectrum laboratories Inc, USA).
- Plastbøtte.
- Dialyseklemmer.
- Magnet og magnetrører.

Prosedyre:

A. Vasking av dialyseslanger:

1. Slangene ble kuttet i ønsket lengde, 60-100 cm.
2. Slangene ble vasket i vann fra springen, utvendig og innvendig.
3. Slangene ble overført til 2 % kokende NaOH (aq), og kokt i 10 minutter.
4. Etter koking ble slangene skylt i springvann og deretter destillert vann.
5. Slangene ble kokt på nytt i destillert vann.
6. Frem til bruk ble slangene oppbevart i 0.05 % NaN₃ (aq) i kjøleskap.
7. Ved bruk ble NaN₃ fjernet ved at slangene ble lagt i destillert vann i 30 min.

B. Dialyse av høymolekylære substanser:

1. Slangene ble lukket i den ene enden ved bruk av klemmer eller en knute.
2. Slangene ble fylt ca 3/4 fulle, avhengig av saltkonsentrasjon. Slangene kan sprekke dersom den dialyseløsningen inneholder mye salt ettersom vann diffunderer inn i slangen. Ved å tilsette noen dråper toluen til hver prøve, unngår man mikrobiologisk vekst. Deretter ble luft fjernet og slangen forseglet ved bruk av knute eller klemme.
3. Dersom saltinnholdet i prøven var spesielt høyt som for eksempel etter ionebytter, ble prøvene først dialysert i rennende springvann natten over.

4. Prøvene ble dialysert i destillert vann på benken under omrøring. Vannet ble skiftet etter behov, minst 2 ganger i døgnet.
5. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av vannet ikke ble blakket ved tilsetning av noen dråper AgNO_3 (aq).

3.1.12 Absorbansmålinger

UV-absorbansmålinger ble utført i forbindelse med fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1), Lowrys test (metode 3.4.1) og DNS- testen (metode 3.5.3).

For mikroplater med 96 bunner (Sarstedt A/S) ble det benyttet Microplate reader modell 3550 (BIO-RAD), mens for tester i reagensglass ble Thermo Spectronic - modell Helios Epsilon (Thermo electron corp. USA).

3.2 Isolering av polysakkarider

3.2.1 Ionebytterkromatografi - DEAE Sepharose Fast flow

(AmershamBiosciences, 2004b)

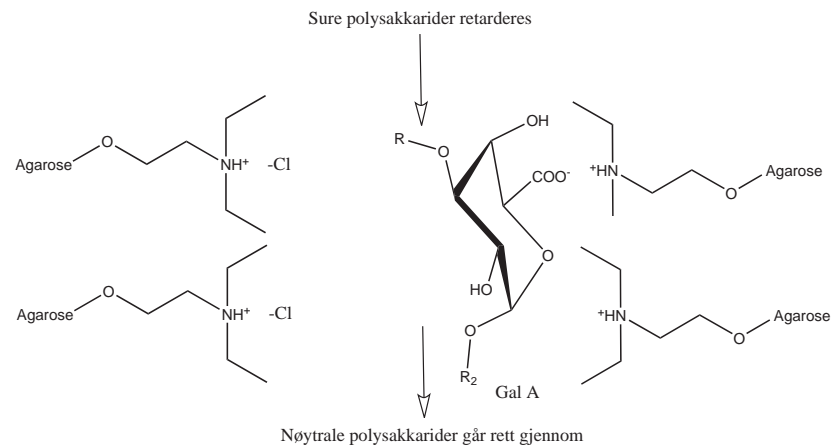
Prinsipp

En ionebytter består av en stasjonærfase med positivt eller negativt ladede partikler. Disse to hovedtypene har henholdsvis fått navnene anionbytter og kationbytter. Det er kun benyttet anionbytter i denne oppgaven. I en anionbytter vil nøytrale og positivt ladede forbindelser gå gjennom ionebytterkolonnen uten forsinkelse. For å eluere de negative forbindelsene, som blir holdt tilbake på grunn av ioniske interaksjonen, benyttes det en salt gradient (NaCl). Ionebytter kromatografi har fått navnet sitt fordi mot-ionet byttes ut ved med andre ioner som ved gitte forhold har en sterkere elektrostatiske binding til stasjonærfasen.

DEAE er en svak anionbytter med dietylamoetyl (DEAE) som funksjonell gruppe med Cl^- som mot-ion. Før prøven kan settes på må kolonnen mettes av Cl^- ioner. Dette gjøres ved hjelp av NaCl (aq).

Reagenser

- Destillert og de-gasset vann.



Figur 3.1: DEAE vil kunne ha forskjellige mot-ioner som for eksempel Cl^- og protonerte uronsyrer. filnavn:DEAEsepharose.

- 2 M NaCl (aq).
- 0.05 % NaN_3 (aq).

Utstyr

- Pakkemateriale: DEAE - Sepharose[®] fast flow.
- Kolonne: XK50 h:22.5 cm.
- Kolonnevolum: 440 cm^3 .
- Pumpe: Perimax 4 kanaler (Spetec).
- Fraksjonsamler: LKB-SuperFrac (Pharmacia).
- Oppsamlingsør: Sentrifugerør RB, 15 ml (Heger AS).
- Sentrifuge: Multifuge 4KR Hearaeus.
- Dialyseslanger: Spectra/por[®] MWCO: 3500.
- Nutsj og vannstråleoppsats: MFTM - membrane filter, 0.45 μm HA (Millipore).
- Glasstav.

Betingelser

- Elueringshastighet: 2 ml/min.
- Injeksjonsvolum: 300 ml.
- Fraksjonsstørrelse: 10 ml ble samlet i hvert rør.

- Elueringsmiddel: 0-2 M NaCl (aq).

Prosedyre

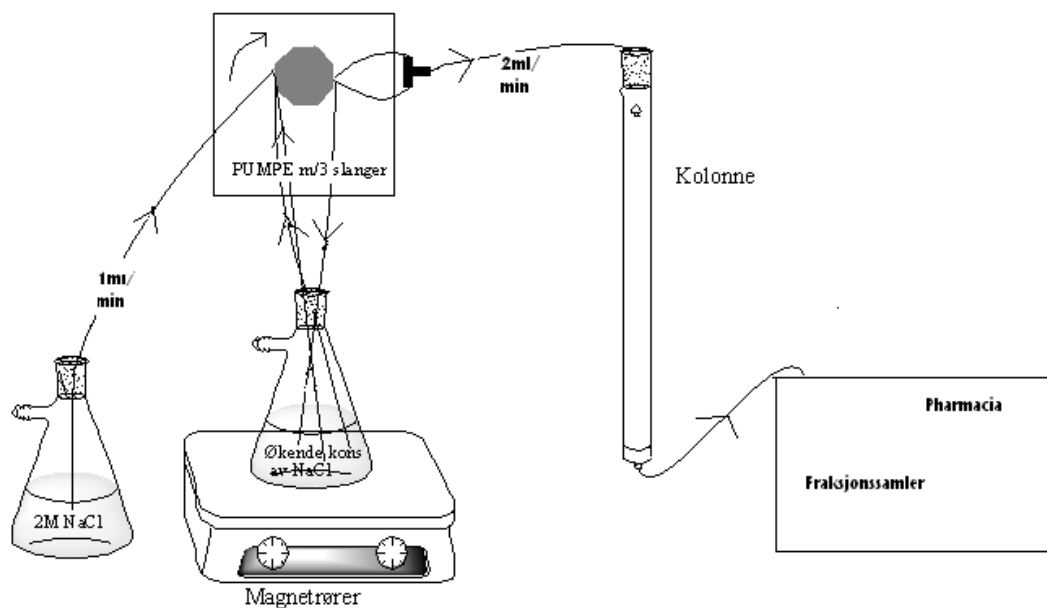
(AmershamBiosciences, 2004c)

A. Pakking av kolonne:

1. Alt materialet og løsninger ble romtemperert før pakking A.
2. Overskuddet av konserveringsvæsken ble helt av, og det ble tilsatt 2 M NaCl (aq) tilsvarende 1/4-del av pakkematerialet. Det gir en masse med passe viskositet, slik at kolonnen blir jevnt pakket.
3. Luften fjernet ved hjelp av vannstrålepumpe.
4. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for å unngå luftbobler.
5. 3 kolonnevolum med destillert av-gasset vann ble pumpet gjennom kolonnen med en konstant hastighet på 3 ml/min. (Det er viktig at man ikke overstiger 75 % av pakkehastigheten i påfølgende eluering av prøven).
6. 1.5 kolonnevolum med 2 M NaCl (aq) ble eluert gjennom kolonnen ved 2 ml/min for å sikre at Cl⁻ er det dominerende mot-ionet.
7. Overskuddet av salt ble vasket ut med 3 kolonnevolum vann.
8. Kolonnen er klar for bruk.

B. Applisering og eluering av prøveløsning: Saltgradienten under eluering kan beregnes ved hjelp av følgende formel: $C/T_1 = (C_0R)/V_0$. C = konsentrasjon i blandekaret ved tiden T, T = tid forsøket skal ta, C₀ = utgangskonsentrasjon i saltkammer (2 M), R = hastigheten fra saltløsningen til blandekaret (1 ml/min) og V₀ = startvolumet i blandekaret.

1. Råekstraktet ble sentrifugert ved 4000 rpm i 10 minutter og deretter ble 200 ml av prøveløsningen applisert på kolonnen.
2. De nøytrale polysakkaridene ble eluert med to kolonnevolum vann og kastet.



Figur 3.2: Oppsats av gradienteluering. Legg merke til at pumpen fører 2 M NaCl (aq) til blandekaret med 1 ml/min, og at to slanger med 1 ml/min går fra blandekaret til kolonnen, slik at elueringshastigheten blir 2 ml/min.

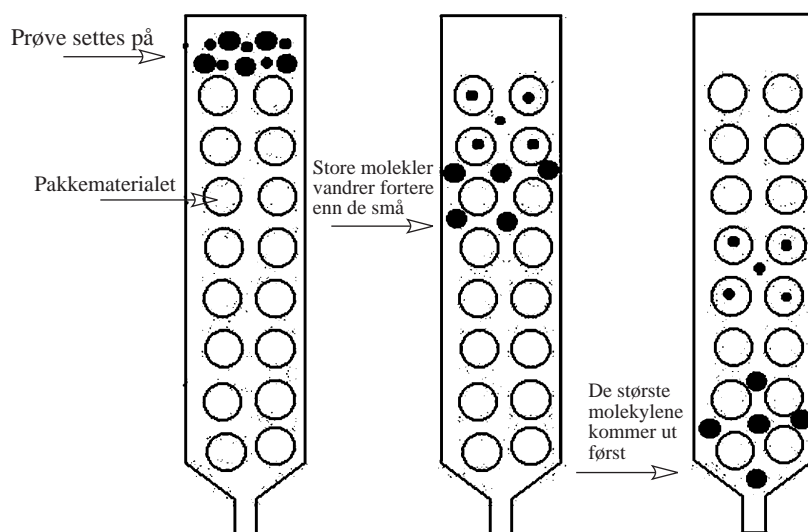
3. Sure polysakkarider ble så eluert med en lineær NaCl gradient (se figur 3.2 for forsøksoppsett). 100 rør á 10 ml fraksjoner ble samlet opp og testet for karbohydratinhold ved bruk av fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1).
4. Fraksjonene ble delt inn etter elueringsprofil, dampet inn, dialysert og frysetørket.

C. Regenerering av kolonnen etter bruk

1. Kolonnen ble eluert med et kolonnevolum 2 M NaCl (aq).
2. Kolonnen ble så eluert med destillert vann til 1 ml av eluatet ikke ble blakket ved tilsetning av 2 dråper mettet AgNO_3 (aq). Erfaringsmessig tilsvarer dette ca 3 kolonnevolum.

3.2.2 Gelfiltrering

(AmershamBiosciences, 2004a)



Figur 3.3: Skjematisk oppsett av hvordan gel-kromatografi fungerer.

Generelt prinsipp

Gelfiltrering benyttes for å separere høymolekylære stoffer etter molekylstørrelse og konfigurasjon. Den stasjonærfasen består av mange porøse, sfæriske partikler som det er mulig å passere inn i for molekyler lavere enn cut-off verdien. Som vist på figur 3.3, vil da små molekyler ta en lengre vei før de elueres ut sammenlignet med store molekyler. Molekyler som er for store til å passere inn i porene vil bli ført ut med mobilfase og derfor elueres ut med void. Med ordet void menes eluert volum av en forbindelse som ikke retarderes av kolonnen. Gel-materialet er tilgjengelig med forskjellig porestørrelser for å kunne separere forbindelser i et bredt spekter av molekylvekter.

Bio-gel P30

(Bio-Rad, 2007)

Som alle bio-geler består Bio-gel P30 av polyacrylamid partikler. Disse er ekstremt hydrofile og nesten fri for ladning. Bio-gel P30 har et fraksjoneringsområde mellom 2500-40.000 Da. Cut-off verdien er da 40.000 Da. I denne sammenhengen betyr det at molekyler over 40.000 Da ikke vil separeres, men komme samlet ut med void. Monosakkarider og oligosakkarider fra for eksempel enzymatisk degradering vil komme ut helt til sist, og derfor bli skilt fra de høymolekylære forbindelsene. Ved å eluere med destillert vann som i dette tilfellet, blir man

også kvitt salter i prøven.

Reagenser:

- Alle løsninger ble filtrert $0.45 \mu\text{m}$.
- Destillert vann (de-gasset).
- 0.05 % NaN_3 (aq).

Utstysrliste:

- Kolonne: XK26 (Pharmacia) L:100 cm, B:5 cm.
- Pakkemateriale: Bio-gel P 30 100-200 mesh (wet), cut-off: 30000D (Bio-rad laboratoris, K nr:73203).
- Kolonnevolum etter pakking: 0.47 dm^3 , L: 89 cm.
- Pumpe: Pump P-1 (Pharmacia Biotech).
- Fraksjonssamler: RediFrac (Pharmacia Biotech).
- Mikrofilter: Millex[®] HA - Syringe driven Filter Unit, 33 mm, $0.45 \mu\text{m}$ (Millipore).

Betingelser:

- Elueringshastighet: 0.5 ml/min.
- Injeksjonsvolum: 4 ml.
- Fraksjonsstørrelse: 2 ml ble samlet i hvert rør.
- Konsentrasjon av prøve: ca 25 mg/ml.
- Elueringsmiddel: destillert vann.

Prosedyre:**A. Pakking av kolonne:**

1. 55 g materiale ble satt til svelling natten over i 1000 ml (9 ml/g) destillert vann.
2. Deler av supernatanten ble fjernet, for å få en passe tykk suspensjon.
3. Gelen ble de-gasset på vannsug.
4. Ved hjelp av rolige bevegelser, for å unngå luftbobler, ble suspensjonen redispersert.

5. 10 ml destillert vann ble helt oppi kolonnen. Kolonnematerialet ble så overført til kolonnen ved hjelp av en glasstav for å hindre dannelse av luftlommer i matrix. Det ble også benyttet et adapter til forlengelse av kolonnen for å klare å pakke kolonnen tilfredsstillende.
6. Vann ble pumpet gjennom kolonnen med 0.6 ml/min for å pakkekolonnen.

B. Applisering og eluering:

1. Ekstraktet (4 ml, mindre enn 1 % av kolonne volumet) ble filtrert 0.45 μm og applisert på kolonnen med en hastighet på 0.25 ml/min. Etter applisering ble hastigheten økt til 0.5 ml/min.
2. Det ble samlet 110 fraksjoner á 2 ml.
3. Karbohydratprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1).

C. Vasking og konservering: Etersom det ble eluert med destillert vann, er det ikke nødvendig med en omfattende vaskeprosedyre. Det ble kjørt 1.0 kolonnevolum med vann etter endt eluering av prøve. Etter bruk ble kolonnen konservert med 1.5 kolonnevolum 0.05 % NaN_3 (aq).

Sephacryl S-200

Sephacryl har en gel-matriks med stor mekanisk styrke. Dette gjør at det er mulig å kjøre en relativt høy elueringshastighet. Sephacryl S-200 har et separasjonsområde mellom 1000 og 80 000 D. Etter opprensing på ionebytter ble ekstraktet applisert på denne kolonnen.

Reagenser:

- 10 mM NaCl (aq) filtrert 0.45 μm HA (Millipore).
- 0.05 % NaN_3 (aq).

Utstysrliste:

- Kolonne: XK25 (Pharmacia) L:100 cm, B:5 cm.
- Pakkemateriale: Sephacryl S-200 superfine, Fine chemicals (Pharmacia).
- Kolonnevolum etter pakking: 0.438 dm^3 , L: 82.5 cm.

- Pumpe: Pump P-1 (GE-health care).
- Fraksjonssamler: RediFrac (Pharmacia Bioteck).
- Mikrofilter til prøve: Millex[®] HA - Syringe driven Filter Unit, 33 mm, 0.45 μm (Millipore).
- Mikrofilter til elueringsmiddel: MFTM - membrane filter, 0.45 μm HA (Millipore).

Betingelser:

- Elueringshastighet: 1 ml/min.
- Volum applisert: 4 ml.
- Fraksjonsstørrelse: 5 ml ble samlet i hvert rør.
- Konsentrasjon av prøve: 15-20 mg/ml.
- Elueringsmiddel: 10 mM NaCl (aq).

Prosedyre:

A. Pakking av kolonne: Kolonnematerialet kjøpes inn ferdig sveltet i en 20 % etanol løsning. Resten er som ved pakking av Sephacryl S-200 som står beskrevet over.

B. Applisering og eluering:

1. Mellom 60 og 82 mg lyofilisert polysakkarid ble løst i 4 ml destillert vann og etterfølgende filtrert 1 μm .
2. Det ble samlet opp 60 rør á 5 ml.
3. Karbohydratprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1).

C. Regenerering og konservering av kolonnen: Kolonnen ble ikke vasket mellom prøvepåsettingene, men etter applisering av prøve ble det kjørt et kolonnevolum med elueringsmiddel. Kolonnen ble konserverert med et kolonnevolum filtrert 0.05 % NaN_3 (aq) etter bruk.

PD-10 kolonne

(GE-Healthcare, 2007)

PD-10 kolonne er ferdigpakket Sephadex[®] G-25 medium med et svært lavt fraksjoneringsområde på 1000-5000 D og benyttes til avsalting av små prøvevolum (maks 2.5 ml). De er spesielt

gode å anvende ved metylering (metode 3.5.5). Det er også mulig å bruke denne til separering av små prøvevolum etter enzymdegradering. Da bør man ikke sette på mer enn 0.5 ml. Man får da separert polysakkaridene over 5000 D fra dem som er mindre. Man får ingen separasjon av de høymolekylære forbindelsene seg i mellom. De vil komme ut samlet.

Reagenser:

- Destillert vann.
- 0.05 % NaN_3 (aq).

Utstyr:

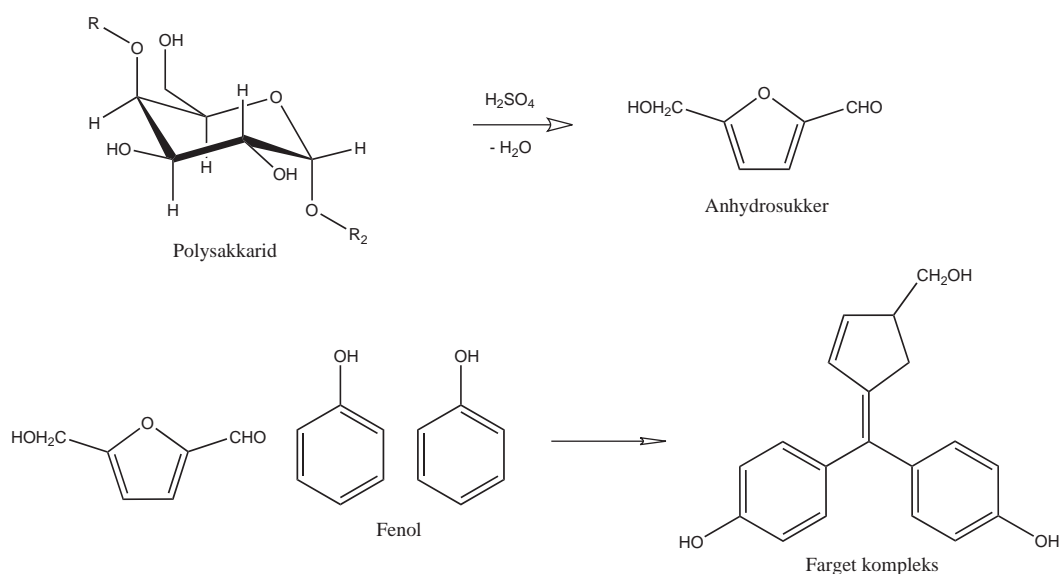
- PD-10 kolonner, ferdigpakket (Amersham Pharmacia Biotech) L: 5 cm, B: 1.5 cm.
- Oppsamlingsrør: plastrør 5 ml.
- Finn[®] pipetter 200-1000 μl .
- Stativ til å feste kolonnen.

Betingelser:

- Applisert volum: 2.5 ml.
- Fraksjonsstørrelse: 1 ml ble samlet i hvert rør.
- Elueringsmiddel: destillert vann.

Prosedyre:

1. Kolonnen ble vasket med 25 ml vann.
2. 2.5 ml prøveløsning ble applisert. Eluatet ble kastet.
3. Det ble samlet opp 6 fraksjoner á 1 ml.
4. Karbohydratprofil ble bestemt ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 3.3.1).
5. Kolonnen ble vasket med nye 25 ml vann før den var klar for ny bruk.
6. Etter endt bruk, ble kolonnen konserverert med 0.05 % NaN_3 (aq).



Figur 3.4: Postulert reaksjonsmekanisme mellom monosakkarid, fenol og svovelsyre.

3.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

3.3.1 Kolorimetrisk metode for å bestemme mengde polysakkarid: Fenol-svovelsyretesten

(Dubois *et al.*, 1956)

Prinsipp

Alle typer karbohydrater vil når behandlet med svovelsyre og fenol, danne et oransje-gult kompleks. Reaksjonen er svært sensitiv, og fargen er stabil. Svovelsyren vil spalte polysakkaridene til monosakkarider (syremediert acetalspalting) og videre til et anhydrosukker. Dette vil videre kondensere med fenol. Hvordan denne reaksjonen går for seg i detalj, er ennå uvisst, men figur 3.4 viser en postulert mekanisme. Komplekset som dannes kan detekteres spektrofotometrisk ved 490 nm. Denne testen brukes mye for å bestemme karbohydratinnhold i en løsning.

Reagenser

- 4 % fenol (aq).

- Konsentrert svovelsyre.

Utstyr

- Finnpipette[®] (40-200 μ l).
- Glassrør (5 ml).
- Whirlimixer (Fisons).
- Mikroplater med flatbunn.
- Mikroplateleser: BIO-RAD modell 3550.
- Verneutstyr.

Prosedyre

1. 100 μ l av løsningen som skulle testes ble overført til glassrør og tilsatt 200 μ l fenol og 1 ml svovelsyre. Hvert av glassene ble mikset på whirlimixer. I de tilfellene med lite prøveløsning ble det benyttet 25 μ l prøve, 50 μ l fenol og 250 μ l svovelsyre.
2. Rørene ble satt til henstand i 30 minutter for å la fargen utvikle seg ordentlig.
3. 200 μ l fra hvert av glassene ble overført til en mikrotiterplate før avlesning ved 490 nm.

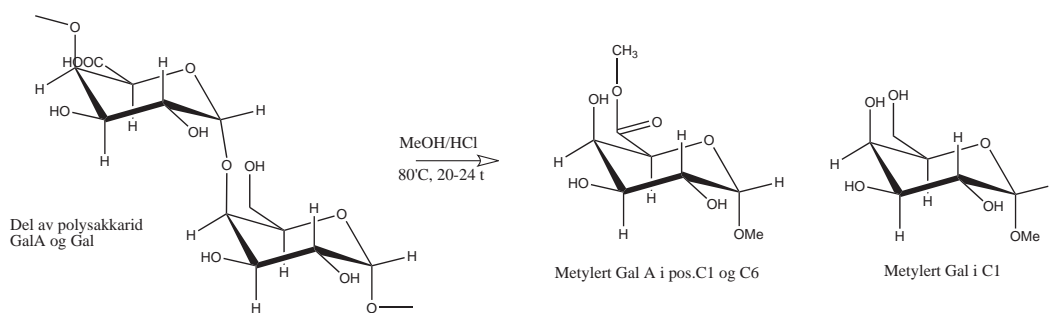
3.3.2 Metanolyse

(Chambers & Clamp, 1971)

Spalting av polysakkarider er første steg før man kan analysere hvilke monosakkarider polysakkaridet består av (se figur 3.5). For å unngå dekomponering av monosakkaridene benyttes metanolyse i vannfritt miljø. Man får da metylglykosider og metylforestrede uronsyrer. For å korrigere for eventuelle tap under metanolsen benyttes mannitol som intern standard. Etter metanolyse derivatiseres monosakkaridene med TMS-reagens (metode 3.3.3) for å bli flyktig nok for å kunne analyseres med gasskromatografi (metode 3.3.4).

Reagenser

- 4 M og 6 M HCl i vannfri metanol.
- Intern standard: Mannitol 1 mg/ml.
- Vannfri metanol.



Figur 3.5: Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid.

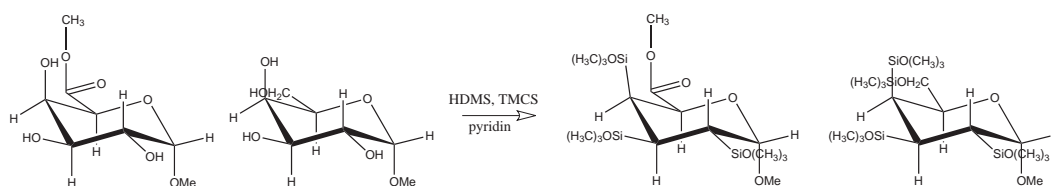
Utstyr

- Supelcorør m/kork.
- Transferpettor[®] 50-100 μ l (Brand).
- kapillærrør (blå).
- 2 ml glasspipette og pelusballong.
- P₂O₅- evakuert vakuumeksikator.
- Varmeenhet for tørking under N₂ gass - Reacti-Therm[™] III (Pierce).
- Nitrogengass.

Alt glassutstyret ble syrevasket.

Prosedyre

1. 1 mg tørket prøvemateriale ble veid opp i supelco-rør.
2. Røret ble så dekket med perforert film og satt i vakuumeksikator natten over.
3. 1 ml 4 M HCl i MeOH og en gitt mengde internstandard ble tilsatt (50-300 μ l, avhengig av hvilke monosakkarider man er mest interessert i).
4. Kork ble skudd på og røret satt i varmeskap (80°C) i 20-24 timer. Etter ca 10 minutter ble det løsnet på korken for å slippe ut overtrykk. Korken ble så skrudd godt på for å unngå fordamping)
5. Prøven ble dampet til tørrhet ved 40°C under nitrogengass.
6. 200 μ l vannfri metanol ble tilsatt og dampet av. Dette ble gjort 3 ganger.
7. Prøven ble tørket i eksikator i minimum 1 time før den ble TMS derivatisert (metode



Figur 3.6: TMS derivering av metanolyserte polysakkarider.

3.3.3).

3.3.3 TMS (trimetylsilan) derivatisering

(Sweeley *et al.*, 1963)

For å lage flyktige og termisk stabile derivater av monosakkaridene lar man alle polare hydroksylgruppene i molekylet reagere med TMS-reagens, se figur 3.6.

Reagenser

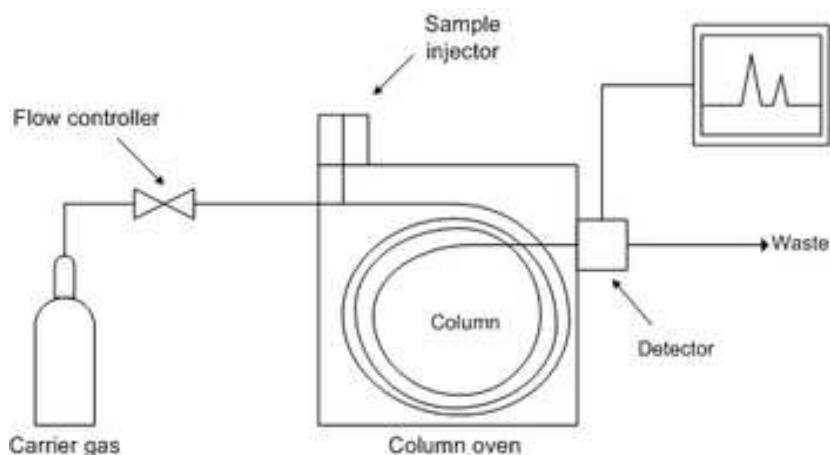
- TMS reagens: Trimetylklorosilan (TCMS) 1 del.
- Heksametyldisilazan (HMDS) 2 deler.
- Pyridin, vannfri 5 deler.

Utstyr

- Transferpettor[®] 50-100 μ l (Brand).
- SMI kapillærrør (blå).
- Whirlimixer (Fisons).

Prosedyre

1. Den tørre, metanolyserte prøven fra metode 3.3.2 ble tilsatt 200 μ l TMS og blandet godt på whirlimixer.
2. Prøven ble satt til henstand med kork på i minst 30 minutter før analyse ved hjelp av gaskromatografi (se metode 3.3.4).



Figur 3.7: Skjematisk oppsett av en gasskromatograf.

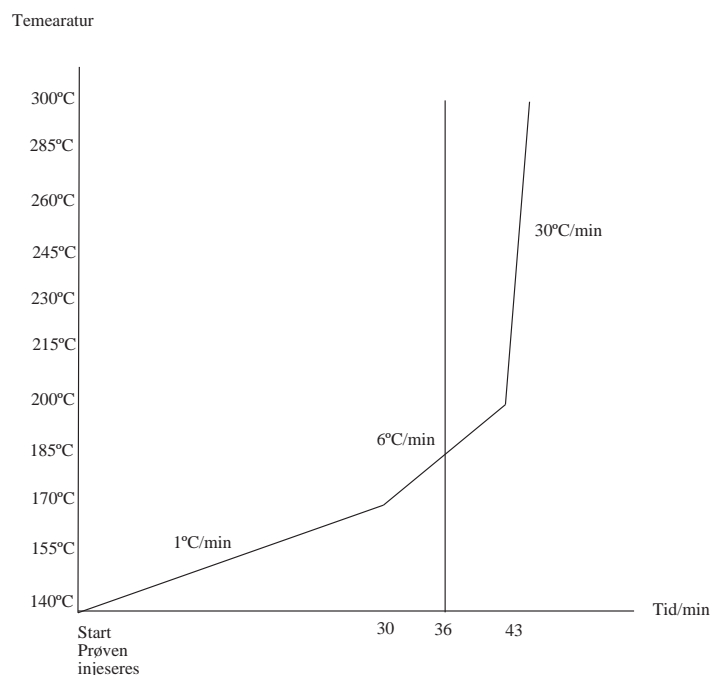
3.3.4 Gasskromatografi

(Rasmussen, 1998)

Ved bruk av gasskromatografi kan man separere stoffer på bakgrunn av kokepunkt, masse og interaksjon med stasjonærfase. Stoffer som skal analyseres ved hjelp av GC må være termisk stabile ved høye temperaturer (opp mot 350°C), lett flyktige og hydrofobe. Prøven injiseres i en injektor hvor den umiddelbart fordampes og blir til gass. Deler av denne gassen entrer kolonnen. Tiden de forskjellige bestanddelene i gassen bruker gjennom kolonnen blir registrert av en detektor som sender informasjonen videre til en integrator og en printer skriver ut kromatogrammet med verdiene for arealet under de forskjellige toppene (se figur 3.7). Arealet under en topp tilsvarer en relativ mengde av stoffet. Når man skal tolke spekteret, må man korrigere for at ikke alle de forskjellige typene monosakkarider gir like høye signaler. For eksempel så gir uronsyrer lavere signaler enn de nøytrale polysakkaridene. Dette korrigeres for gjennom bruk av standardkurver. Hvert monosakkarid gir et karakteristisk mønster av toppe ved visse retensjonstider. Ved hjelp av dette kan man med stor sikkerhet vite hvilke monosakkarider prøven består av.

Utstyr og betingelser

- Gasskromatograf: GC 6000 VEGA SERIES 2 (CARLO ERBA INSTRUMENTS) Programmeringsenhet: ICU 600.
- Integrator: C-R6A CHROMATOPAC (Shimadzu).



Figur 3.8: Temperaturprogram. Etter 36 min har alle forbindelsene vi er interessert i kommet ut, men for å få ut eventuelle forurensninger økes temperaturen ytterligere til 300°C.

- Detektor: FID.
- Injektor: Splitt:splittless (Splittforhold 1:6).
- Kolonne: DB5 fused silica kapillærkolonne (J&W scientific). Lengde: 30 m, indre diameter: 0.32 mm, Filmtykkelse: 0.25 μm .
- Bæregass: Helium.
- Flow: Gjennom kolonnen: 1.8 ml/min (37.6 cm/sek).
- Splitt flow: 11 ml/min.
- Injeksjonsvolum: 0.5 - 1.0 μl .
- Injektortemperatur: 260°C.
- Detektortemperatur: 310°C.
- Temperaturprogram: Se figur 3.8.

3.4 Proteinbestemmelse

3.4.1 Proteinbestemmelse ved bruk av LOWRY-test

(Lowry *et al.*, 1951; Peterson, 1979)

Prinsipp

Det finnes mange måter å utføre denne testen på med ulike reagenser, men prinsippet er det samme. Et problem med denne metoden er interfererende substanser som ofte er polysakkarider i høye konsentrasjoner samt lavmolekylære forbindelser. Ved å felle proteinene først med triklorediksyre og Na-deoxykolat fjernes mange av de interagerende forbindelsene (dette er ikke alltid nødvendig). Proteinet løses så i en basisk kobberløsning, og så tilsettes folin ciocalteus fenolreagens. Proteinet reagerer med molybden-wolframsyren i dette reagenset, og danner en blå farge i det synlige spekteret, med maksimum absorpsjon ved 740 nm (Folin & Ciocalteu, 1927). Kobber-ionene øker sensitiviteten til metoden ved å danne chelat med peptidene, som da reduseres lettere til kromoforer med en karakteristisk blå farge. Metoden reagerer først og fremst med kromofore aminosyrer som tyrosin og tryptofan og til dels cystein og histidin. Standardkurven er laget av albumin, som har en annen sammensetning og struktur enn planteproteiner. Proteinmengden i prøven vil derfor ikke direkte korrelere til standardkurven. Dette er en kolorimetrisk metode som gir en relativt stor usikkerhet, og er uegnet om absolutte verdier trengs.

Reagenser

- Felling av proteiner:
 - 2 % Na-deoxykolat (aq).
 - 24 % Triklorediksyre (aq).
- Lowry-reagenser:
 - Lowry A: 2 % Na_2CO_3 i 0.1 M NaOH (aq).
 - Lowry B: 0.5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i 1 % Tri-natriumcitrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
 - Lowry C: 50 ml Lowry A, 1 ml Lowry B (NB! Må være nylaget).
 - Lowry D: Folin Ciocalteus fenolreagens fortynnet 1:2 med destillert vann.
- Standardkurve:

- En serie forskjellige konsentrasjoner mellom 0-40 μl av bovint serum albumin, 1.26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ benyttet for å lage standardkurve. NB! Lowry-metoden er ikke lineær over hele området.

Prosedyre

1. Prøvene (3 paralleller à 0.5 mg) og standardene (3 paralleller) ble fortynnet med destillert vann til 3 ml.
2. Hvert rør ble tilsatt 25 μl Na-deoxykolat (aq), ristet grundig, og satt til henstand i værelses temperatur i 15 min.
3. Løsningene ble tilsatt 1 ml trikloreddiksyre (aq), blandet på whirlimixer og sentrifugert i 30 minutter ved 3300 rpm.
4. Supernatanten ble fjernet.
5. Bunnfallet ble løst i 1.5 ml Lowry C og blandet på whirlimixer.
6. 150 μl Lowry D tilsettes, og blandes øyeblikkelig.
7. Etter 45 min henstand i mørke ved værelsestemperatur ble absorbanse avlest ved 660 nm.

3.5 Strukturoppklaring

3.5.1 Molekylvektbestemmelse

Superose 6 10/300 pre packed GL

(AmershamBiosciences, 2004a)

Superose 6 ferdigpakket kolonne er en gelfiltreringskolonne hvor gelmaterialet består av sterkt kryssbundet agarose. Superose 6 separerer proteiner i størrelsesområdet 5000-500.000 D. For karbohydrater er dette området vesentlig lavere, muligens helt ned i 5000 - 200.000 D. I dette tilfellet ble kolonnen koblet til en FPLC for å utføre en molekylvektsdistribusjons analyse av ekstraktene. Ved hjelp av 6 dekstranstandarder med kjent molekylvekt ble det laget en standardkurve. Denne kurven ble benyttet for å finne omtrentlig molekylvektsdistribusjon av

de forskjellige ekstraktene. Det ble benyttet en høyere konsentrasjon av de størst standardene ettersom de gav en relativt lav respons ved fenolsvovelsyre testen (metode 3.3.1).

Reagensliste:

- 10 mM NaOH (aq) (de-gasset med Helium).
- Dextran T 500 lot 9307, Mw: 475 000 D, Mn 153 000.
- Dextran B512, Dex 40 T 8630 Fr 7, Mw: 19 000 D, Mn: 18 500.
- Dextran B512, Fr 11640-I-IV, Mw: 2360 D, Mn 2000.
- Dextran 50 000 analytisk standard, Mw: 50 000 D.
- Dextran 80 000 analytisk standard, Mw: 80 000 D.
- Dextran 100 000 analytisk standard, Mw: 100 000 D.

Utstørliste:

- Kolonne: Superose 6 10/300 pre packed GL (Amersham Bioscience, Sverige).
- Kolonnevolum: 25 ml.
- FPLC: ÅKTA FPLC.
- Pumpe: P-920.
- Injektor: Valve Inv-907.
- Monitor: UPC-900 (Amersham pharmasia Biotech, Sverige).
- Fraksjonssamler: Frac 900 (Amersham pharmasia Biotech, Sverige).
- Detektor: RID-10A (Shimadzu).
- Skriver til RID: Rec 112 (Amershem Bioscience, Sverige).
- Dataprogram: Unicorn v 4.00.16.
- Fraksjonsrør: 7 ml (Heger AS).
- Sprøyte med filter: Millex[®] HA - Syringe driven Filter Unit, 33 mm, 0.45 μm og 0.80 μm (Millipore).
- Filter til filtrering av elueringsmiddel: MFTM - membrane filter, 0.45 μm HA (Millipore).

Betingelser:

- Elueringshastighet: 0.5 ml/min.
- Loop, injeksjonsvolum: 500 μl .
- Fraksjonsstørrelse: 1 ml ble samlet i hvert rør.

- Konsentrasjon av prøve: 2 mg/ml.
- Elueringsmiddel: 10 mM NaCl (aq).

Prosedyre:

A. Vasking og klargjøring av kolonnen: Kolonnen ble klargjort på denne måten:

1. 12 ml destillert vann med flow 0.2 ml/min.
2. 38 ml destillert vann med flow 0.5 ml/min.
3. 50 ml 10 mM NaCl (aq).

Etter bruk ble kolonnen vasket og konserverv på denne måte:

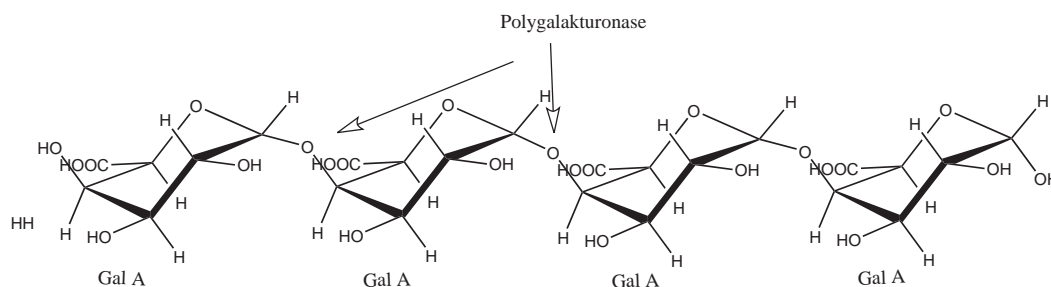
1. 50 ml 0.5 M CH₃COOH (aq) med flow 0.5 ml/min.
2. 60 ml destillert vann med flow 0.5 ml /min.
3. 50 ml 20 % etanol med flow 0.5 ml/min.

B. Applisering av prøve og standarder på kolonnen:

1. 1-2 mg av dekstran-standardene ble løst to og to sammen i 1 ml vann.
 - Standard A: 2.0 mg 150000 D / 1.0 mg av 2350 D.
 - Standard B: 2.0 mg 475000 D / 1.5 mg 50000 D.
 - Standard C: 2.0 mg 80 000 D + 1.0 mg 19000 D.
2. Prøvene og standardene ble applisert på kolonnen.
3. Karbohydratinnholdet ble bestemt ved fenolsvovelsyretesten (se metode 3.3.1).
4. Kolonnen ble vasket etter bruk og satt vekk på kjølerommet med 20 % sprit.

3.5.2 Enzymatisk degradering av pektin

Enzymatisk degradering av GA1 ble utført for å isolere de forgreinede områdene av pektinet. Endo-polygalakturonidase degraderer 1,4-GalA ved å katalysere hydrolyse av glykosidbindinger som binder sammen galakturonsyre enheter (se figur 3.9). I naturen er dette enzymet veldig viktig i fruktmodning og i bakterie og soppangrep. Ettersom dette enzymet ikke kan spalte



Figur 3.9: Skjematisk struktur av homogalakturonan og hvordan polygalakturonidase virker på denne kjeden.

nativt foretrede GalA ble alle estergruppene fjernet ved hjelp av basisk hydrolyse. Behandling av høymolekylær pektin med polygalakturonase gir vanligvis RGI (100.000 Da), RG-II (5000-10.000 Da) og oligosakkarider som kan separeres ved hjelp av gelfiltrering (metode 3.2.2). For å kunne kontrollere når reaksjonen er fullført, ble antall reduserende endegrupper detektert ved hjelp av dinitrosalisylsyre (se metode 3.5.3).

Reagenser

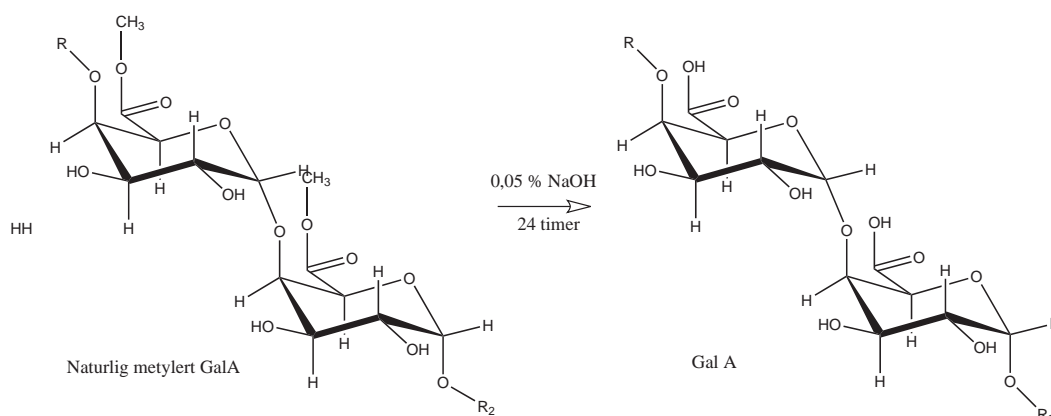
- NaOH.
- Destillert vann.
- CH_3COOH .
- Enzymer:
 - PG-ase 1, 8700 U/mg, 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 16 U/ml fra *A. Acnleatus*.
 - Endo-1,4 β -D-polygalakturonanase 5000 U/ml, 800 U/mg.
 - α -L-arabinofuranosidase (200 U/ml) og endo-polygalakturonanase (5000 U/ml).

Utstyr

- Magnetrører og magnet: Combimag (IKA WERK).
- Varmeskap: Functionline (Heraus instruments).
- Kjøleskap.

Prosedyre

A. Deesterifisering (figur 3.10):



Figur 3.10: Deesterifisering av naturlig metylert uronsyrer for å få et godt templat for polygalakturonidasen.

1. 0.3 g av GA1 tilsettes 30 ml 0.05 M NaOH (aq) til 10 mg/ml.
2. Prøven ble satt på magnetrører i kjøleskap natten over.
3. Nøytralisering av løsning skjer ved tilsetning av 1 M eddiksyre slik at man oppnår en 50 mM acetatbuffer med pH 5.0. Mengde eddiksyre som skal tilsettes kan beregnes etter følgende formel:

$$1M \cdot X ml = 0.05M \cdot Y ml$$

der X er antall ml eddiksyre og Y er antall ml NaOH (aq).

4. Dette ble repetert tre ganger av praktiske grunner og for å opparbeide nok stoff.

B. Enzymatisk degradering med endo-polygalakturonase:

1. Det ble tilsatt 25 μ l enzymløsning per 100 mg stoff, det vil si 75 μ l ved enzymatisk spalting av 300 mg.
2. Løsningen ble satt til røring i varmeskap ved 40°C.
3. Enzymaktiviteten ble målt med reduserende endebestemmelse (metode 3.5.3) med jevne mellomrom for å finne når fullstendig reaksjon var oppnådd (~ 26 timer).
4. Etter endt reaksjon, denatureres enzymene ved koking i 10 minutter. Avkjøles.
5. Prøven sentrifugeres ved 1000 rpm i 10 minutter for å fjerne utfelte proteiner.

6. Supernatanten ble applisert på Bio-Gel P30 og eluert med destillert vann (metode 3.2.2).

Metoden for de andre enzymene er lik den over, men ettersom det var mindre stoff tilgjengelig (henholdsvis 5 og 10 mg), var det ikke mulig å utføre DNS-testen (metode 3.5.3). Det ble også benyttet en mindre kolonne, PD-10 (metode 3.2.2). Ettersom denne kolonnen ble brukt til separasjon, og ikke desalting, ble det kun satt på maksimum 0.5 ml og 0.5 ml fraksjoner ble samlet opp.

3.5.3 Reduserende endebestemmelse

(Miller, 1959)

Når bindingene i et polysakkarid brytes, vil det bli dannet en reducerende endegruppe for hver binding som brytes. Den økende konsentrasjonen av reducerende ender ble bestemt med dinitrosalisylsyre. 3.5 dinitrosalisylsyre reduseres til 3 - amino-5-nitrosalisylsyre, mens aldehydgruppene i monosakkaridene blir redusert til karboksylsyrer. En fargeforandring skjer og absorbansen ble målt ved 540 nm. Det ble benyttet GalA som reducerende sukker, ettersom prøvene inneholder mye av dette monosakkaridet.

Reagenser

- DNS-løsning:
 - Destillert vann.
 - NaOH (AnalaR).
 - Kaliumnatriumtartat (Kebo).
 - Dinitrosalisylsyre (Sigma).DNS-løsning var ferdiglaget.
- Standard: D-galakturonsyre (Sigma).

Utstyr

- Fotospektrometer: Thermo Spectronic - modell Helios Epsilon (Thermo electron corp.).
- Glassrør som passer inn i fotospektrometeret.

Prosedyre

1. 3 mg D-galakturonsyre (Gal A) ble løst i 3 ml 50 mM acetatbuffer (pH 4.0) som gav en stamløsning med konsentrasjon 1 mg/ml.
2. For å lage en standardkurve ble det laget ulike konsentrasjoner, 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, 1.5 og 2.0 mg/ml ved fortynning av stamløsningen.
3. 0.5 ml av hver av fortynningene ble tilsatt 0.5 ml DNS-løsning og mikset.
4. Løsningen ble satt på kokende vannbad i 5 minutter.
5. 2.5 ml destillert vann ble tilsatt, og absorbansen ble målt ved 540 nm.
6. Standardkurven ble laget ved å plottet konsentrasjon (mg/ml) mot absorbans.
7. Prøvene ble behandlet på samme måten som standardene og konsentrasjon ble lest av standardkurven.

3.5.4 Karboksylsyre-reduksjon før metylering

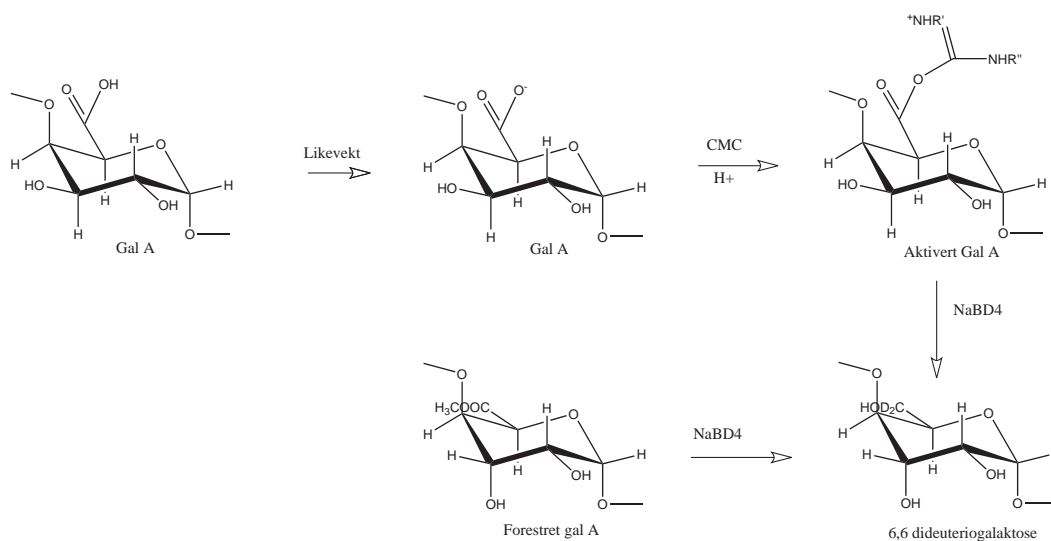
(Kim & Carpita, 1992)

Generelt prinsipp

Før metylering av uronsyreholdige polysakkarider kan skje, må karboksylsyregruppen reduseres om man ønsker å bestemme hvordan denne er bundet. Uronsyre kan ikke reduseres direkte av NaBD₄. For å kunne redusere disse, må uronsyrene metylforestres eller aktiveres av CMC for å danne 6.6 dideuterio uronsyre (se figur 3.11). Nativt forestrede uronsyrer reduseres direkte uten aktivering. De naturlig forestrede uronsyrene vil kunne skilles fra de nativt uforestrede monosakkaridene ved at noen primærfragmenter vil ha masse +2 ved bruk av GCMS. En grei regel er at dersom ekstraktet inneholder mer enn 5 % uronsyrer bør det utføres en reduksjon før metylering.

Spesielt prinsipp

Prøven ble de-esterifisert i forkant av enzymatisk degradering. For å finne ut om alle estergruppene ble fjernet under denne prosessen ble reduksjonsprosessen modifisert slik at det er mulig å skille glukose, glukuronsyre og nativt forestret glukuronsyre.

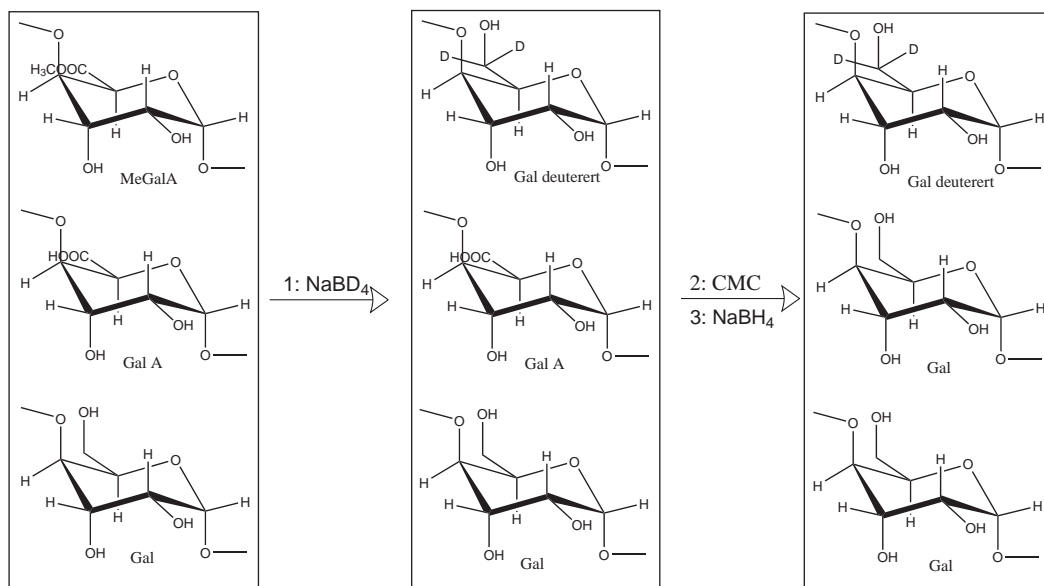


Figur 3.11: Aktivering og reduksjon av uronsyrer med CMC. Nativt forestret gal A kan reduseres direkte uten CMC.

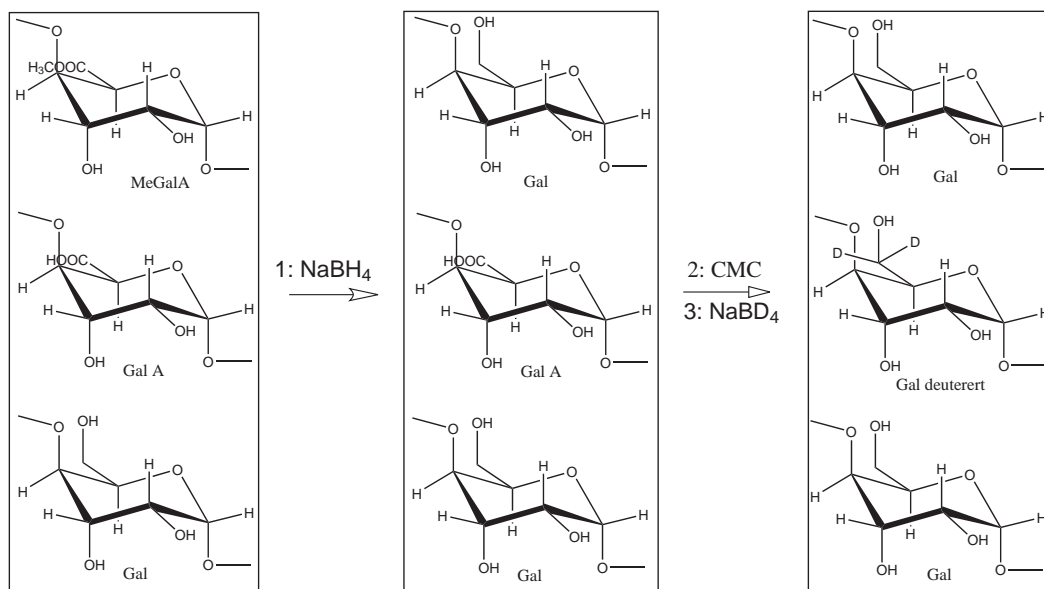
Hver prøve ble delt i to. Alle prøvene ble redusert to ganger før metyleringsprosessen, det vil si før og etter behandling med CMC. Ved å benytte henholdsvis NaBD₄ og NaBH₄ er det mulig å skille disse tre. I siste reduksjonstrinn, ringåpningstrinnet i metyleringsprosedyren, ble det kun benyttet NaBD₄. Figur 3.12 viser reaksjonsligning for prøve som ble behandlet med NaBD₄ i trinn 1 og NaBH₄ i trinn 2 og figur 3.13 viser reaksjonen for prøveuttak behandlet med NaBH₄ i trinn 1 og NaBD₄ i trinn 2. Etersom det er mulig å kvantifisere nativt esterifisert galakturonsyre i første reaksjon (NaBD₄ så NaBH₄), og galakturonsyre i reaksjon 2 (NaBH₄ så NaBD₄), er det mulig å regne ut hvor mye galaktose som finnes.

Reagenser

- 500 mM imidazole-HCl.
- NaBD₄ (Aldrich).
- NaBH₄(Aldrich).
- 0.2 M MES (2-[N-Morpholino] etan svovelsyre) (Sigma).
- Carbodiimide (Sigma).
- 2 M TRIZMA (Sigma).
- Oktanol.
- 0.05 M NaOH (AnalaR).



Figur 3.12: Reduksjon av galakturonsyre og nativt forestret galakturonsyre ved bruk av NaBD₄ i trinn 1 og NaBH₄ i trinn 2. Nativt forestret galakturonsyre vil da kunne skilles fra galaktose og galakturonsyre ved hjelp av GC/MS.



Figur 3.13: Reduksjon av galakturonsyre og nativt forestret galakturonsyre ved bruk av NaBH₄ i trinn 1 og NaBD₄ i trinn 2. Galakturonsyre vil da kunne skilles fra galaktose og nativt forestret galakturonsyre ved hjelp av GC/MS.

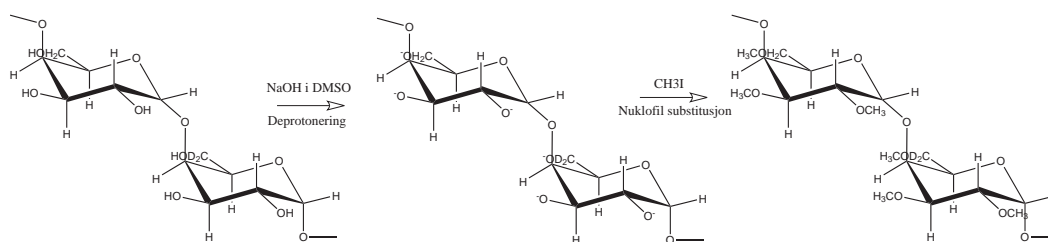
- Destillert vann.

Utstyr

- Rundkølbe 50 ml.
- Syrevaskede metyleringsrør med skrukork 15 ml.
- Minishaker - MS2 IKA.
- PD 10 Kolonner -(Amersham Bioscience).
- Frysetørker - Christ Alpha I-6.
- Transferpettor[®] (50-250 μ l) med spisser - (Brand).
- Is.
- pH-papir.

Prosedyre

- 1-1.5 mg prøve ble løst i 5 ml 500 mM iskald imidazole-HCl.
- Prøven ble redusert ved å tilsette 300 μ l nylaget 100 mg/ml NaBD₄/NaBH₄ i imidazole-HCl, mikset og satt til henstand på is i 5 min. Dette ble gjentatt. Til slutt ble 400 μ l tilsatt, mikset og satt til henstand i 30 min på is.
- Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (5 \times 100 μ l). Det ble kontrollert at pH var under 7.
- Lavmolekylære substanser ble fjernet ved hjelp av PD 10 Kolonner (metode 3.2.2). (Dialyseslanger med MWCO 1000 kan også brukes).
- Prøven ble frysetørket, men det er tidsbesparende å dampe inn til 1 ml.
- Prøven ble løst i 1 ml destillert vann, og tilsatt 200 μ l 0.2 M Mes og 400 μ l nylaget 500 mg/ml carbodiimide i destillert vann.
- Løsningen ble mikset godt og inkubert i 3 timer ved 25-30°C.
- 1 ml 2 M TRIZMA ble tilsatt og prøven avkjølt på is.
- 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBH₄/NaBD₄ i 0.05 M NaOH (aq) ble tilsatt og inkubert natten over ved 4 °C.
- Overskudd reduktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av iseddik (5 \times 100 μ l).



Figur 3.14: Metylering av hydroksylgrupper.

11. Lavmolekylære substanser ble fjernet ved hjelp av PD 10 Kolonner (dialyseslanger med MWCO 1000 kan også brukes).
12. Prøven ble overført fra rundkolben til lange rør med skrukork, og frysetørket i stående stilling (tar litt lengre tid pga lav overflate, men forenkler trinn 1 i metyleringsprosessen).

3.5.5 Metylering med etterfølgende hydrolyse, reduksjon og acetylering

(Ciucanu & Kerek, 1984; Inngjerdingen, 2000)

Prinsipp

Som nevnt tidligere i (metode 3.3.4) er det viktig å gjøre monosakkaridene hydrofobe og lett flyktige før applisering på GC/MS. Alle polare grupper må derfor substitueres med mer hydrofobe grupper. Polysakkaridets frie $-OH$ grupper, de som ikke inngår i noen glykosidbinding, blir først metylert for å kunne skille dem fra $-OH$ gruppene som deltar i glykosidbindinger (se figur 3.14). Williamsons etersyntese (McMurry, 1999) er sentral i metyleringsprosessen. Først behandles hydroksylgruppene i polysakkaridet med en kraftig base slik at det blir dannet et oksid-ion som vil angripe CH_3I (nukleofil substitusjonsreaksjon) og vi får metylert alle OH -gruppene som ikke deltar i en glykosidbinding.

Reagenser

- Vannfri metanol (nyåpnet flaske).
- Dimetylsulfoksid - DMSO.
- NaOH.
- Metyljodid.
- Natriumthiosulfat 5-hydrat.

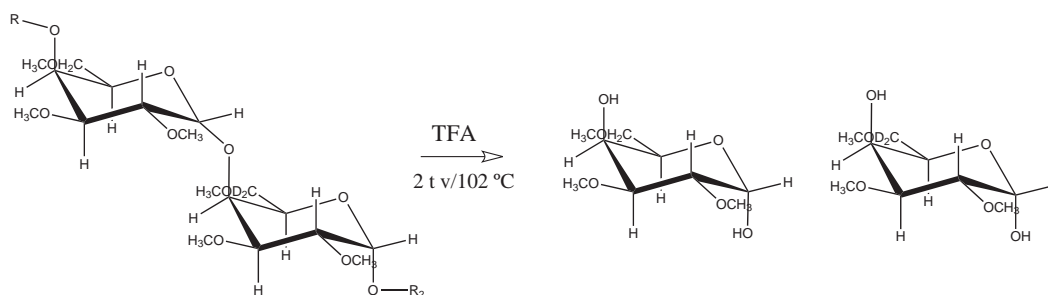
- Destillert vann.
- Kloroform.

Utstyr

- Glassrør med skrukork.
- N₂ - gassoppsett for inndamping med varmeelement : Reacti-Therm™ III Transferpettor® (50-100 µl) med spisser - (Brand).
- Rystemaskin - Vibrax VXR, (IKA labortechnik).
- Ar-gassoppsett.
- Agatmorter med pistill.
- Minishaker - MS2 (IKA labortechnik).
- Sentrifuge - Heraeus multifuge 4 KR.

Prosedyre

1. Lyofilisert prøve fra karboksylsyre ble dehydrert ved tilsats av 200 µl vannfri metanol som ble avblåst med N₂- gass.
2. 500 µl DMSO ble tilsatt og prøven ble satt på risting, 200 rpm i 20 min for å løse glykan.
3. De ble laget en suspensjon av tørre NaOH pellets knust i DMSO, 2 pellets per ml noe som gir en konsentrasjon på ca 120 mg/ml, ved hjelp av agatmorter og pistill.
4. 500 µl av suspensjonen ble tilsatt hver av prøvene.
5. Prøvene ble blåst med Argon og satt på rystemaskin i 30 min.
6. 100 µl CH₃I ble tilsatt i avtrekk og videre rystet på maskin i 10 min.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. 200 µl CH₃I ble tilsatt i avtrekk og videre rystet på maskin i 20 min.
9. 10 ml nylaget 100 mg/ml Na-thiosulfat i vann og 2 ml kloroform ble tilsatt.
10. Etter risting i mer en 40 sek på whirlimixer ble prøvene sentrifugert ved 1000 rpm, i 3 minutter for å separere fasene.
11. Vannfasen ble kastet.



Figur 3.15: Hydrolyse av metylerte polysakkarider med 2.5 M TFA.

12. Kloroformfasen ble vasket med 4×5 ml destillert vann, ristet og sentrifugert. Vannfasen og mellomsjiktet fjernes med en pasteurpipette. For å være sikker på å ikke få med noe av vannfasen overføres den upolare fasen til et nytt rør.
13. Kloroformfasen ble tørket under N_2 .

Hydrolyse

(Kim & Carpita, 1992)

Polysakkaridene hydrolyseres (acetalspalting) til delvis metylerte monosakkarider ved hjelp av trifluoreddiksyre (TFA) som vist på figur 3.15. Det anomere senteret (C1) reduseres til en primær alkohol. Denne og andre nydannede $-OH$ grupper blir i neste trinn acetylt.

Utstyr

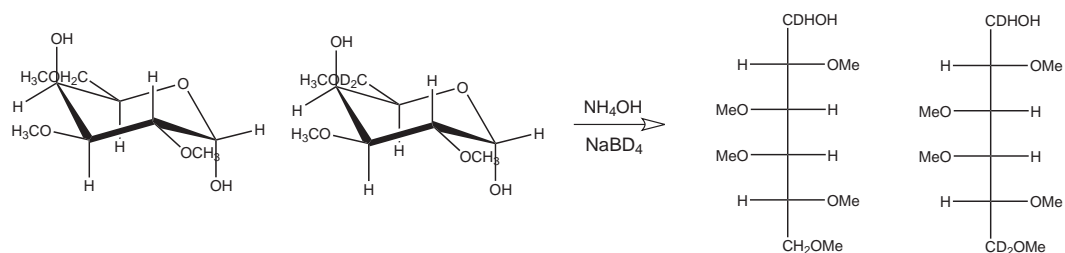
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments).

Reagenser

- 2.5 M Trikloreddiksyre (TFA).

Prosedyre

1. $500 \mu\text{l}$ 2.5 M TFA ble tilsatt metylert prøve og boblet gjennom med argon gass.
2. Prøven ble hydrolysert i 2 timer ved $102 \text{ }^\circ\text{C}$ i varmeskap.
3. Prøvene ble avkjølt og avdampet med N_2 (g).



Figur 3.16: Reduksjon av aldehydgruppen ved C1.

Reduksjon

(Kim & Carpita, 1992)

Ringstruktur i monosakkaridet brytes ved at det sykliske hemiacetalet ved C1 reduseres til alditol slik som vist på figur 3.16.

Reagenser

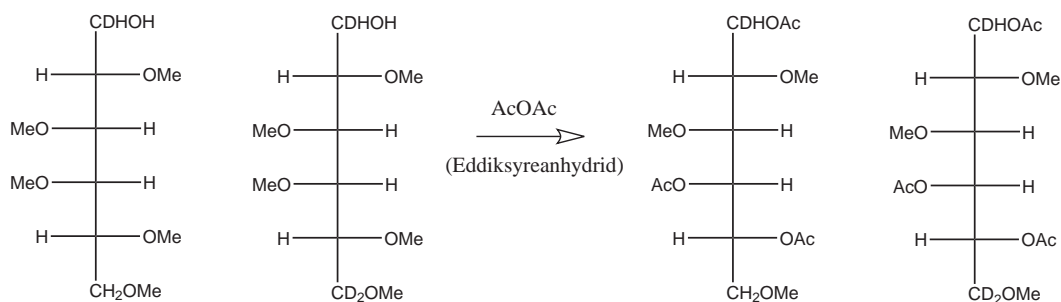
- 2 M NH₃.
- 1 M NaBD₄, nylaget.
- Iseddik.
- 5 % eddiksyre i destillert vann.
- Vannfri metanol.

Utstyr

- Ultralydbad - Branson 220.
- Varmeskap: Functionline (Heraus Instruments).

Prosedyre

1. De tørre prøvene ble tilsatt 500 μ l 2 M NH₃ og tilsatt 500 μ l NaBD₄ i 2 M NH₃.
2. Løsningen ble sonikert i 1 minutt før inkubering ved 60 °C i 1 time.
3. Overskudd reduktant ble ødelagt med 3 \times 50 μ l iseddik.
4. Prøven ble tørket med N₂ gass ved 50°C under N₂-gass. Det er svært viktig å fjerne all borsyren. Tørk skikkelig.



Figur 3.17: Acetylering av galakturonsyre derivatene før GC/MS.

5. 2.5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt og tørket på samme måte som i punkt 4.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2.5 ml metanol ble tilsatt og tørket på samme måte som i punkt 4.
8. Punkt 7 ble gjentatt.

Acetylering

(Kim & Carpita, 1992)

De frie hydroksylgruppene acetyleres for å få dem mer lipofile for å bli mer egnet for gas-skromatografisk separasjon (se figur 3.17). Acetylgruppen er en ganske stor gruppe som gir molekylet en stor egenvekt. Dette gir en bedret separasjon.

Reagenser

- 1-metylimidazole.
- Eddiksyreanhydrid.
- Diklormetan.
- Destillert vann.
- Vannfri metanol.

Utstyr

- Supelcorør med kork.

Prosedyre

1. 200 μl 1-metylimidazole ble tilsatt residuet fra reduksjonen, etterfulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Prøven ble mikset godt på whirlmikser og satt til henstand i 10 minutter.
3. Overskudd av eddiksyreanhydridet ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml destillert vann. Løsningene ble blandet godt og satt til henstand i 10 minutter.
4. De delvis metylerte, delvis acetylerede monosakkaridene ble så ekstrahert over i 2×1 ml diklormetan, mikset på whirlmikser i 30 sekunder og sentrifugert. Den nederste fasen ble samlet hver gang.
5. Ekstraktene ble samlet og tilbakevasket med 2×5 ml destillert vann.
6. Den upolare fasen ble overført til supelcorør og tørket med N_2 gass. Polare stoffer forenser GC-MS apparatet. Det er derfor svært viktig å unngå å få med seg vann ved overføring til supelcorør. Mellomsjiktet ble derfor fjernet før en ny pipette ble benyttet for å overføre diklormetanfasen.
7. Residuet ble løst i 50 μl vannfri metanol.
8. Prøven ble analysert ved GC-MS (metode 3.5.6).

3.5.6 GC/MS

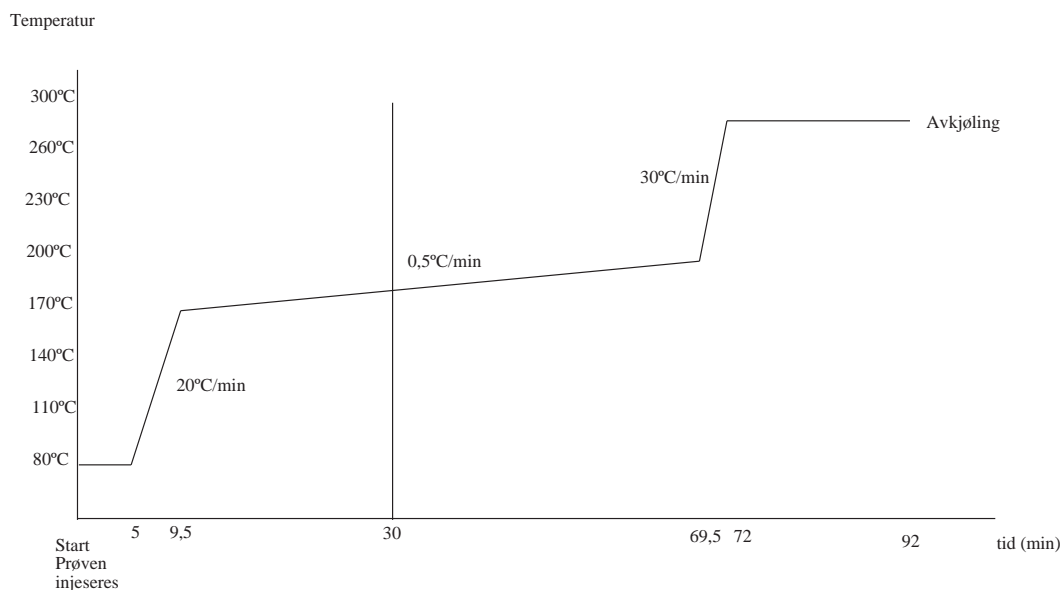
(Lundanes, 1998)

GC-MS analyse ble utført på Farmasøytisk institutt avdeling for farmasøytisk kjemi av Finn Tønnesen.

For å kunne tolke resultatene fra metode 3.5.5 må man ha et system som kan separere og detektere karbohydratenhetene. GC/MS er godt egnet fordi man først får god separasjon av monosakkaridene på GC-kolonnen før de detekteres ved hjelp av MS. Fraksjonsmønsteret for hvert monosakkarid er svært repeterbart dersom betingelsene holdes like.

Utstyr og betingelser

- GC-MS: Fisons GC 8065 (Fisons Instruments).
- Detektor: MD-800 (det ble tatt opp 70 eV spektra).



Figur 3.18: Temperaturprogram for GC/MS. Etter 30 minutter har de delvis metylerte, delvis acetylerede polysakkaridene kommet ut. Etter 69.5 minutter blir kolonnen vasket på 300°C.

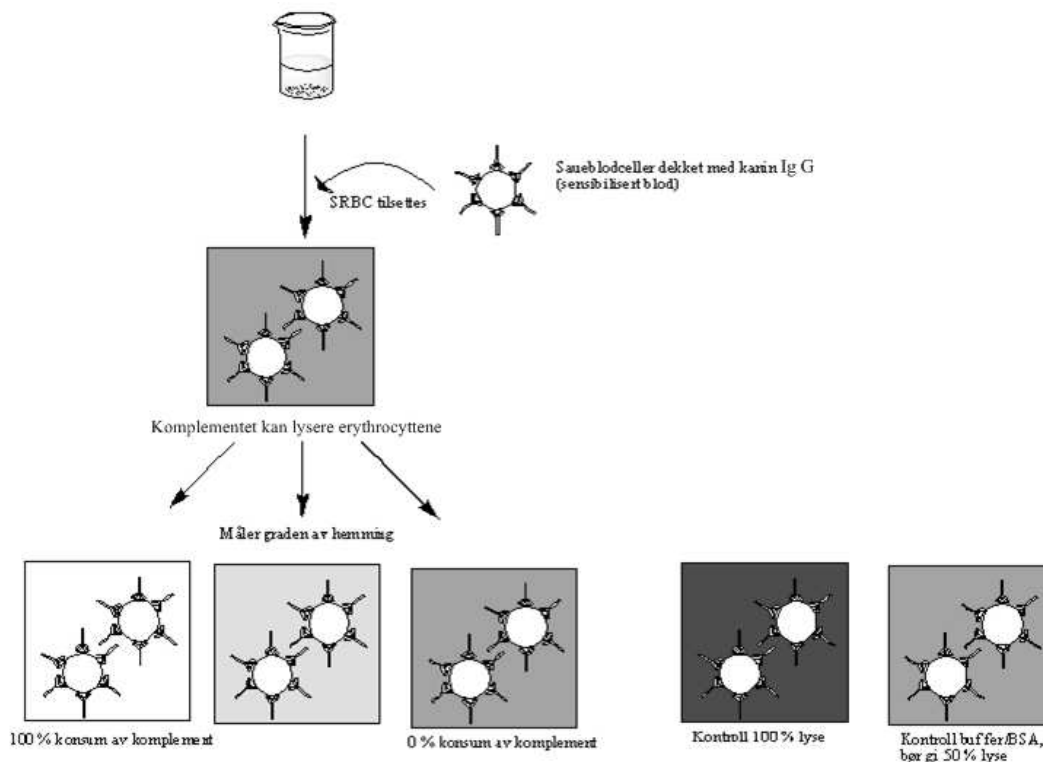
- Injektor: Splitt:splittless (Splittforhold: 1:10).
- GC kolonne: Factor four (silika). Lengde: 30 m, Filmtykkelse. 0.25 μm , Indre diameter: 0.25 mm
- Temperaturområde: 80-300°C.
- Injektortemperatur: 250°C.
- Temperaturprogram, se figur 3.18.

3.6 Biologisk aktivitet

3.6.1 Komplementfikseringstesten

(Michaelsen *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 1999)

Komplementsystemet er en god indikator for biologisk aktive stoffer som kan modulere det medfødte immunsystemet og dets videre påvirkning av det ervervede immunsystem. Denne testen kan derfor gi en indikasjon på om testsubstansen kan ha innvirkning på det humane immunsystem.



Figur 3.19: Prinsipielt oppsett av komplement-testen. Grad av farge til supernatanten symboliserer lysesgrad av blodceller, ettersom hem går i løsning når cellen ødelegges. Testen viser ikke forskjell i aktivering/hemming.

Prinsipp

Røde blodceller fra sau blir sensitivisert ved hjelp av antistoff mot disse cellene. Antistoffene kommer fra kanin. Når sauecellene er sensitivisert med antistoff, har komplementet en mulighet for å binde seg, med en etterfølgende kaskade som fører til perforering av cellemembranen. Først inkuberes komplementet med testsubstansen for at testsubstansen skal få tid til å modulere komplementet, enten ved å hemme eller aktivere det. De sensitiviserte blodcellene blir så tilsatt. Dersom mye komplement har blitt konsumert vil resultatet bli nedgang i hemolyse. Dersom det ikke har skjedd noe med komplementet vil man få lik hemolyse som i kontrollen med buffer/BSA (ca 50 %). Se figur 3.19 for skjematisk oppsett av testen.

Reagenser

- 0.9 % NaCl (aq).

- Destillert vann.
- Veronal buffer for CFT pH 7.2.
- BSA - bovint serum albumin - 30 %
- 10 % NaN₃ (aq)
- Saueblod: Hvit 131, 12.07.2007, Hvit 142, 17.02.2007.
- Humant komplement: ECG, 29.11.2005.
- Antistoff: Virion 9020 Amboceptor.
- Standard: *Plantago major* L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml.

Utstyr

- Sentrifuger: CP centrifuge (Beckmann) og GLC Sorvall (General laboratory centrifuge).
- Varmeskap med ristepate: Termaks, 37°C.
- Ristepate: Titertek[®] (Flow laboratories).
- Whirlmixer (Fisons).
- Mikroplateleser, Thermomax microplate reader (Molecular Devices).
- Mikroplater med rund og flat bunn samt dekkende tape (NUNCTM).
- Finnpiptetter[®] i forskjellige størrelser (10 µl - 5 ml).
- Plastpiptetter 3 ml - engangs.
- Reagensrør 5 ml og 10 ml med propper.

Prosedyre

A. Vasking av blodceller:

1. 250 ml veronalbuffer med 2 mg/ml BSA og 0.02 % NaN₃ lages ved å tilsette 1.67 ml BSA og 0.5 ml 10 % NaN₃ (aq) (finnes ferdiglaget på FHI) til 250 ml veronalbuffer (finnes ferdiglaget på FHI).
2. 400 µl blod (det behøves kun 60 µl per plate, men det er lurt å ta et godt overskudd) ble tatt ut med pipette uten å slemme opp blodet og overført til 10 ml reagensglass.
3. Blodet ble først vasket to ganger med 0.9 % NaCl (aq) og deretter en gang med veronal/BSA buffer. Glasset ble fylt halvfullt med vaskevæske. Mellom hver vask ble blandin-gen sentrifugert i 4 minutter, 3000 rpm. Vaskevannet ble pipettert av med plastpiptetter.

To-folds fortynningsrekke:		
Rør nr	kons. $\mu\text{g/ml}$	
1	500	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra stamløsning.
2	250	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra rør 1.
3	125	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra rør 2.
4	62.5	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra rør 3.
5	31.3	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra rør 4.
6	15.6	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra rør 5.

Tabell 3.1: Et enkelt oppsett av fortynningen for hvert rør ved to-folds fortynning.

B. Sensibilisering av blodceller:

1. 15 μl Virion 920 Amboceptor, 60 μl blodceller og 5.925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert i risteskapp ved 37°C i 30 min. Det er viktig å holde denne tiden akkurat for å få et reproducerbart resultat.
2. Blodet ble vasket to ganger med 0.9 % NaCl (aq) og en gang med veronal/BSA buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert i 4 minutter, 3000 rpm. Vaskevannet ble pipettert av med plastpipetter.
3. Vaskevannet ble fjernet. Ved å tilsette 5.940 ml veronal/BSA buffer fås en 1 % suspensjon av blodceller.

C. Fortynning av prøvene:

1. 1 mg prøvemateriale ble veid inn og løst i veronal/BSA buffer til en stamløsning med konsentrasjon 1 mg
2. Det ble benyttet både to-folds og fire-folds fortynningsrekke for standardene og alle prøvene (se tabell 3.1 og 3.2).

D. Titreringskurve for komplementkilden:

Nytt blod er vanskeligere å hemolysere enn gammelt, det trengs derfor mer komplement for å lysere nytt blod fremfor gammelt blod. Grunnen til dette er at cellemembranen blir svakere med alderen.

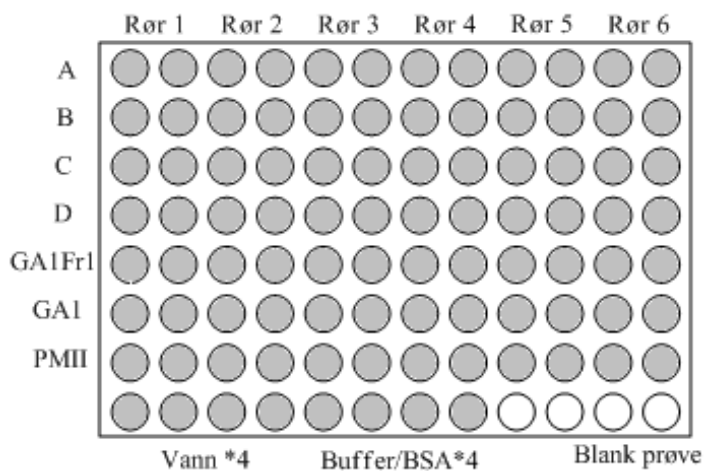
Fire-folds fortynningsrekke:		
Rør nr	kons. $\mu\text{g}/\text{ml}$	
1	0.5	300 μl veronal/BSA buffer + 300 μl fra stamløsning.
2	2	300 μl veronal/BSA buffer + 100 μl fra rør 1.
3	8	300 μl veronal/BSA buffer + 100 μl fra rør 2.
4	31	300 μl veronal/BSA buffer + 100 μl fra rør 3.
5	125	300 μl veronal/BSA buffer + 100 μl fra rør 4.
6	500	300 μl veronal/BSA buffer + 100 μl fra rør 5.

Tabell 3.2: Et enkelt oppsett av fortynningen for hvert rør ved fire-folds fortynning.

Fortynningsoppsett for komplementkilden:		
Komplement/buffer	Komplement (μl)	Veronal/BSA buffer (μl)
1 til 60	10	590
1 til 70	10	690
1 til 80	10	790
1 til 90	10	890
1 til 100	10	990
1 til 110	10	1090

Tabell 3.3: Fortynningsoppsett for komplementkilden.

1. Til hver mikroplate med 96 runde bunner ble det tilsatt 100 μl destillert vann til 4 av brønnene og 50 μl veronal/BSA buffer til 4×7 av brønnene, det vil si til totalt 28 brønner.
 2. Komplementet ble fortynnet med veronal/BSA-buffer som vist i tabell 3.3 og 50 μl av hver fortynning ble tilsatt til brønnene som alt var tilsatt veronal/BSA-buffer (4×7 brønner). Det blir da 4 paralleller fra hver fortynning.
1. Platen ble tildekket med plastfilm med lim, og inkubert under risting i 30 minutter ved 37°C.
 2. Det ble tilsatt 50 μl 1 % SRBC i alle brønnene og platen ble inkubert under risting i 30



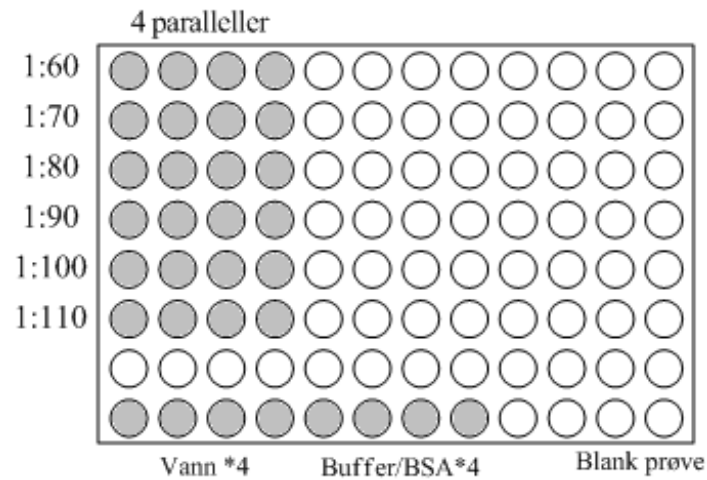
Figur 3.20: Slik ser platen ut etter tilsetning av blodcellene.

minutter ved 37°C.

3. Platen ble sentrifugert og 100 μ l fra hver brønn ble overført til en ny mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering, 2000 rpm i 4 minutter.
4. Absorbansen ble målt ved 405 nm, og dette ble korrelert til grad av hemolyse.

E. Testing av prøvematerialet

1. Det benyttes også her mikroplater med runde bunner. Til hver brønn tilsettes 50 μ l prøve. Det appliseres 2 paralleller for hver fortynning. Som 100 % lysekontroll benyttes 4 paralleller med 100 μ l destillert vann, og til kontrollen benyttes 4 paralleller med 50 μ l buffer/BSA. Se oppsettet på figur over. Komplementet ble tatt opp av fryseren og fortynnet i samsvar med titeringskurven for komplementet. (Fortynningen som gav 50 % lyseringsgrad).
2. 50 μ l av det fortynnede komplementet ble tilsatt til hver av brønnene utenom i 100 % lysekontroll brønnene.
3. Platen dekkes med bred, blank tape slik at ikke noe fordamper. Settes på risting ved 37°C i 30 minutter.
4. 50 μ l sensibiliserte blodceller (SRBC) ble tilsatt alle brønnene og inkubert videre ved risting i 30 minutter ved 37°C.



Figur 3.21: Ferdig utfylt mikrotiterplate med prøve, standard (PMII), kontroll og 100 % lysekontroll.

5. Platen sentrifugeres ved 2000 rpm i 4 minutter.
6. 100 μ l av supernatanten ble overført til en ny mikrotiterplate med flat bunn.
7. Platen ble sentrifugert ved 2000 rpm i 4 minutter for å fjerne luftbobler.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm, og dette ble korrelert til grad av hemolyse.

E. Beregning av lyseringsgrad

$$\text{Lyseringsgrad} = \frac{Abs_{kontroll}}{Abs_{vann}} \cdot 100\%.$$

Hemmingsgrad for prøvene blir da:

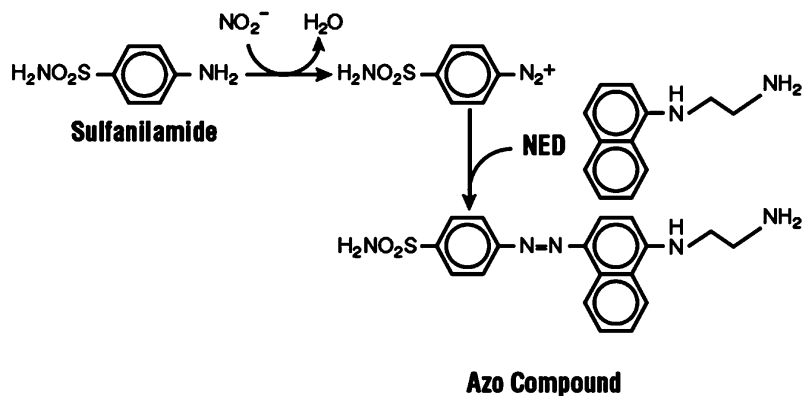
$$\text{Hemmingsgrad} = \frac{Abs_{kontroll} - Abs_{prøve}}{Abs_{kontroll}} \cdot 100\%.$$

3.6.2 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

(PromegaCorporation, 2005)

Denne testen ble utført av Marit Inngjerdningen på Rikshospitalet 2007.

Nitrogenoksid (NO) er en viktig fysiologisk budbringer og signaltransmitter i mange biologiske system, spesielt i immunologisk vev. Ved aktivering skiller makrofager ut NO.



Figur 3.22: Kjemiske reaksjoner involvert i måling av NO_2^- ved bruk av Griess reagens. Det blir dannet en farget forbindelse med absorbans maksimum 540 nm.

Prinsipp

NO brytes ned til to produkter. Et av disse er nitritt (NO_2^-) som er stabil og ikke flyktig. Denne forbindelsen er vist å være en god markør for makrofagaktivering. Griess- reagens system baserer seg på dannelsen av NO_2^- , som danner en farget azo-forbindelse ved reaksjon med sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin i surt miljø. Absorbansen ved 540 nm ble målt av den fargede løsningen. Den nedre deteksjonsgrensen er avhengig av hvilket medium man måler på.

Reagenser

- Dyrkingsmedium: RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin og 2 mM L L-glutamin, $5 \cdot 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol.
- Griess-reagens A: 1 % sulfanilamid.
- Griess-reagens B: N-(1-naptyl) etylendiamin (NED) 2.5 % fosforsyre.
- Cellelinje: R2-makrofager derivert fra rottemakrofager.
- Negativ kontroll LPS (lipopolysakkarid).
- Buffer til Coulter Counter Isoton buffer II.

Utstyr

- Celleteller: Coulter Counter.

- Sentrifuge: Rotana 460 R (Beckman).
- Celleinkubatorskap med CO₂ kontroll.
- Absorbansmåler: Titertek multiskan.
- Mikrotiterplater med flat bunn, V-bunn og U-bunn.

Prosedyre

En nitritt standardkurve må lages for hvert assay grunnet endringer i farge.

1. Makrofager ble høstet fra cellekultur. For å telle cellene ble 20 μ l celleduspensjon tilsatt 10 ml isoton buffer II. Cellene ble telt i en coulter counter.
2. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm/8 min.
3. Cellene ble resuspendert til 10⁶ celler/ml i dyrkingsmedium.
4. 50 μ l celler ble tilsatt hver brønn.
5. Det ble laget en fortynningsrekke med 100 μ g/ml, 10 μ g/ml og 1 μ g/ml av prøvene.
6. 5 μ l prøve ble tilsatt til hver brønn. For hver fortykning ble det laget 2 paralleller. Som positiv kontroll ble 2 paralleller med 500 ng/ml LPS benyttet og som negativ kontroll ble rent medium benyttet.
7. 45 μ l dyrkingsmedium ble tilsatt hver brønn, slik at totalvolumet ble 100 μ l/brønn.
8. Cellene ble inkubert over natt ved 37°C i en celleinkubator med 4 % CO₂.
9. Supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate.
10. Platen ble sentrifugert for å fjerne celler.
11. 50 μ l av supernatanten ble overført til en ny U-bunnet mikrotiterplate.
12. For å lage en standardkurve ble det laget en rekke fortyninger av NaNO₃ (100, 50, 25, 12, 6, 3 og 0 μ M).
13. Disse ble behandlet videre likt som prøvene.
14. Det ble tilsatt 50 μ l Griess reagens A.
15. Platen ble satt mørkt i 10 minutter.
16. Det ble tilsatt 50 μ l Griess reagens B.

17. Absorbansen ble målt ved 540 nm.

3.6.3 Akutt toksisitetstesting *in vivo* av mus

(Joshi *et al.*, 2007)

Denne testen ble utført av Dr. Ababacar Maiga ved DMT, Bamako, Mali.

Når aktive prinsipper isoleres fra plantematerialer endrer toksisitetsprofilen ofte seg. Det er derfor av interesse å finne ut om rensede materialer gir økt fare for akutt toksisitet. For å kunne teste dette *in vivo* ble det benyttet 16 mus, 8 av hvert kjønn. Hunn-musene ble tilfeldig fordelt på to grupper, en kontrollgruppe og en testgruppe. Det samme ble gjort for hann-musene. Polysakkaridmateriale ble oralt administrert i en dose på 200 mg/kg kroppsvekt til musene i testgruppen, en gang daglig i 21 dager. Dette tilsvarer en dose på over 10 g/dag for et voksent menneske, noe som er en veldig høy dosering. Musene ble undersøkt hver dag, hvor mat- og vanninntak samt kroppsmasse ble registrert. På dag 22 ble musene avlivet. Det ble tatt blodprøver for å sjekke hepatisk funksjon (serum glutamate oxalo acetate transaminase (SGOT), serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT) og serum alkaline fosfatase (ALP) og renal funksjon (serum kreatinine og serum urea). Vekt av organer (lever, milt, hjerte og lever) ble også testet for å sjekke unormal vekst.

Kapittel 4

Resultater og diskusjon

4.1 Oversikt over utført arbeid

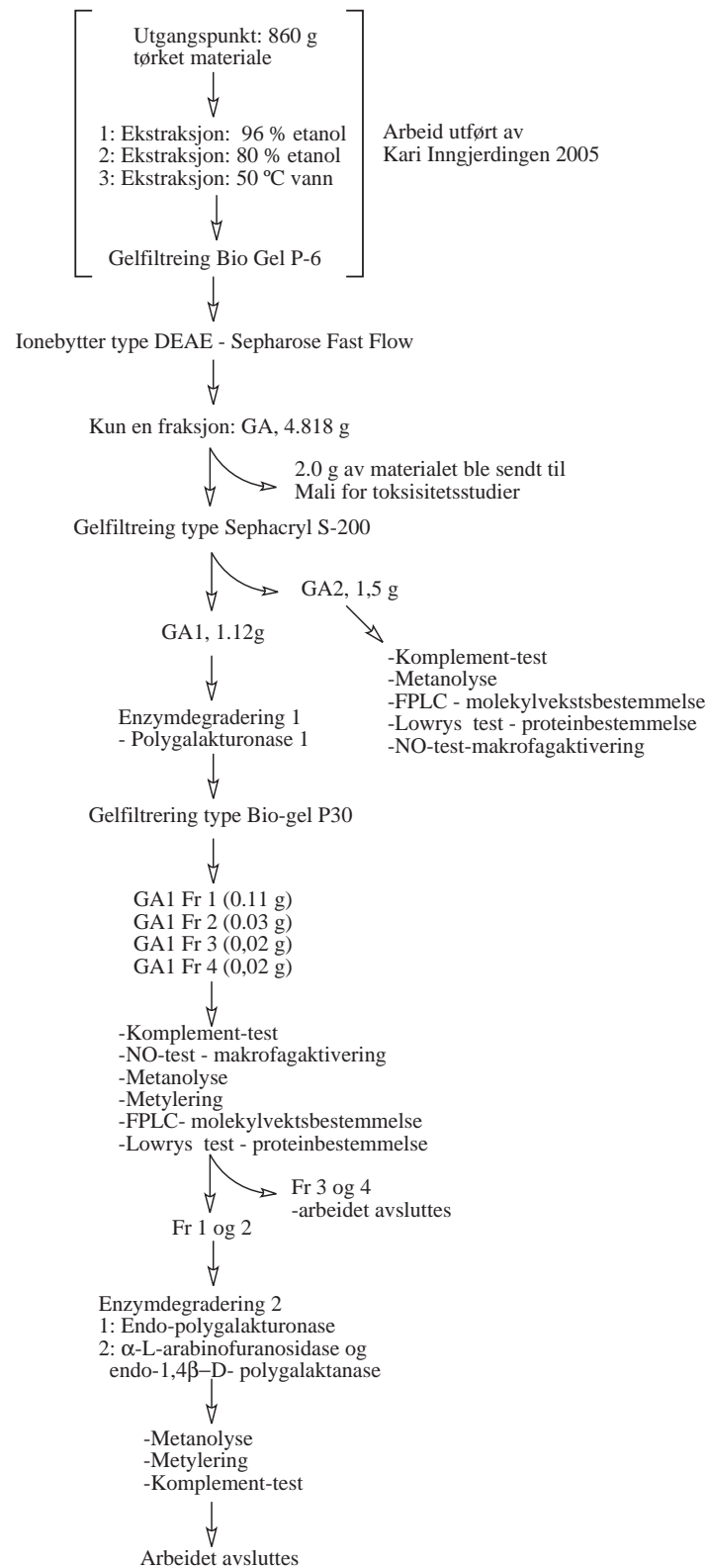
En illustrasjon av utført arbeid er vist på figur 4.1.

4.2 Sammenligningsgrunnlag

Alle resultatene sammenlignes med tidligere utført arbeid. Hovedsakelig er dette arbeidet utført av Kari Inngjerdingen i perioden 2000–2007 ved Universitetet i Oslo. Isolasjon samt karbohydratanalyser av pektinmaterialet i denne oppgaven er utført etter en lignende fremgangsmåte som tidligere arbeid. Det er da lettere å sammenligne data.

4.3 Isolering av polysakkarider

Denne oppgaven er basert på 860 g plantemateriale av *Glinus oppositifolius* høstet i 1998 i Gourma, sørvest for Timbuktu av Prof. Drissa Diallo, Universitetet i Bamako, Mali. Plantematerialet bestod av den overjordiske delen av planten. Plantematerialet ble deretter bearbeidet av Kari Inngjerdingen, juni 2005, hvor materialet ble først ekstrahert med 96 % EtOH og så videre med 80 % EtOH. Etter ekstraksjon med etanol var det 537.7 g igjen av plantematerialet som ble ekstrahert med vann, 50°C. Det vandige ekstraktet ble rensert på en gelfiltreringskolonne type Bio Gel P-6 og eluert med 10 mM NaCl (aq). Det ble kun en markert topp, som ble samlet opp i en fraksjon. Denne fraksjonen ble satt i fryseboksen frem til november 2006.



Figur 4.1: Enkel oversikt over utført arbeid.

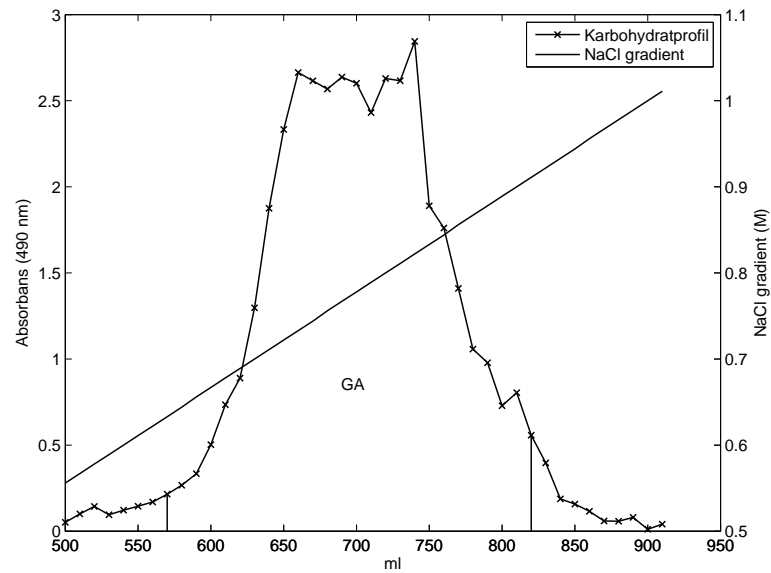
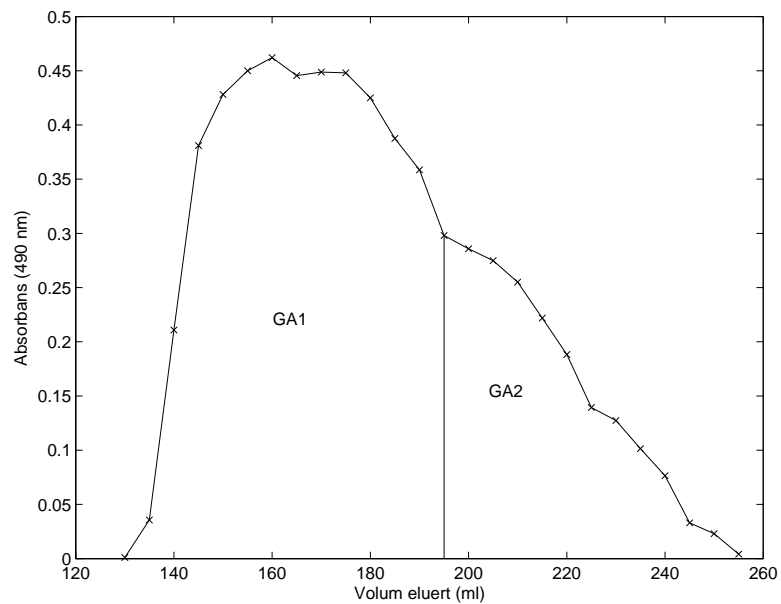
4.3.1 Separasjon på grunnlag av ionestyrke

På bakgrunn av hva som er gjort tidligere ble det bestemt å bruke en preparativ ionebytterkolonne av type DEAE Sepharose Fast Flow. Dette muliggjør god separasjon av de nøytrale og sure karbohydratene. Etter dialyse, inndamping og sentrifugering ble 300 ml, tilsvarende omtrent 1.3 g polysakkarid, applisert på kolonnen. Tidligere arbeid har vist at den nøytrale fraksjonen har lav biologisk aktivitet. Den nøytrale fraksjonene ble derfor kastet, mens den sure ble tatt vare på. Karbohydratprofilen er gjengitt i figur 4.2. Karbohydratprofilen gav ikke grunnlag for å kunne separere karbohydratene ytterligere. Fraksjonene mellom 570–820 ml ble samlet, dialysert, oppkonsentrert og lyofilisert.

Inngjerdingen *et al.* (2005b) fikk en tydelig skulder etter 600 ml (GOA1) og så en klar topp ved 1000 ml (GOA2) samt en liten hale. Plantematerialet brukt her kom fra Dirè. Etter samtale med Inngjerdingen (privat kommunikasjon) kom det fram at materialet fra Lac Horo, Gourma gav mindre av GOA1, det vil si profilen ble mer lik den oppnådd i figur 4.2 (Inngjerdingen *et al.*, 2007). Grunner for de ulike resultatene mellom de to batchene av plantemateriale er mest sannsynlig av fytokjemisk opphav, hvor forskjellene kan ha oppstått på grunn av forskjell i oppvekstvilkår, innhøstingstid, innhøstingsmetode, tørkeprosess, oppbevaring, isolasjonsprosess med mer. Det er for eksempel viktig å kontrollere tørkebetingelser, ettersom planten ofte inneholder enzymer som vil i kontakt med pektinene i planten kunne spalte dem og gi endringer i pektininnholdet. Aggregatdannelse mellom pektinene kan også gi en forklaring på dette, men i miljøer med høy ionestyrke er dette lite trolig.

4.3.2 Gelfiltrering på Sephacryl S–200 kolonne

Det ble bestemt å separere pektinene videre på grunnlag av molekylvektbestemmelse utført tidligere av Inngjerdingen *et al.* (2005a). GOA1 ble bestemt til 70 kDa og GOA2 til 30–39 kDa. Dersom polysakkaridmaterialet isolert i denne oppgaven er like GOA1 og GOA2, burde det vært mulighet å separere polysakkaridmaterialet GA ytterligere på en gelfiltreringskolonne av typen Sephacryl S–200, som separerer forbindelser i området 1000 – 80.000 Da. Som elueringsprofilen viser i figur 4.3, stiger kurven brått etter 130 ml. Det kan tyde på at polysakkaridene kommer ut med void, noe som vil si at forbindelsene har en for stor molekylvekt for å kunne bli separert. Kurven viser med sin brede topp at materialet er tydelig polydispers og halen i figuren indikerer tilstedeværelse av polysakkarider med en lavere molekylvekt.

Figur 4.2: Elueringsprofil av sure polysakkarider fra *G. oppositifolius*.

Figur 4.3: Gjennomsnittlig elueringsprofil av 12 prøver kjørt på Sephacryl S-200 kolonne.

I en seinere molekylvektsbestemmelse, se tabell 4.6, ble molekylvekten til GA1 og GA2 bestemt til å ligge mellom 16.000 Da – 500.000 Da. Kolonnevalget var derfor ikke optimalt. Selv om kolonnen ikke gav en god separasjon ble pektinmaterialet separert i to ulike fraksjoner, GA1 og GA2. Fraksjonene mellom 135 – 195 ml fikk navnet GA1 (1.12 g), mens fraksjonene mellom 200 – 240 ml fikk navnet GA2 (> 1.2 g). Arealet under kurven for GA2 er mindre enn for GA1, men mengde pektin var likevel større. En mulig grunn til dette kan være at de forskjellige monosakkaridene gir forskjellig absorpsjon ved 490 nm (Brummer & Cui, 2005). Man kan derfor ikke direkte sammenligne absorpsjon med mengde polysakkarid.

4.4 Kvantitativ bestemmelse av mengde polysakkarider

4.4.1 Metanolyse

Monosakkaridsammensetningen for de isolerte pektinene ble bestemt ved hjelp av metanolyse, etterfulgt av TMS-derivatisering og gaskromatografisk (GC) analyse. Figur 4.4 viser et eksempel på et kromatogram. For å kunne beregne total mengde polysakkarid i metanolyseprøven tilsettes en internstandard i en kjent konsentrasjon og mengde. Man går så ut fra denne brytes ned i lik grad som resten av prøven. Her benyttes mannitol som intern standard ettersom den ikke finnes naturlig i polysakkarider. Usikkerhet i veiing av polysakkaridmaterialet påvirker til en viss grad den beregnede verdien av total mengde sukker i prøven.

Problemer med utførelse av metanolyse I polysakkaridmaterialet fra *G. oppositifolius* er det mye uronsyrer (over 80 %). Dersom metanolysen utføres med 4 M HCl i vannfri metanol, som er normale betingelser, blir resultatet for total mengde polysakkarid i prøven svært lavt, ofte rundt 30–40 %. Grunnen til dette, er mest sannsynlig at syreløsningen er for svake for å metanolysere bindingene mellom uronsyrene fullstendig. Analysen ble derfor prøvd utført med en sterkere syreløsning, 6 M HCl. Ettersom det ikke var tilgjengelig standardkurver basert på 6 M HCl, ble 4 M standardkurvene benyttet. I så sure omgivelser er de nøytrale karbohydra- tene, inkludert mannitol mer labile enn i 4 M. Mannitol, som er den interne standarden, vil da muligens brytes ned i større grad enn uronsyrene, og bruk av 4 M standardkurver vil gi en betydelig feilkilde og kunne føre til et ureelt høyt polysakkaridinnhold i prøvene på godt over 100 %. For alle prøvene behandlet med 6 M HCl ble det beregnede totalinnholdet 150–200 %

polysakkarid. I en 6 M HCl vil også innholdet av de nøytrale polysakkaridene vil kunne bli lavere enn de i realiteten er, grunnet dekomponering (Chambers & Clamp, 1971). En måte å unngå dette problemet kunne vært og laget standardkurver for alle monosakkaridene i 6 M HCl i metanol. Total mengde polysakkarid ville da mest sannsynlig ha blitt riktig, men usikkerheten i målingene for små mengder nøytrale polysakkarider ville antageligvis blitt relativt høy, ettersom degraderingen vil være svært stor for mange av monosakkaridene. Eksempelvis kan det nevnes at etter metanolyse i 6 M HCl, 100°, i 24 timer er det kun 16 % Xyl igjen av opprinnelig mengde (Chambers & Clamp, 1971).

Et annet problem som oppstår på grunn av stor mengdeforskjell av de respektive monosakkaridene, er at det er vanskelig å tilsette en mengde intern standard som gir et relativt arealforhold som er innenfor det lineære området i standardkurvene for alle monosakkaridtypene. I dette tilfellet blir det relative arealet for stort for uronsyren, men for lite for de nøytrale karbohydratene. Mengdeforholdet mellom monosakkaridene påvirkes ikke av den interne standarden, men den interne standarden benyttes til å beregne den totale mengden polysakkarid som er i prøven. Det er viktig å merke seg at den interne standarden som oftest blir lagret i 1 M HCl i metanol. Dersom man ikke er påpasselig når det gjelder valg av flaske til oppbevaring, vil syren kunne etse seg gjennom korken slik at metanolen fordamper. Et direkte resultat av dette er at den indre standarden oppkonsentreres, som igjen vil gi gale resultater.

Løsningen på problemet som ble valgt var å kjøre to paralleller av hver prøve, en med 4 M HCl og en med 6 M HCl i metanol. Det ble så beregnet en verdi for alle monosakkaridene basert på begge parallellene. Verdiene for intern standard ble sett bort fra, ettersom verdiene blir feil for 6 M HCl på grunn av bruk av feil standardkurve, og for 4 M ettersom verdiene også her blir feil grunnet for svake degraderingsbetingelser.

Som man kan se ut fra tabell 4.1 er det ingen signifikant forskjell i monosakkaridsammensetning mellom GA, GA1 og GA2, noe som kan tilsi en dårlig separasjon, men det viser seg i seinere tester at GA1 gir en høyere biologisk aktivitet enn GA og GA2. De to fraksjonene Inngjerdingen *et al.* (2005b) fikk etter separasjon på ionebytter, GOA1 og GOA2, er ganske ulike i monosakkaridsammensetning. Spesielt kan man se at uronsyreinnholdet er mye høyere i GOA2 enn i GOA1. Det kan virke som, ut fra monosakkaridanalysen, at GOA2 er lik i monosakkaridsammensetning som GA, GA1 og GA2.

Monosakkarid:	GA (%)	GA1 (%)	GA2 (%)	GOA1 (%)	GOA2 (%)
Arabinose (Ara)	4.5	3.7	3.5	26.4	5.5
Rhamnose (Rham)	8.2	6.5	6.2	4.2	10.3
Fucose (Fuc)	1.0	0.5	0.6		1.3
Xylose (Xyl)	spor	spor	spor	3.9	0.5
Galaktose (Gal)	2.8	4.2	4.0	42.9	9.7
Glukose (Glc)	4.2	3.4	3.7	3.5	3.3
Galakturonsyre (GalA)	79.4	81.8	82.0	12.1	68.3

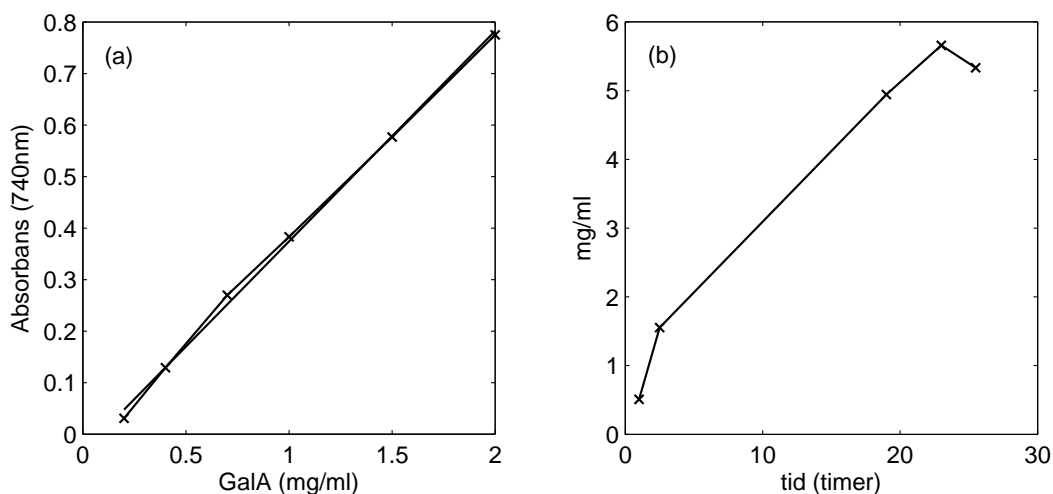
Tabell 4.1: Korrigert karbohydratsammensetning av ekstraktene GA, GA1 og GA2 etter ionebytter og Sephacryl S–200 kolonne. Resultatene fra GOA1 og GOA2 etter ionebytter er også tatt med (Inngjerdingen *et al.*, 2005a).

4.5 Strukturoppklaring

4.5.1 Enzymatisk degradering av GA1 med polygalakturonase

Pektiner er store molekyler, og for å kunne få mer informasjon om struktur og aktivitetsforhold må man degradere pektinet enzymatisk. Man kan da isolere de forgrenede områdene, for så å bestemme bindingstypen mellom de respektive monosakkaridene. Degradering av pektiner med endo-polygalakturonase kan gi RG-I (100 kDa), RG-II (5–10 kDa) og oligosakkarider bestående av 1–5 polysakkarideneheter (O’Neill & York, 2003). Før man kan behandle pektinet med en polygalakturonase, må imidlertid pektinet de-esterifiseres, ellers vil ikke pektinasen fungere optimalt. Etter enzymatisk degradering, kan de forgreinede regionene separeres fra de lavmolekylære oligosakkaridene ved hjelp av gelfiltrering.

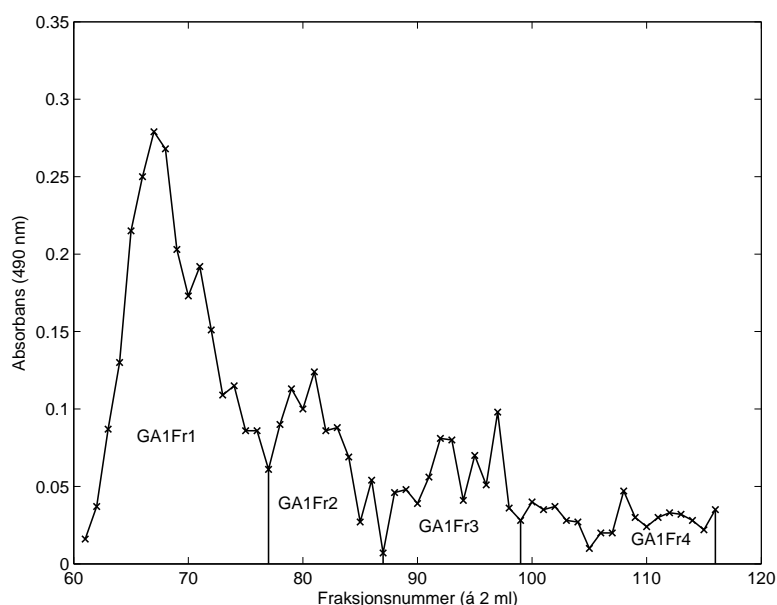
Enzymatisk degradering med polygalakturonase ble utført på 300 mg polysakkaridmateriale av GA1. Dette ble gjentatt tre ganger. Det ble tilsatt 25 μl enzym per 100 mg polysakkaridmateriale. Polygalakturonase 1, som ble benyttet i dette tilfellet inneholdt 16 U/ml. Det ble benyttet 75 μl enzymløsning som tilsvarer 1.2 U. 1 U enzym skal teoretisk sett kunne frigjøre $1.0 \cdot 10^{-6}$ mol GalA fra 1,4-bundet GalA per minutt. GalA har molekylvekt 180 g/mol og det vil da bli frigjort 0.18 mg GalA per minutt. Grunnet romlig struktur og maskering av grupper er det ofte nødvendig med et høyt overskudd enzym for å sikre at alt materialet blir



Figur 4.5: (a) Standardkurve med kjente konsentrasjoner av GalA som funksjon av absorbans. (b) Mengde reducerende endegrupper som funksjon av tid under enzymatisk degradering av GA1.

pektinaseresistent. Med pektinaseresistens menes at materialet ikke kan degraderes ytterligere av polygalakturonase. Mengde enzym tilsatt i dette tilfellet var for lavt. Enzymet må tilsettes i et stort overskudd ettersom de slites ut og fungerer deretter ikke optimalt.

For å kunne følge den enzymatiske degraderingen, for å kunne si noe om tidspunkt for pektinaseresistens ble det flere ganger under degraderingen testet for reducerende endegrupper. Dette ble gjort ved hjelp av en fargeforandring i DNS-løsning, se metode 3.5.3. Etter 26 timer stoppet nydannelsen av reducerende endegrupper opp (se figur 4.5a). Ut fra figuren kan man se at det har blitt dannet en mengde reducerende grupper tilsvarende ca 5 mg/ml GalA. I etterkant ble det funnet at dette kanskje ikke var tilfelle ettersom uronsyreinnholdet fortsatt var meget høyt for fraksjonene oppnådd etter separasjon. Etter endt degradering ble løsningen kokt i 10 minutter før sentrifugering. Det dannet seg da en gel i bunnen av røret etter sentrifugering. I følge metanolyseresultatene viste det seg at gelen hovedsakelig bestod av GalA, se tabell 4.2. Inngjerdingen (2000) viste at gelen dannet etter degradering med pektinase gav ingen antikomplementær effekt. Før det degraderte materialet ble applisert på en gelfiltreringskolonne av type Bio-Gel P 30, ble løsningen oppkonsentrert. Kolonnen ble eluert med destillert vann. Bio-Gel P30 separerer makromolekyler i molekylvektsområdet 2500 – 40 000 Da. Resultatet ble fire forskjellige fraksjoner som fikk navnene GA1Fr1, GA1Fr2,



Figur 4.6: Et eksempel på elueringsprofil etter enzymatisk degradering av GA1 på Bio-gel P 30. Materialet deles opp i fire fraksjoner, GA1Fr1-4.

GA1Fr3 og GA1Fr4. Elueringsprofilen er gjengitt i figur 4.6 og monosakkaridsammensetningen er gjengitt i tabell 4.2. Det er mulig at det fortsatt finnes en del igjen av utgangsmaterialet i GA1Fr1, men mest sannsynlig består denne fraksjonen av delvis degradert GA1 ettersom GA1Fr1 inneholder 12 % Gal mens GA1 kun inneholder 4.2 % Gal. Hos Inngjerdingen *et al.* (2007) gav GOA2 etter behandling med pektinase et lignende separasjonsmønster, men hvor GOA2-IV, som består av oligomere av GalA, kom ut helt til slutt (etter 400 ml). Denne fraksjonen er ikke å finne for GA1, selv om DNS-testen viste økende grad av reduserende endegrupper, se figur 4.5. Det er mulig at det ikke har blitt dannet så mange oligomere i samme størrelse som hos Inngjerdingen ettersom det var et underskudd av enzym. At det var et underskudd av enzym er tydelig for fraksjon GA1Fr1 som inneholder fremdeles hele 73 % GalA noe som er unormalt høyt for pektinaseresistent materiale.

4.5.2 Bestemmelse av bindingstype mellom monosakkaridene i GA1Fr1-4

Å bestemme hvilke bindinger som knytter monosakkaridene sammen er viktig for å kunne si noe om hvilke strukturer som er tilstede i pektinet. For å kunne få informasjon om dette må pektinene reduseres, metyleres, hydrolyseres og acetyleres for siden å kunne appliseres på

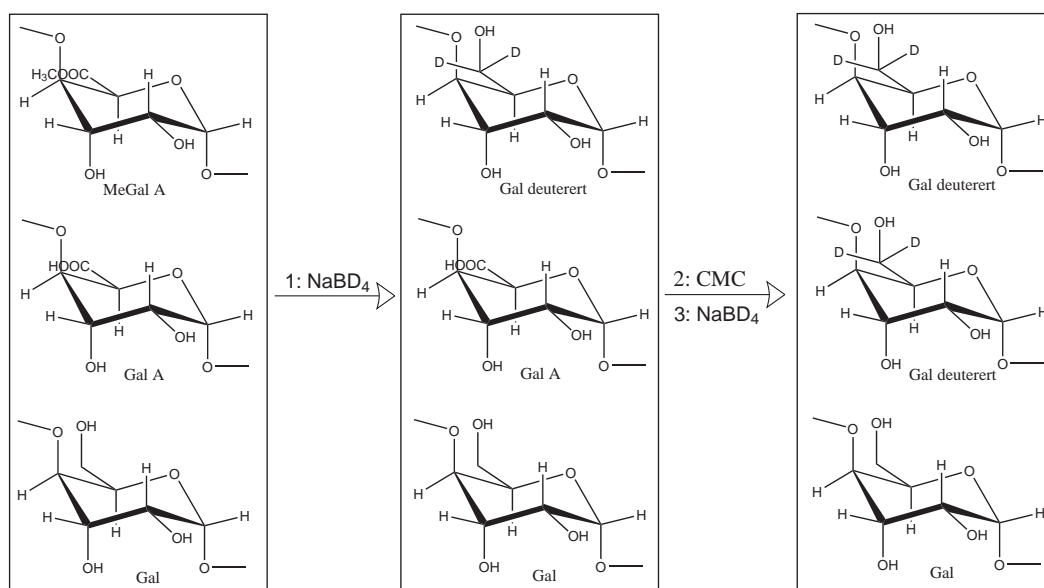
Monosakkarid:	GA1Fr1	GA1Fr2	GA1Fr3	GA1Fr4	Gel
Arabinose (Ara)	3.9	7.8	9.2	7.6	1.1
Rhamnose (Rham)	7.6	16.2	20.2	17.3	2.0
Fucose (Fuc)	n.d	n.d	1.4	1.6	n.d
Xylose (Xyl)	n.d	n.d	spor	spor	spor
Galaktose (Gal)	12.7	18.3	17.6	13.3	5.1
Glukose (Glc)	2.7	1.9	1.8	2.2	3.8
Galakturonsyre (GalA)	73.1	55.8	49.8	58.0	88.0

Tabell 4.2: Monosakkaridsammensetningen til GA1Fr1–4 samt gel som ble dannet ved degrading med pektinase.

GC/MS, se metode 3.5.5. For å kunne beregne mengden av et monosakkarid med en gitt bindingstype, ble arealet under hver topp i kromatogrammet etter GC/MS integrert numerisk. Hver bindingstype for et gitt monosakkarid gav opphav til en topp. Verdiene ble korrigert for ved hjelp av metanolyseresultater. Det foreligger dessverre ikke standardkurver for alle bindingstypene. Det forutsettes derfor at alle bindinger gir lik respons i MS-detektoren, noe som sannsynligvis ikke er riktig. Ved hjelp av massespekter og retensjonstid ble de delvis metylerte og delvis acetylte alditolacetalene identifisert. Beregning av mengdeforholdene har en viss usikkerhet siden ikke alle toppene blir integrert optimalt, samt at metanolyseresultatene kan avvike fra det som er reelt. Ved postulering av struktur av polysakkarider kan man bare anta strukturtrekk. Det er nærmest umulig å si noe eksakt når det gjelder struktur.

Kvantifisering av GalA, Gal og naturlig forestret GalA (MeGalA)

GalA, Gal og naturlig forestret GalA (MeGalA) reduseres på en slik måte at de kommer samtidig til MS-detektoren. Massespekteret ville også vært likt dersom GalA og MeGalA hadde blitt redusert med NaBH_4 . Dersom en reduserer med NaBD_4 , noe som vanligvis utføres, kan Gal skilles fra GalA og MeGalA (som ikke kan skilles), ved å se på forholdet i massespekteret mellom 233 og 235 m/z. For å sjekke om de-esterifiseringen med 0.05 % NaOH (aq) har fungert optimalt er det i dette tilfellet av interesse å også kvantifisere MeGalA. Dersom ikke alle

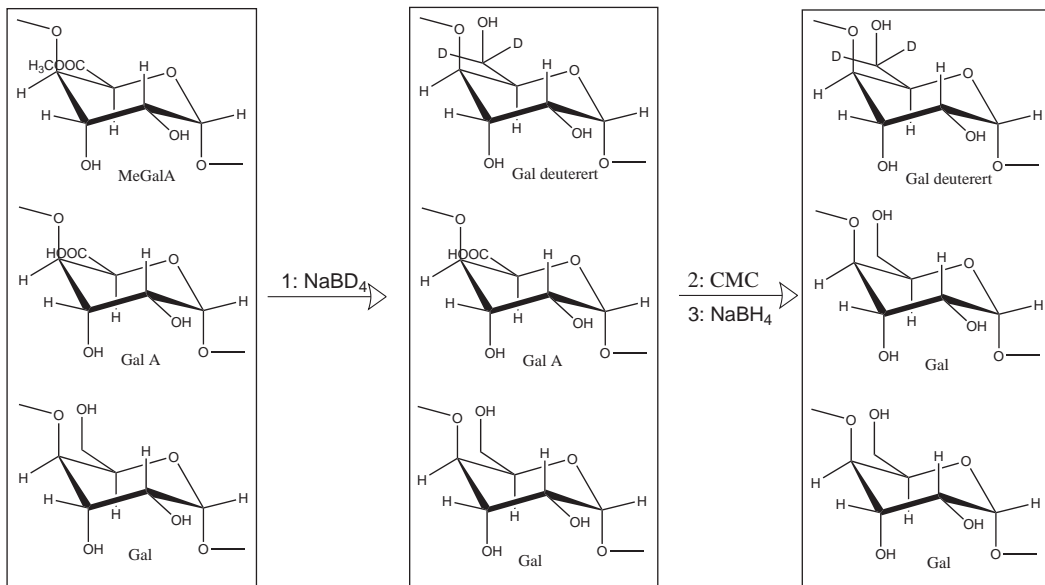


Figur 4.7: **Uttak nummer 1:** Ved å redusere polysakkaridene kun med deuterium vil man kunne skille galaktose fra naturlig forestret GalA.

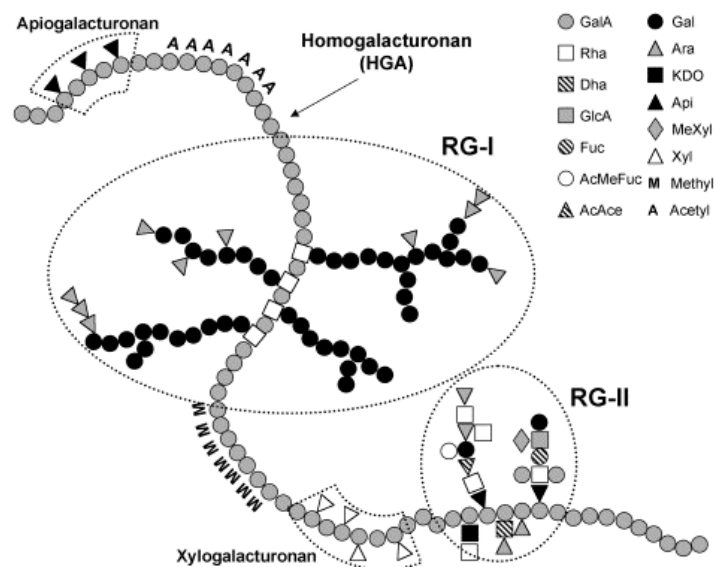
metylgruppene er fjernet før enzymet polygalakturonase blir tilsatt, vi enzymet ikke fungerer optimalt. For å kvantifisere disse gruppene er det vanlig å benytte HPLC (Levigne *et al.*, 2002). Denne metoden gir dessverre ofte en høy usikkerhet. En teoretisk mulighet for å kvantifisere MeGalA på en mer presis måte er beskrevet i metode 3.5.4. Det er imidlertid mulig å forenkle denne metoden ved å redusere med NaBD_4 i begge reduksjonstrinn for uttak nummer 1 (se figur 4.7), mens uttak nummer 2 blir redusert med NaBD_4 i første reduksjons trinn og NaBH_4 i andre reduksjonstrinn (se figur 4.8). For uttak nummer 1 er det da mulig å kvantifisere Gal, mens GalA og MeGalA vil ikke kunne skilles. For uttak nr 2 vil man kunne kvantifisere MeGalA. Etersom 235 m/z kun kan stamme fra deuterert Gal (D-Gal) vil man få en svært presis måling av den MeGalA, fordi signalet 235 m/z kun kan stamme fra D-Gal som er reduksjonsproduktet fra MeGalA. Bruk av denne metoden burde valideres i forhold til den godt innarbeidede HPLC-metoden for å detektere nativt forestrede uronsyrer.

Diskusjon av resultater fra tabell 4.3

1. GalFr1 inneholder ca 73 % 1,4- bundet GalA. Dersom materialet hadde vært pektinase-resistent burde denne verdien vært lavere, ettersom det er denne bindingen i homogalakturonan som hydrolyseres ved bruk av dette enzymet. Sannsynligheten for at det ble



Figur 4.8: Uttak nummer 2: MeGalA reduseres til D-Gal, som kan skilles fra GalA og Gal ved hjelp av MS deteksjon.



Figur 4.9: En postulert struktur av pektin (Perez *et al.*, 2003).

		Fr1	Fr2a	Fr2b	Fr3a	Fr3b	Fr4a	Fr4b
Arabinose	<i>Tf</i>	1.4	1.0	2.7	7.8	5.5	5.5	5.1
	1,3 f	0.9	2.0	1.3	1.6	3.8	0.8	1.0
	1,5 f	1.3	3.6	3.2	0.0	0.0	1.4	1.7
	1,3,5 f	0.4	1.2	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sum	3.9	7.8	7.8	9.2	9.2	7.6	7.6
Rhamnose	<i>Tp</i>	0.3	0.2	0.7	2.1	0.7	2.8	1.7
	1,2	6.4	13.2	12.5	17.6	16.0	12.4	13.3
	1,2,4	0.9	2.8	2.9	0.8	3.7	2.3	2.6
	Sum	7.6	16.2	16.2	20.2	20.2	17.3	17.3
Fucose	1,3,4	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor
Xylose	<i>Tp</i>	spor	spor	spor	spor	spor	spor	spor
Glukose	<i>Tp</i>	1.0	0.5	0.5	0.2	0.2	0.6	1.5
	1,4	1.3	0.7	0.9	0.6	0.7	1.2	0.0
	1,4,6	0.4	0.7	0.5	1.0	0.9	0.4	0.8
	Sum	2.7	1.9	1.9	1.8	1.8	2.2	2.2
Galaktose	<i>Tp</i>	4.8	5.5	6.6	9.3	6.5	4.7	5.5
	1,4	0.2	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3
	1,3	1.4	2.7	2.8	0.0	2.2	2.0	2.0
	1,6	3.8	4.6	3.5	4.0	2.7	1.6	1.5
	1,3,4	0.3	0.6	0.6	0.6	1.5	1.0	0.0
	1,2,4	0.0	0.5	0.3	3.0	1.6	1.3	2.3
	1,3,6	2.3	4.1	4.3	0.6	2.9	2.5	2.0
	Sum	12.7	18.3	18.3	17.9	17.9	13.5	13.5
Galakturonsyre	<i>Tp</i>	5.2	3.7	10.6	9.3	6.1	7.5	8.0
	1,4	65.5	49.7	43.4	37.6	41.5	47.8	43.8
	1,3,4	0.8	0.9	1.0	0.6	1.4	1.6	3.8
	1,2,4	1.6	1.5	0.8	3.0	1.5	2.1	3.4
	Sum	73.1	55.8	55.8	49.8	49.8	59.0	59.0
Nativt MeGalA	1,4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
	1,3,4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
	1,2,4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		

Tabell 4.3: Bindingsforhold i GA1Fr1–4. Fraksjonene merket med a er behandlet med NaBH_4 i reduksjonstrinn 1, mens NaBD_4 i reduksjonstrinn 2. Motsatt for dem merket b.

tilsatt for lite polygalakturonase er derfor stor. 1,4-GalA finnes som nevnt i homogalak-
turonankjeder men også som en del av hovedkjeden til rhamnogalakturenan I (RG-I)(se
figur 4.9).

2. Det ble ikke detektert noen spor etter nativt metylert GalA (MeGalA). Det ser derfor ut
til at de-esterifiseringen var suksessfull.
3. For å kunne si noe om hvor forgreinet pektinet i den aktuelle fraksjonen er, kan man ut
fra GC/MS analysen beregne antall terminale grupper som et % forhold til de resterende
ikke terminale gruppene. Dersom det er mange terminale grupper i et høymolekylær-
vekt (HMW) pektin, vil det tilsi en høy grad av forgreininger. GA1Fr1 og GA1Fr2 har
i gjennomsnitt 14 % terminale grupper og er derfor relativt høyt forgreinet. En måte å
sjekke om verdiene for antall terminale grupper er realistisk, er å sammenligne dem med
antall grupper med tre eller flere forgreiningspunkt. Dette forholdet bør ligge så nærme
1 som mulig. For GA1Fr1 og Ga1Fr1 er forholdet ca 1:1.6, noe som er akseptable verdier.
For svært forgreinede pektiner som for eksempel enkelte lav-arter har det vært et stort
problem at forholdet mellom antall terminale grupper og forgreiningspunkter er for stort.
Palsdottir (2007) fant at grunnen til dette var for milde hydrolysebetingelser med TFA.
Forholdet bedret seg ved bruk av maursyre som gir kraftigere hydrolysebetingelser.

4.5.3 Videre enzymatisk degradering av GA1Fr1 og GA1Fr2

Pektinmaterialet i GA1Fr1 og GA1Fr2 var mest sannsynlig ikke pektinaseresistent etter første
degradering med polygalakturonase. Det ble derfor bestemt å degradere materialet en gang
til med samme type enzym, men fra et annet firma. I tillegg ble det også utført enzymatisk
spalting med α -L-arabinofuranosidase i kombinasjon med endopolygalakturonase. Dette ble
gjort for å få mer informasjon om hvor Araf sitter i pektinet samt om Gal er bundet til Ara.
Det var egentlig tenkt å benytte α -L-arabinofuranosidase i kombinasjon med galaktanase, men
grunnet en feiltagelse ble galaktanase byttet ut med en galakturonidase. De videre resultatene
diskuteres utfra det enzymet som faktisk ble benyttet.

1. Degradert med endo-polygalakturonase:
 - Prøve A: GA1Fr2 (5 mg).
 - Prøve B: GA1Fr1(10 mg).

	A Fr2		B Fr1		C Fr1 Ara-ase		D Fr2 Ara-ase		GOA2	
	HMW	LMW	HMW	LMW	HMW	LMW	HMW	LMW	I	II
Ara	9.2		8.1	0.1	3	1.9	4.3	7.6	17.6	15.4
Rham	20.8		13.4	0.2	16.3	1.5	22.4	6.8	29.1	23.8
Fuc	spor		n.d	n.d	spor	n.d	spor	n.d	0.4	9.2
Xyl	n.d		n.d	n.d	spor	n.d	n.d	n.d	0.5	4.4
Gal	23.6		23.1	0.9	24.6	1	23.8	1.3	21.9	9.5
Glc	7.1		2.5	12	8.7	1.3	7.4	2.7	1.1	1.5
GalA	39.2		53	86.7	47.3	94.4	42	81.5	25.3	31.6

Tabell 4.4: Oversikt over monosakkarids sammensetning av prøvene A-D, både lavmolekylære (LMW) og høymolekylære (HMW) fraksjoner, samt verdiene for GOA2-I og GOA2-II Inngjerdingen *et al.* (2007). Alle verdiene er oppgitt i %.

2. Degradert med α -L-arabinofuranosidase og endo-polygalakturonanase:

- Prøve C: GA1Fr1(10 mg).
- Prøve D: GA1Fr2(5 mg).

Prøvevolumet var for lite til å kunne foreta en reduserende endebestemmelse. Prøvene ble derfor inkubert i 26 timer med godt overskudd av enzym. Etter endt degradering ble prøvene separert på en gelfiltreringskolonne av type PD-10 som vanligvis brukes til desalting. De høymolekylære forbindelsene ble godt separert fra de lavmolekylære. Polysakkaridsammensetningen for både høy- og lav-molekylære fraksjoner ble funnet ved hjelp av metanolyse (se tabell 4.4).

Diskusjon av resultater fra tabell 4.4

1. Dersom en sammenligner resultatene for GA1Fr1 i tabell 4.2 med A og D fra tabell 4.4 kan man se at ved behandling av polygalakturonase for andre gang, gikk andelen GalA ned fra 73 % til henholdsvis 52 og 47.3 %. Innholdet av GalA i GA1Fr2 ble redusert fra 55.8 % til henholdsvis 39.2 og 42 %. Dette gir klare bevis på at materialet ikke var pektinaseresistent. Det ble tilsatt for lite enzym ved første degradering.
2. Fraksjonene C og D som ble behandlet med arabinofuranosidase fikk redusert sitt innhold av Ara med over 53-64 % sammenlignet med A og B.

3. I de lavmolekylære fraksjonene av C og D burde man ideelt sett kun GalA og Ara ettersom enzymene kun burde spaltet av disse. Resultatene viser imidlertid tillegg av Rha, men ettersom mengden polysakkarid i C og D LMW er lav, er det ikke snakk om store kvantitative mengder. Bindingene mellom Rha er ganske syrelabile, og ettersom degraderingen skjer ved en 50 mM acetatbuffer ved pH 5.0 er det mulig at det har skjedd en uspesifikk hydrolyse etter at Ara er spaltet av.
4. Sammenligning av resultatene fra Inngjerdingen *et al.* (2007) viser det seg at avviket mellom GOA2-I (GOA2-I er fraksjon 1 av GOA2 etter PG-ase) og prøve B er størst for GalA, hvor B inneholder dobbelt så mye GalA som GOA2-I. GOA2 inneholdt opprinnelig en mindre mengde GalA (68.3 %) enn GA1 (81.8 %), noe som kan gi litt av forklaringen. Begge ble isolert fra samme batch av plantematerialet, noe som gjør det vanskelig å forklare den store forskjellen.

For å kunne vurdere hvilke bindinger mellom monosakkaridene som har blitt endret av enzymene, ble det utført en GC/MS analyse for å finne bindingsforholdet. Ettersom det alt er vist at GA1Fr1 og GA1Fr2 ikke inneholder nativt forestret GalA (se tabell 4.3) ble metyleringen utført med kun et prøveuttak hvor NaBD₄ ble benyttet i alle reduksjonstrinn.

Diskusjon av resultater fra tabell 4.5

1. For å finne ut hva som strukturmessig endret seg ved degradering med arabinofuranosidase, ble A og B (kun behandlet med pektinase) sammenlignet med D og C (behandlet med arabinofuranosidase). Arabinofuranosidase skal kun spalte Ara i furanoseform, selv om dette ikke alltid stemmer. 1,5-Araf og 1,4-Arap kan ikke skilles ved GC/MS, men ettersom arabinofuranosidase har spaltet av over halvparten Ara, kan man si at Ara foreligger hovedsakelig som 1,5-Araf, og ikke 1,4-Arap. 1,5-Araf og T-Ara kan stamme fra AG-II men kan også være en del av arabinaner. At Ara finnes i furanoseform ble også funnet av Inngjerdingen (2000) ved bruk av en annen metode.
2. Som tidligere nevnt har andelen GalA i prøvene gått ned etter andre gangs degradering med polygalakturonase. Dersom man sammenligner GA1Fr1 og GA1Fr2 i tabell 4.3 og prøve A og B i tabell 4.5 ser man at det er hovedsakelig 1,4 GalA og T-GalA som ble redusert, noe som var forventet.

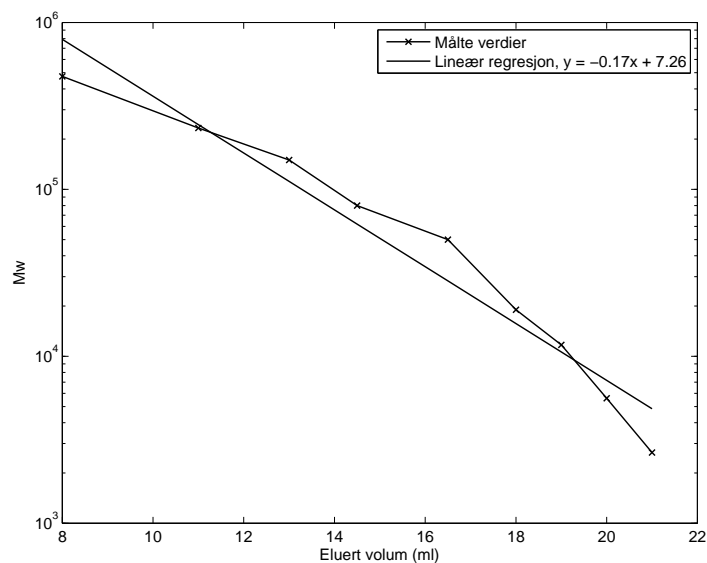
		PG-ase		Araf-ase		GOA2	
		A Fr2	B Fr1	C Fr1	D Fr2	I	II
Arabinose	<i>Tf</i>	4.0	3.5	2.1	2.9	7.1	6.6
	1,3 f	1.2	0.9	0.7	1.0	1.4	
	1,5 _f	4.0	3.7	0.3	0.5	5.1	0.7
	1,3,5 f	0.0	0.0	0.0	spor	1.8	
	Sum	9.2	8.1	3.0	4.3	17.6	15.4
Rhamnose	<i>Tp</i>	1.1	0.6	2.8	1.3	1.1	11.2
	1,2p	17.3	11.4	11.8	18.0	23.6	10.1
	1,2,4p	2.5	1.4	1.7	3.2	4.4	0.6
	Sum	20.8	13.4	16.3	22.4	29.1	23.8
Fucose	1,3,4	spor	spor	spor	spor	0.4	2.0
Xylose	<i>Tp</i>	spor	spor	spor	spor	0.1	0.5
Glukose	<i>Tp</i>	0.6	0.0	6.5	0.0	0.4	0.7
	1,4	1.5	0.8	2.2	2.7	0.7	0.8
	1,4,6	5.0	1.7	Støy	4.7		
	Sum	7.10	2.50	8.70	7.40	1.1	1.5
Galaktose	<i>Tp</i>	4.5	7.6	9.3	10.8	4.0	4.8
	1,4	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.9
	1,3	3.9	2.7	4.6	3.5	4.7	0.5
	1,6	8.2	4.7	5.0	4.6	2.6	
	1,3,4	1.4	5.2	1.3	0.7	0.9	
	1,2,4	0.4	0.0	0.0	0.4		
	1,3,6	5.1	3.0	4.4	3.8	5.4	
	Sum	23.6	23.1	24.6	23.8	21.9	9.5
Galakturonsyre	<i>Tp</i>	5.0	2.3	1.5	2.4	0.9	7.9
	1,4	33.5	44.4	45.6	38.6	23.2	12.7
	1,3,4	0.5	6.2	0.2	0.6	0.8	11.0
	1,2,4	0.2	0.1	0.0	0.4	0.4	
	Sum	39.20	53.00	47.30	42.00	25.3	31.6

Tabell 4.5: Bindingsforhold etter videre enzymatisk degradering av GA1Fr1 og 2. Resultatene for GOA2-I og II er lagt ved. A: (GA1Fr2) og B (GA1Fr1) er kun behandlet med endo-polygalakturonase, mens C (GA1Fr1) og D (GA1Fr2) er behandlet med arabinofuranosidase og endo-polygalakturonase.

3. B og C har 18 % terminale grupper noe som tilsier en høy grad av forgreininger. Antall terminale grupper har økt med 4 % fra forrige degradering. Forholdet mellom forgreiningspunkt og terminale ender for B–C er på 1:1.4, noe som er akseptable verdier.
4. Tilstedeværelse av 1,2,4–bundet Rha indikerer at RG-I finnes, ettersom dette er et strukturelement som hovedsakelig kun finnes i RG-I. Avhengig av plantematerialet, kan 20–30 % av Rha enhetene i hovedkjeden til RG-I være bundet til et tredje monosakkarid (Inngjerdingen, 2007). A–D har i gjennomsnitt en forgreiningsgrad på ca 16 % av Rha enhetene, noe som muligens er lavere enn det som er vanlig. Det er mulig at noe av grunnen til dette er at deler av 1,2–bundet Rha deltar i andre bindinger enn til GalA i hovedkjeden til RG-1. Forgreiningsgraden i hovedkjeden til RG-I er derfor trolig høyere. Inngjerdingen *et al.* (2007) fant en forgreiningsgrad på 15 % for GOA2-II, noe som samsvarer med det som ble funnet her.
5. Arabinogalaktan (AG-II) finnes ofte som sidekjerder i RG-I (se figur 4.9. AG-II består av 1,3–, 1,6– og 1,3,6–bundet Gal og har en høy forgreiningsgrad. Ca 15–20 % av Gal er 1,3,6–bundet i A–D. Ettersom 1,3,6–bundet Gal er relativt spesifikk for AG–II, tyder dette på at AG–II er tilstede. GOA2 gav ikke en positiv reaksjon med Yariv reagens, men det ble funnet strukturelementer som tilsa at GOA2 inneholder AG–II (Inngjerdingen *et al.*, 2005a).
6. Det ble ikke funnet 1,4–Gal i A–D, og kun spormengder i GA1Fr1–4. Dette tyder på at arabinogalaktan I (AG-I) ikke finnes. Inngjerdingen *et al.* (2007) fant 4.3 % av denne bindingen tilstede i GOA2-II, noe som indikerte tilstedeværelse av AG-I. Grunner til denne forskjellen er ikke kjent.

4.6 Molekylvektfordistribusjon

For å finne en tilnærmet molekylvektfordistribusjon av de respektive fraksjonene, ble fraksjonene separert på en gelfiltreringskolonne av type Superose 6 koblet til FPLC (se metode 3.5.1). Det ble utarbeidet en standardkurve basert på dekstranstandarder av analytisk kvalitet. Et problem ved å direkte relatere molekylvekt av pektinfraksjonen til en dekstranstandarder er at dekstraner har en annen forgreiningsgrad enn pektiner, og vi derfor opppta et annet romlig volum enn pektinet. Når man oppgir molekylvekter oppnådd på denne måten, bør den oppgis



Figur 4.10: Semilogaritmisk plott for molekylvektsdistribusjonen basert på toppmaksimum for 8 dekstraner med forskjellig molekylvekt.

relativt til dekstraner.

Diskusjon av resultater fra tabell 4.6

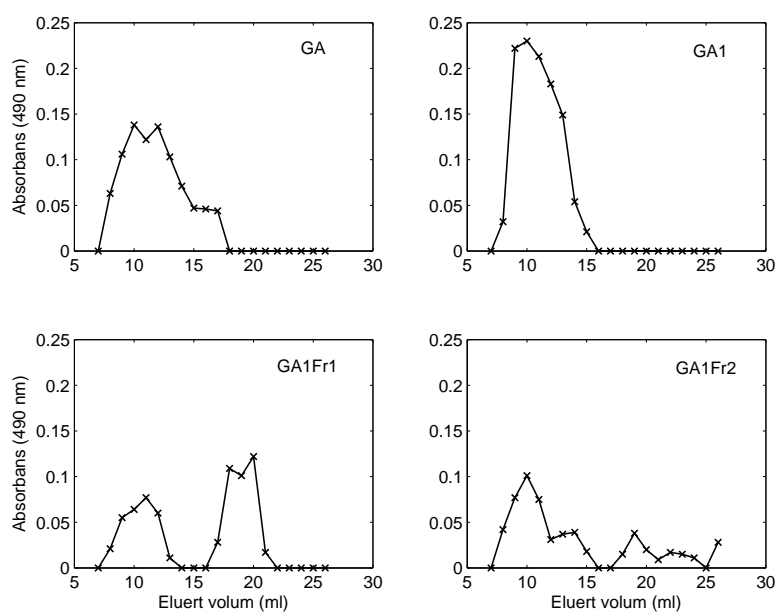
Elueringsprofilen til henholdsvis GA1 og GA stiger relativt raskt etter 8 ml, men ikke raskt nok til å indikere at pektinene kommer ut med void (se figur 4.11). Molekylvektene til de respektive pektinene er derfor ganske sikkert i området under 500 000 Da. Profilen til GA og GA1 indikerer at materialet er av en heterogen natur, med en stor molekylvektspredning. Elueringsprofilen til GA1 indikerer at det er en høyere hyppighet av de høyeste molekylvektene.

Inngjerdingen *et al.* (2005b) bestemte molekylvekten til GOA2 til å ligge mellom 30-39 000 Da. GOA2 i denne artikkelen ble isolert fra plantemateriale fra Diré i 1996, mens plantematerialet som ble benyttet i denne oppgaven kom fra Lac Horo, Gourma. Inngjerdingen *et al.* (2007) fant aggregatdannelse av GOA2 i løsning, og oppgir ingen molekylvekt, men sier at GOA2 er polydispers. Plantematerialet benyttet her var fra Lac Horo.

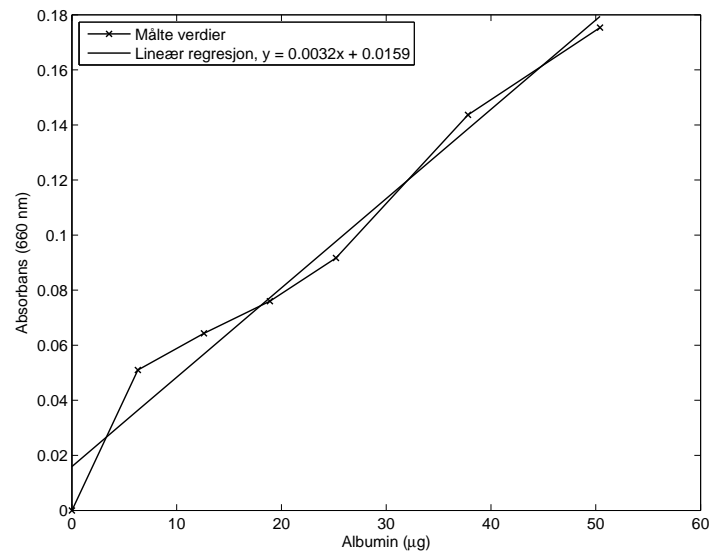
GA1Fr1 (se figur 4.11) blir separert i to ulike topper. Topp nummer 1 har molekylvekt ca 250 000 Da, mens toppnummer to har sitt toppunkt ved ca 10 000 Da. Disse to molekylvektene burde ikke ha kommet i samme topp etter separering på en gelfiltreringskolonne av type Bio-gel P30. Opphavet til dette kan ha vært at ved applisering på Bio-gel P30 ble pektinene eluert

Prøve	min Mw	max Mw	Gjennomsnitt
GA	51 000	<500 000	225 500
GA1	16 500	<500 000	208 500
GA2	75 000	165 000	120 000
GA1Fr 1	10600	245 000	-
GA1Fr 2	362 000	362 000	362 000
GA1Fr 3	51 000	112 000	81 500
GA1Fr 4	15 700	112 000	63 850
<i>GOA2, 2005</i>			<i>30–39 kD</i>
<i>GOA2, 2007</i>			<i>polydispers</i>
<i>GOA2-I</i>			<i>48 000</i>
<i>GOA2-II</i>			<i>18 000</i>

Tabell 4.6: Molekylvektsdistribusjon, relativt til dextraner, for de respektive fraksjonene etter separasjon på en gelfiltreringskolonne type Superose 6 kolonne. Verdiene for GOA2, GOA2-I og GOA2-II er tatt med i tabellen (Inngjerdingen *et al.*, 2007).



Figur 4.11: Elueringsprofil etter fenol svovelsyre-test for GA, GA1, GA1Fr1 og GA1Fr2.



Figur 4.12: Standardkurve for bestemmelse av proteininnhold i en prøve.

med destillert vann, noe som kan favorisere aggregatdannelse, som videre har ført til dårlig separasjon. Aggregering av pektiner i vandig løsning er svært vanlig. På Superose P6 kolonnen elueres pektinene med 10 mM NaCl (aq). Salter hindrer aggregering, noe som kan forklare at man ser to pektiner med så forskjellig molekylvekt i samme fraksjon (Hokputsa *et al.*, 2004).

GA1Fr2 har en tydelig topp ved 360 000 Da. Etter dette måles det så lave absorbanser at disse ikke regnes med i molekylvektmålingen.

Det var dessverre ikke mulighet for å applisere A - D etter andre gangs enzymatisk degrading selv om dette kunne ha gitt mye spennende informasjon.

4.7 Proteinbestemmelse

Inngjerdingen *et al.* (2005b) benyttet Lowrys test for å kvantifisere proteininnholdet i GOA1 og GOA2. For å kunne sammenligne resultatene ble det derfor valgt å benytte samme metode.

For å kunne kvantifisere den målte fargereaksjonen ble en standardkurve satt opp (se figur 4.12). Et problem med denne metoden er at standardkurven ikke er lineær over hele konsentrasjonsområdet, spesielt i konsentrasjonsområdet under 6.8 µg protein per prøve, noe som tilsvarer 1.3 % protein når prøvemengden er 500 µg.

Resultater

- GA: 0.3 - 1 %.
- GA2 : 0.2 - 0.8 %.
- GA1Fr1 : 0.2 %.
- GA1Fr2 : 0.2 %.

Lowrys test måler fenoliske forbindelser, og derfor også andre fenoliske substanser en fenoliske aminosyrer. Det vil derfor være mange forbindelser som interagerer og vil kunne gi et galt resultat.

Ut fra resultatene er det svært små mengder protein i prøvene. Etersom prøvene ligger i området under det som er lineært (< 1.3 % protein) er det tilknyttet stor usikkerhet til verdiene. Det eneste man kan si er at alle prøvene inneholder < 1.3 % protein. En mulig løsning for å kunne kvantifisere mengde protein med en høyere sikkerhet kunne ha vært å økt prøvemengden til 2 mg, slik at man kunne ha fått en kraftigere respons. Inngjerdingen *et al.* (2005b) fant at mengde protein for de sistnevnte fraksjonene var på henholdsvis 10 % og 1.5 %.

4.8 Biologisk aktivitet

4.8.1 Komplementtesten

Pektinenes evne til å interagere med komplement ble bestemt *in vitro*. Resultatet av denne testen kan si noe om pektinets evne til å modulere en viktig del av immunforsvaret. Testen skiller ikke mellom hemming og aktivering av komplementet (se metode 3.6.1). Testen måler antikomplementær effekt, det vil si % hemming av hemolyse. Etersom dette er et biologisk assay, vil mange av komponentene endre seg fra dag til dag. Resultatene blir derfor korrelert til en standard, PMII₅₀. Resultatene er oppgitt i ICH₅₀ verdier, som er den laveste konsentrasjonen av prøvesubstans som må til for å kunne gi 50 % hemming av komplementet. Måling av antikomplementær effekt for fraksjonene GA1 og GA1Fr1 samt PMII ble utført to ganger. For alle andre fraksjoner ble forsøket kun utført en gang, noe som gir en høy usikkerhet til resultatene.

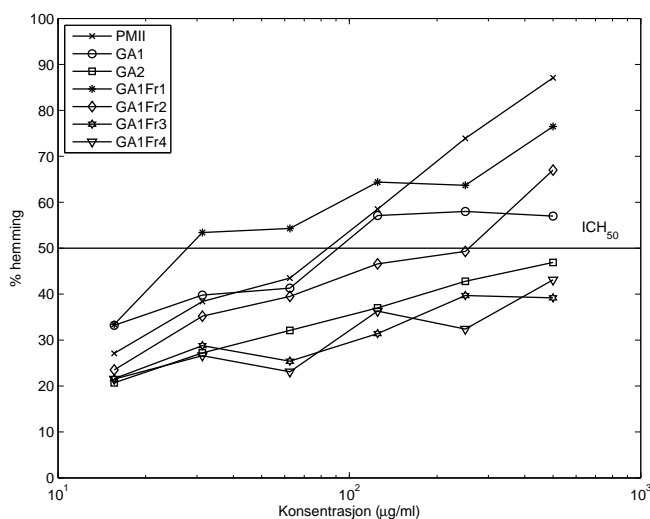
	ICH ₅₀ -verdier:	
	Forsøk 1 ($\mu\text{g/ml}$)	Forsøk 2 ($\mu\text{g/ml}$)
PMII	90	1.74
GA1	97	71
GA2	> 500	
GA1Fr1	28	5.4
GA1Fr2	260	
GA1Fr3	> 500	
GA1Fr4	> 500	
A (Fr 2-1)		< 21.3
B (Fr 1-1)		< 1.7
C (Fr 1-2)		< 50
D (Fr2-2)		~ 125
<i>PMII</i>	<i>25</i>	
<i>GOA2</i>	<i>60</i>	
<i>GOA2-I</i>	<i>~ 25</i>	

Tabell 4.7: ICH₅₀ verdier til alle testede fraksjoner. Resultatene for GOA2 og GOA2-I er lagt ved (Inngjerdingen, 2007).

Problemstillinger tilknyttet utføring av testen

Det ble utført to forsøk. I forsøk 2 gav kontrollen med buffer/BSA kun 20 % hemolyse selv om titeringskurven viste 50 % hemolyse. Den lave graden av hemolyse gir et en stor usikkerhet i resultatene (se metode 3.6.1). Grunnen til dette er at det er kun en liten mengde komplement i løsningen igjen å påvirke. Usikkerhet i absorbansmålingene vil da kunne gi en større % utslag for enkeltverdiene. Opphavet til den lave graden av hemolyse på 23 % kan være at komplementet ikke ble tilsatt hurtig nok. Komplementet er svært ustabil og denaturerer fort. Det er derfor viktig å tilsette komplementet til prøvene i et hurtig tempo etter opptining. Dette kan muligens forklare en del av hvorfor ICH₅₀ verdiene for PMII, GA1 og GA1Fr1 varierer så mye mellom forsøk 1 og 2. En viss variasjon er forventet ettersom dette er et biologisk testsystem.

For A-D var mengde materiale så liten at det ikke var mulig å veie den opp. Konsentrasjonene er derfor ikke kjent. Det som er kjent, er at den høyeste konsentrasjonen i tabellen er lavere enn 500 $\mu\text{g/ml}$, trolig ca 125-250 $\mu\text{g/ml}$. I tabell 4.7 er det tatt høyde for at konsentrasjonen

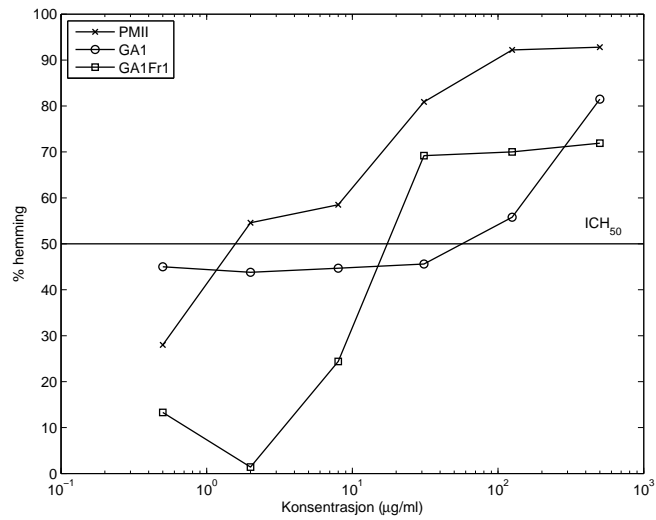


Figur 4.13: Forsøk 1 ble utført med en 2-folds fortynningsrekke (500-15.6 $\mu\text{g/ml}$)

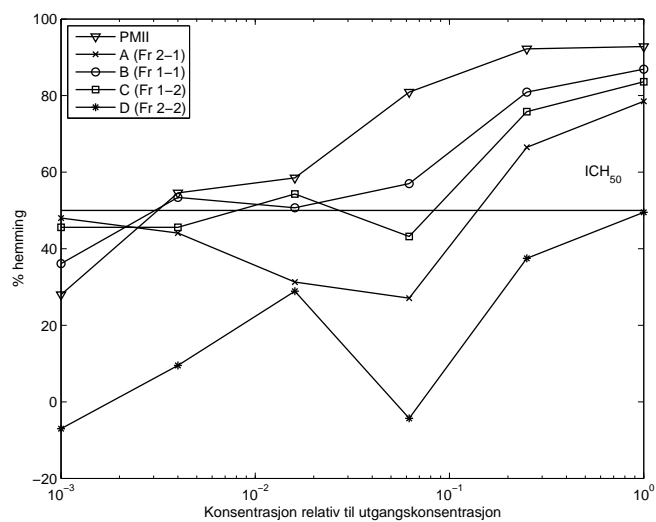
til A og D er 50 % av konsentrasjonen til B og C ettersom den enzymatiske degraderingen for A og D startet med 5 mg og for B og C startet den med 5 mg. Ettersom konsentrasjon ikke er kjent er det vanskelig å sammenligne ICH_{50} verdiene med andre prøver, men dersom man plotter verdiene som om startkonsentrasjonen var 500 $\mu\text{g/ml}$ kan man si er at de reelle ICH_{50} verdiene er lavere enn det som fremgår av plottet. Av denne grunn er det vanskelig å direkte sammenligne effekten av A-D med PMII. PMII i kjent konsentrasjon er plottet sammen med A-D i figur 4.15 slik at det er mulig å få et inntrykk av effekten til de respektive prøvene.

Diskusjon av resultater i tabell 4.7

1. Det ser ut til at alle fraksjonene har et potensial til å påvirke komplementet, men til ulik grad. GA1, GA1Fr1, A og B har lavest ICH_{50} , noe som tilsier høyest effekt. Antikomplementær effekt i forhold til PMII er: $B > \text{GA1Fr1} > A > \text{GA1}$. Det ser ut til at jo større tetthet av rhamnifiserte område desto større effekt har pektinet til å påvirke komplementet. Inngjerdingen (2007) fant at etter enzymatisk degradering med polygalakturonase, viste fraksjonen med høyest molekylvekt høyest antikomplementær effekt. Den samme tendensen ble sett for GA1Fr1 sammenlignet med GA1 og PMII, se figurene 4.14 og 4.13.
2. Resultatene fra figur 4.15 gir en indikasjon på at A utøver en høyere aktivitet enn C,



Figur 4.14: forsøk 2 med en 4-folds fortynningsrekke. (500-0.2 µg/ml)



Figur 4.15: % hemming av komplement for A-D

og B utøver en høyere aktivitet enn D. Prøve C og D er behandlet med galakturonase og arabinofuranosidase. Det kan derfor virke som om aktiviteten er noe redusert etter at ca 50 % av Ara er fjernet. Inngjerdingen (2007) fant at ved delvis fjerning av Ara ikke hemmer det den komplementære effekten, mens dersom all Ara fjernes ved hjelp av svak syrehydrolyse hemmet det den antikomplementære effekten drastisk.

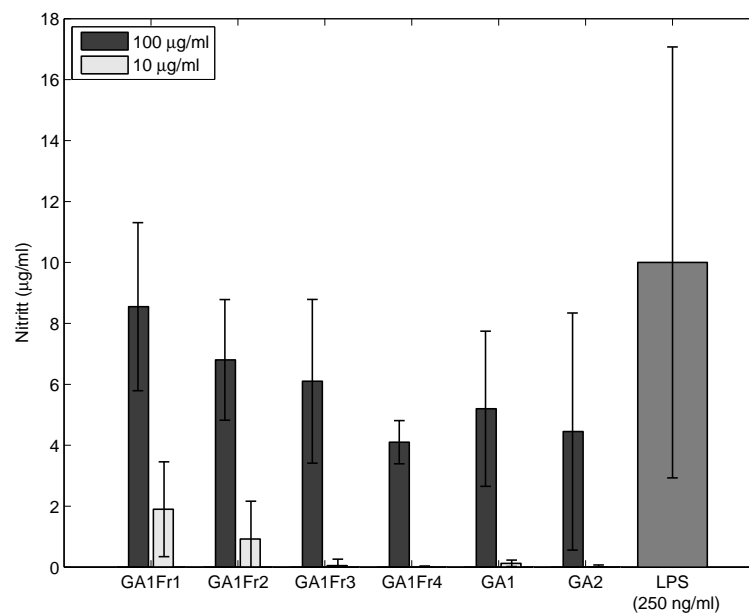
3. GA2, GA1Fr3 og GA1Fr4 passerer ikke ICH_{50} for konsentrasjonene benyttet her. Videre enzymatisk degradering ble derfor ikke aktuelt for disse.

4.8.2 Makrofagstimulering

Denne testen ble utført på rikshospitalet av Dr. Marit Inngjerdingen mars 2007.

Makrofager fagocytterer uønsket materiale, samt hjelper til i aktivering av andre immunceller. Dette er viktige aktiviteter når det gjelder blant annet sår-healing, men også inflammasjon mm. Polysakkarider er vist å øke aktiviteten til makrofager tidligere (Inngjerdingen, 2007). Når makrofager aktiveres vil de skille ut en rekke mediatorer. En viktig mediator er NO (g). I løsningsvil denne omdannes spontant til NO_2^- som er en av to stabile nedbrytingsprodukter fra NO. NO_2^- kan detekteres kolorimetrisk ved hjelp av Griess-reagenssystem. Dette er en relativt enkel test, hvor det vanskeligste trinnet består i å dyrke makrofager. Resultatene i tabell 4.16 viser at alle fraksjonene utøvere en aktivitet på makrofagene i konsentrasjonen 100 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasjoner lavere enn 1 $\mu\text{g/ml}$ gav ingen respons. Det virker som om GA1Fr1 og GA1Fr2 gir en høyere respons enn GA1. Selv om den første enzymatiske degraderingen ikke var optimal, vil GA1Fr1 og GA1Fr2 ha en større tetthet av forgreinede områder som kan forklare den høyere effekten. Det hadde vært av interesse å testet prøve A-D, etter ny enzymatisk degradering, men det var dessverre ikke mulig grunnet for små mengder.

GOA1 og GOA2 gav ingen respons i denne testen, hvor konsentrasjoner opp mot 500 $\mu\text{g/ml}$ ble testet Inngjerdingen *et al.* (2005b). Dette gav en teori om at pektinmaterialet fra de respektive fraksjonene er belastet med LPS etter bakterieangrep av Gram negative bakterier. Prøvene ble derfor testet sammen med polymyxin B, som er en LPS hemmer. Dessverre ble makrofagene så sterkt påvirket av stoffet, at det ikke er mulig å si noe effekten ble redusert eller ikke. Etersom LPS gir en så kraftig aktivering av makrofager, hadde det vært en mulighet å testet prøvene ved bruk av Limulus Amebocyte Lysate (LAL) testen. Dette ville kunne bidratt til at utelukke bidrag fra LPS. I privat samtale med Marit Inngjerdingen kom det frem



Figur 4.16: Måling av NO-frigjøring fra makrofager stimulert med pektinfraksjoner fra *G. oppositifolius*. Lipopolysakkarid (LPS) er kontroll.

at metoden for å teste makrofagaktivering hadde blitt forbedret. Prøvene i denne oppgavene hadde derfor ikke fått den samme behandlingen som Kari Inngjerdings prøver. Dette kan forklare den store forskjellen observert. Pektinfraksjonen GOA2 har tidligere blitt testet for LPS ved hjelp av LAL-test. Resultatene var negativ. (Privat samtale med Kari Inngjeringen, 2007)

4.8.3 Sub-akutt toksisitetstesting *in vivo* på mus

Denne testen ble utført av Dr. Ababacar Maiga ved DMT, Bamako, Mali. For utfyllende resultater, se vedlegg B. Det har ikke tidligere blitt utført denne typen tester på plantematerial fra *G. oppositifolius*. Det ble utført kliniske tester av musene under og etter behandling med pektinmaterialet, se metode 3.6.3. Ingen av testene viste en signifikant endring mellom kontroll og test-gruppe. Resultatet ble derfor tolket som at pektinmaterialet testet utøver ingen sub-akutt toksisitet. Langtidseffekter av bruk er ikke kjent.

Part II

Ethnopharmacological survey in Mali

Chapter 5

Ethnopharmacological survey in Mali

5.1 Introduction

In both developing countries and in many industrialised countries there is a strong tradition for using medicinal plants to treat various illnesses. In Mali, West Africa, approximately 80 % of the population relies on traditional medicine. The reasons for this are many, but the main reason is that most people of Mali can not afford conventional drugs. Mali is ranked as number 174 of a total of 177 countries in the Human Development Report 2006, that ranks the development of countries (HDI, 2006). All though 64 % of the population lives in poverty, there are few people who are starving. The reason for this might be that Mali is mostly based on barter economy and that the peoples are good at sharing benefits with each other. Approximately 70 % of the population lives in areas without proper access to medicines or modern health care. In Mali there are 4 doctors per 100 000, to compare - in Norway there are 356 doctors per 100 000. This makes the traditional healers very important for the population. They contribute by giving a diagnosis and treatment to all the people who does not have the ability to visit a conventional doctor. The cost for conventional medicines is also often too high for common people and the healers have an important position here as well, because they provide cheap and available medicines. Since there are many people relying on traditional medicine in Mali, it is important to improve this type of medicines, in order to give a better life to most people. The rate of infant mortality is high and the life expectancy in Mali is only 47 years. With better medicines this could be improved, as relatively harmless infectious diseases are the main reasons for mortality. Ethnopharmacological research combined with

modern bio-assay techniques are important tools in order to improve plant medicine, so that people can be treated more effectively.

5.2 Ethnopharmacology

When it concerns field work in order to investigate use of plants in traditional medicine, one often encounters different terms, such as ethnobiology, ethnomedicine and ethnopharmacology. With ethnobiology we mean the study of how people have been using plants and animals for different purposes. The term ethno relates to people and culture, and the term biology relates to knowledge about living organisms. Ethnopharmacology and ethnomedicine are subfields of ethnobiology where the medicinal use of plants and animals are in focus. In ethnopharmacology it is particularly important to investigate which substances in the plants the pharmacological effect originates from.

To be able to carry out an ethnopharmacological survey it is important to know that this is an interdisciplinary field, where biology, analytical chemistry, medicine, social anthropology, botany, pharmacology and many other different disciplines are represented. To elucidate the importance of this field it is worth to mention that there are many important drugs on the market today which originate from ethnopharmacological research. Examples of such are opiates, quinine and the digitalis glycosides.

5.3 The department of traditional medicine (DMT) in Mali

Since 1996, School of Pharmacy, University of Oslo, has had a collaboration with DMT. DMT is a research institution in Bamako, Mali, which has been since 1990, a collaboration partner of the World Health Organisation, WHO. The main objectives of the DMT are:

1. Make new and better formulations of Improved Traditional Medicines (ITMs).
2. To carry out ethnobotanical surveys in order to maintain information about medicinal plants.
3. Registration of healers who has shown that they have knowledge enough to treat ill people.
4. To carry out toxicological, pharmacological and phytochemical analysis.

5. To carry out clinical trials of ITMs.
6. To teach students.
7. To work for the position of traditional medicine, so that it can be complementary to conventional medicine.

The DMT also has a 1000 m² medicinal garden, where they have 135 important medicinal plants. This is important for education and research.

5.3.1 Improved Traditional Medicines, ITMs

ITMs are improved traditional herbal preparations which show effect in both humans and bio-essays, and are none-toxic.

1. Balembo, *Crossopteryx febrifuga*, syrup of the fruits is used against cough.
2. Dysenteral, *Euphorbia hirta*, a decoction of the aerial part is used against dysentery.
3. Psorospermin, *Psorospermum guineense*, an ointment of the roots is used against dermatitis.
4. Hepatisan, *Combretum micranthum*, a decoction of the leaves is used against hepatitis.
5. Laxia-cassia, *Cassia italica*, a decoction of the leaves is used against constipation.
6. Malarial, *Cassia occidentalis*, *Lippia chevalierii*, *Spilanthes oleracea*, a decoction of the leaves and flowers is used against malaria.
7. Gastro-sedal, *Vernonia kotschyana*, a powder of the roots is used against stomach ulcer and gastritis.

5.4 Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila and Koutiala.

In the 17th to the 21st of March and the 2nd -6th of April 2007 it was carried out an ethnopharmacological survey in Mali by people from the University of Oslo and DMT, Bamako. This survey was a part of the Global Health Program, financed by the Norwegian research council.

Professor Drissa Diallo, head of the department of traditional medicine (DMT), did a great job as translator and interviewer. All together 54 healers were interviewed, 37 in the Dioila



Figure 5.1: The herbal preparation Malarial, which is used to treat malaria.

district and 17 in Koutiala. Each interview took approximately 20 minutes. It was asked questions about 5 plants which in earlier surveys had been found interesting: *Erythrina senegalensis*, *Opilia celtidifolia*, *Combretum glutinosum*, *Biophytum petersianum* and *Syzygium guineense*. The healer was first informed about why the data was collected and how the data would be used. Then it was asked if he/her accepted this, and wanted to be interviewed. Secondly a formal introduction was made and then it was checked if the healer really knew the plants and its name. For two of the plants, the plant material was showed to the healers to check their botanical knowledge. Important information such as formulations and indications were also questioned. It was surprisingly many different names which were used for these plants. Sometimes it took a long time just to make the healer understand which plant we were talking about. After the interview the healers received 2000 CFA (\$ 2.8) and a small bag of cola nuts (*Cola nitida*) according to the tradition. Only 8 % of the interviewed healers were women. The age of the healers ranged between 38 to 90 years.

Unfortunately, there were no possibilities to talk about *Glinus oppositifolius* because the plant only grows further up north in Mali, like in Goruma, Dirè, Haoussa and in the region near by Lac Horo.



Figure 5.2: A map of Mali. The places where the ethnopharmacological surveys carried out in the years 2003–2007 are underlined.

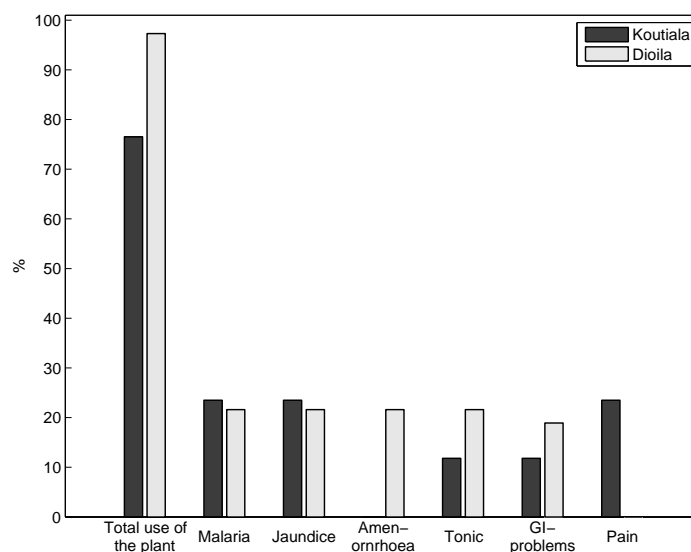


Figure 5.3: The most used indications for *Erythrina senegalensis* A.Rich.

5.5 Discussion of the survey carried out in the region of Dioila and Koutiala

5.5.1 *Erythrina senegalensis* A.Rich. (Leguminosae: Papilionoideae)

Erythrina senegalensis is a tree in the pea family, see picture 5.4. It is 5-15 m tall and grows in West-African tropical and sub-tropical areas from Senegal to Cameroon. The flowers are bright red (Burkill, 1997).

There is still some superstition concerning medical treatment with traditional medicine in Mali and a good example of this is that “the doctrine of signatures” is still practised. The doctrine of signatures is an ancient European philosophy that says that plants that resemble human body parts has useful properties for healing those parts. The use of the red flowers of *E. senegalensis* against amenorrhoea and haemorrhoids and as aphrodisiac can be examples of this.

80-90 % the 54 healers interviewed used the plant to cover over 40 indications. In a survey carried out in Dioila and Kolokani in 2006, 47 % of the healers said that they used this plant against amenorrhoea, 13 % against malaria and 13 % against jaundice. In a survey in Siby in 2004 the most frequently mentioned indications were GI problems (40 %), amenorrhoea (27 %) and malaria (9 %) (Theis, 2006).

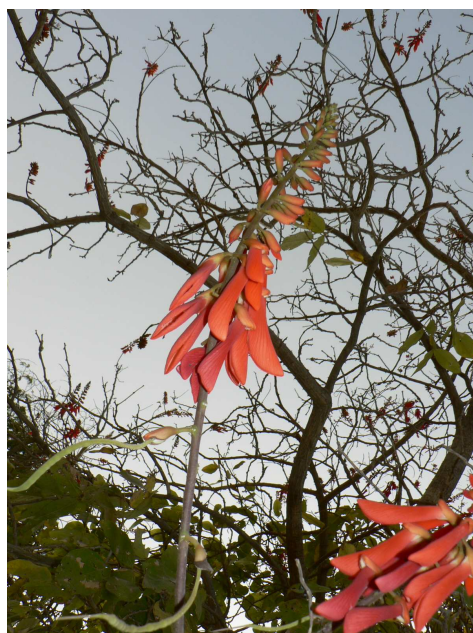


Figure 5.4: *Erythrina senegalensis* A.Rich. (Leguminosae: Papilionoideae)

In various surveys from Africa there has been reported that the plant is used to treat wounds, amenorrhoea, headaches and eye-troubles. Biological activities shown in bio-assays shows analgesic effect of water extract (50–100 mg/kg) that significantly inhibited acetic acid induced abdominal constriction in mice in a dose dependant manner (Saidu *et al.*, 2000). This might explain the use as a painkiller and against haemorrhoids. In a screening for antibacterial activity by Kone *et al.* (2004) found that the ethanol extract of the root of *E. senegalensis* gave the lowest ICH₅₀ values of 50 different plants used. The ICH₅₀ level of four different Gram positive bacteria was 12 µg/ml or less.

5.5.2 *Opilia celtidifolia* Endl. (Opiliaceae)

Opilia celtidifolia is found from Senegal throughout the West African savanna and dry tropics. The leaves have a bitter taste. This plant has unfortunately been over harvested in the Dogon country, which has led to extinction of the plant in this part of the country. This is a highly used plant among the healers interviewed in this survey, and there is a good consensus about the use of the plant (see figure 5.5). All most 100 % of the healers use *O. celtidifolia* and the most frequent indications are malaria, taeniasis and as an appetiser. Most of the times a decoction is made of the leaves. The decoction is drunk or used for washing the body. These

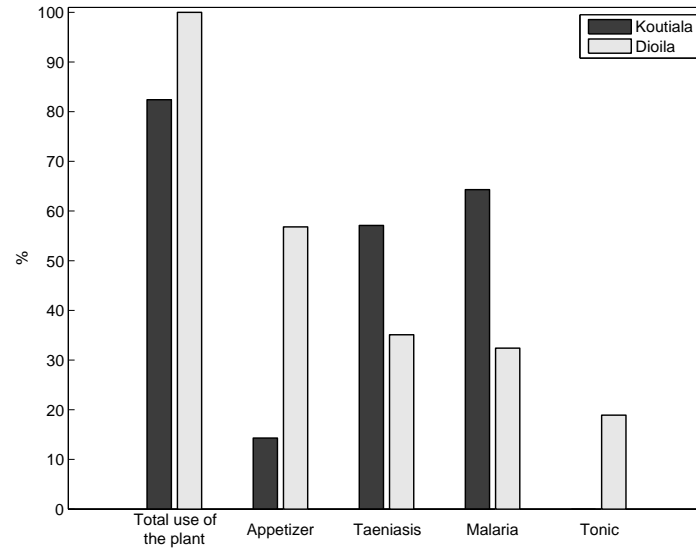


Figure 5.5: The most used indications for *Opilia celtidifolia*



Figure 5.6: *Opilia celtidifolia* Endl. (Opiliaceae)

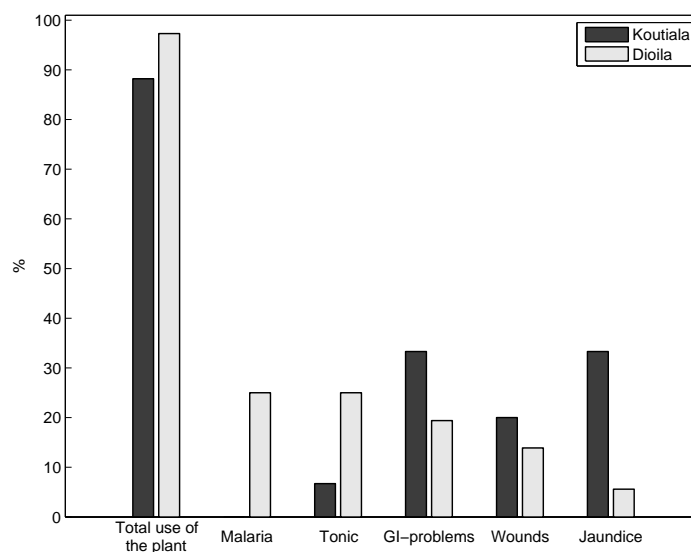


Figure 5.7: The most used indications for *Combretum glutinosum*

findings were similar to the results from the survey conducted in Dioila and Dogonland 2003 where 27 % used it as an appetiser, 36 % as an antimalarial drug and 10 % used it against taeniasis (Rangjord, 2003). In 2004 a survey was carried out in Siby, Dioila and Kolokani, where *O. celtidifolia* was one of the plants questioned. The main reported disease in Siby was skin disorders (19.2 %) followed by malaria (14.4 %), in the district of Dioila main indication was as an appetiser (10.4 %), as an abdominal pain killer (10.4 %) and against taeniasis (7.2 %). In Kolokani the healers reported that they mainly used the plant against taeniasis. There is a difference in use of the plant between the regions. This might indicate a low degree of contact between the different regions on the countryside (Togola *et al.*, 2005).

In other parts of Africa *O. celtidifolia* is used against worms (taeniasis), leprosy and as appetiser. The use against internal worms can be explained by saponins which had antispasmodic and anthelmintic effect. The leaves also contain 0.3 % alkaloids, and the roots more than 1.0 %, which might also have pharmacological effects (Burkill, 1997).

5.5.3 *Combretum glutinosum* Perr. (Combretaceae)

Combretum glutinosum is a small tree widespread in the Sahel region from Senegal to Nigeria and across Africa to Sudan. It is particularly resistant to dry environments.

This medicinal plant is well known to nearly all of the healers in both the regions, approx-



Figure 5.8: *Combretum glutinosum* Perr. (Combretaceae)

imately all the healers used the plant. According to figure 5.7, the healers in Dioila use the plant preferably against malaria and as a tonic, but in Koutiala the healers use it to treat jaundice. It is unknown why the use is so different in Dioila and Koutiala regarding malaria and jaundice. Low rate of communication might be the cause. The preparation most frequently used by all of the healers in both regions is a decoction of the leaves. In an earlier survey from in Bandiagara 2005, it was discovered that 35 % of the healers used *C. glutinosum* against wounds, 18 % against GI-problems and 18 % against jaundice. In a survey in Dioila/Kolokani in 2006 the most frequently mentioned indications were diarrhoea (31 %), malaria (31 %) and fever (25 %) (Sagberg, 2006).

In previous and various surveys carried out in Africa, it has been reported that this plant has been used to treat wounds, post-circumcision haemorrhage and to cure hepatitis. The flavonic heterosides punicalin and combreglutinin, which are hydrolysable tannins, are reported present in the leaves (Burkill, 1997). All these substances show good antioxidant effect, which can be important in wound healing. The use of the plant for wound healing seems widespread, so the plant might be antibacterial and perhaps also have astringent properties.

A water extract of the leaves showed antitussive activity in guinea pigs. The intensity of an oral 1 g/kg dose of the freeze-dried extract was comparable that of 100 mg codeine/kg (Ngaba *et al.*, 1980).

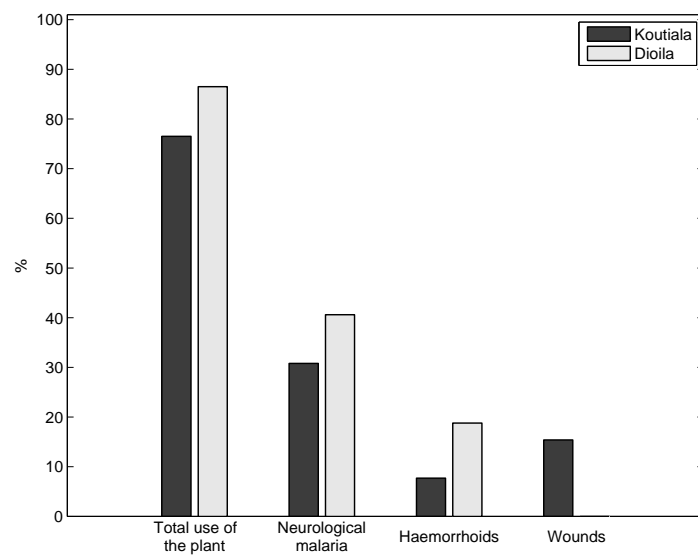


Figure 5.9: The most used indications for *Biophytum petersianum*

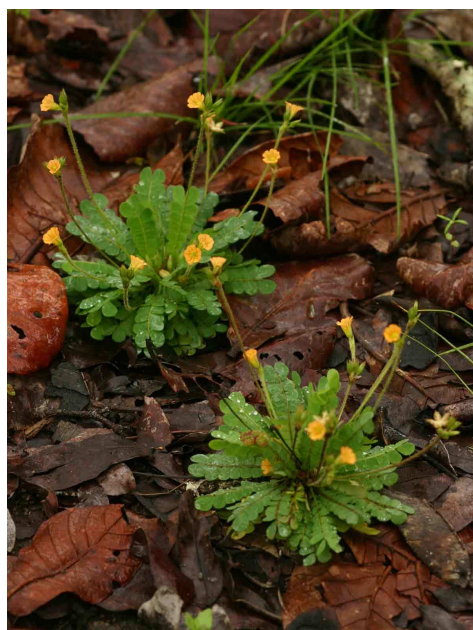


Figure 5.10: *Biophytum petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae)

5.5.4 *Biophytum petersianum* Klotzsch (Oxalidaceae)

Biophytum petersianum is widespread in tropical and subtropical Africa, and across Asia to New Guinea. The highly sensitive leaves folds up in response to weather when touched. An other name of this plant is *Biophytum sensitivum*.

In this survey the plant was medically mostly used against neurological malaria. In neurological malaria the child has convulsions which make it impossible to use the oral way to administrate a drug. The most common way of preparing the remedy was therefore to make a fumigation of the dry leaves for inhaling and the powder was mixed with water to apply on the body and in the nose. By doing this, the working principle can be absorbed through alternative administration ways.

In 2004 a limited survey was conducted in Dioila, Kolokani, Sikasso and Blendio which showed that the plant was used, among others, against malaria, as a wound healing remedy and against stomachache (Inngjerdingen *et al.*, 2005a).

According to Burkill (1997) the plant is used in Nigeria against stomachache, in Gabon and Zaire as a purgative, in Ivory Cost against sores of different kinds, and it is also reported to be used against different stings and snakebites. In a survey in Congo, the plant was told to be a sedative and used against epilepsy. Examinations of the leaves and roots has not shown any alkaloid to be present.

5.5.5 *Syzygium guineense* D.C. (Myrtacea)

Syzygium guineense is a tree which can be up to 17 m tall. It is widespread in tropical Africa, but only near by rivers and lakes. Approximately 50 % of the healers used this plant. A reason for the low use might be that the tree only grows near the river. In Koutiala there were 9 healers who knew the plant, but not necessary used it in their practice, and all mentioned different indications. The most frequently used part of the tree is the leaves. In 2006 there were conducted a similar survey in Dioila where the results are comparable to the ones in this survey. 50 % of the healers used this plant, 21 % of them used the plant for wound healing and 16 % against respectively dermatitis and malaria (Rusten, 2006).

In various surveys from Africa there has been reported use against wounds, stomach ache strengthening tonic, rheumatism and diarrhoea. This supports our findings (Burkill, 1997).

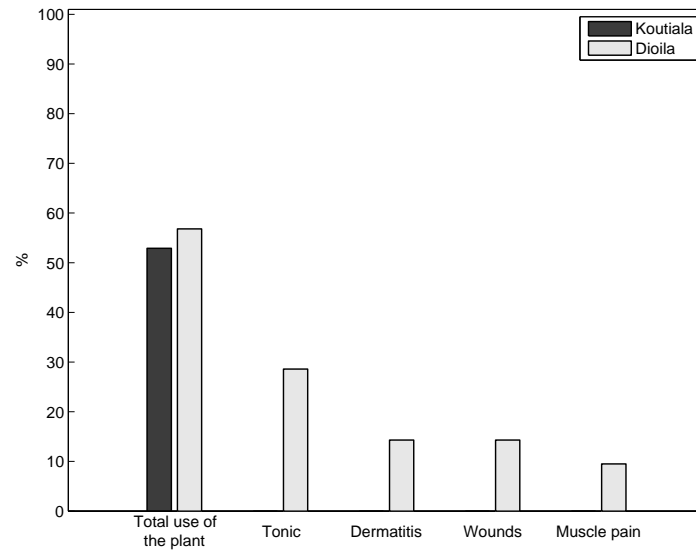


Figure 5.11: The most used indications for *Syzygium guineense*



Figure 5.12: *Syzygium guineense* D.C. (Myrtaceae)

5.6 Explanation of different formulations used in the main table of the results from the survey

Decoction: One mix cold water and plant material, then bring it to boil and let it simmer for 10 minutes. Usually this formulation is drunk.

Infusion: The water is brought to boil, then the plant material is added.

Maceration: One mix cold water and plant material and let it stand for a determined amount of time, often over the night.

Steam bath: One put a hot decoction in a big bowl, often one made of pumpkin. The patient will most of the times inhale the steam.

Fumigation Dried plant material is put on red-hot charcoal. The smoke is inhaled.

Foam: Plants which contain saponins will if shaken with water make a foam.

Wash: The liquid is always a decoction if nothing else is given.

5.7 Explanation of some medical terms

Amenorrhoea: An abnormal absence of menstruation.

Taeniasis: An infection of *Tenia solium* or *Tenia saginata*.

Tonic: A medicinal substance taken to give a feeling of vigour or well-being.

Dysentery: An infection of the intestines resulting in severe diarrhoea with the presence of blood and mucus in the faeces.

Hepatitis: A disease characterised by inflammation of the liver.

Anthelmintic: Used to destroy parasitic worms.

Jaundice: A medical condition with yellowing of the skin or whites of the eyes, arising from excess of the pigment bilirubin and typically caused by obstruction of the bile duct, by liver disease, or by excessive breakdown of red blood cells.

Chapter 6

Konklusjon

Konklusjon sees i forhold til oppgavens hensikt, kapittel 2. Det henvises til figur 4.1 for oversikt over gang i oppgaven.

DEL 1

Isolering

Etter separasjon av nøytrale og sure polysakkarider på ionebytter, var det ikke mulig å separere den sure fraksjonen ytterligere slik som har vært mulig i tidligere analyser av planten (Debes, 1998; Inngjerdingen, 2000, 2007). Dette kan skyldes fytokjemiske forskjeller i plantematerialet. Det meste arbeidet tidligere har blitt utført med materiale hentet fra Diré 1996, men for isolering av mer GOA2 ble det også benyttet materiale fra Lac Horo, Gourma 1998, som er det samme materialet som GA1 og GA2 har blitt isolert fra (Inngjerdingen *et al.*, 2007).

Strukturelle trekk

GA1 ble bestemt til å være en svært heterogen blanding med mange molekylvekter. Etter analyse av monosakkaridsammensetning og bindinger mellom disse, ble det antatt et slektskap med GOA2 (Inngjerdingen, 2007). Selv om pektiner er svært heterogene av natur, kan man finne igjen et samme sett av strukturelle deler. De kjente strukturelle delene som ble funnet i GA1 etter degradering med pektinase etterfulgt av metylering og GC/MS analyse var RG-I, AG-II og homogalakturonan. Alle de nevnte strukturtrekkene har også blitt funnet tidligere for GOA2.

Proteininnhold

Alle fraksjonene inneholdt under 1.3 % protein.

Bioaktivitet av pektinene

In vitro forsøk

Alle fraksjonene ble testet med tanke på antikomplementær effekt, hvor GA1, GA1Fr1, A og B gav mest potent effekt sammenlignet med PMII₅₀. Det er en svak tendens til at pektinene i GA1Fr1 og 2 etter behandling med arabinofuranosidase gir en mindre potent effekt sammenlignet med de samme fraksjonene kun behandlet for annen gang med pektinase. ICH₅₀ verdi for GA1, GA1Fr1 og PMII₅₀ var henholdsvis gjennomsnittlig på 84 µg/ml, 17 µg/ml og 45 µg/ml. Etersom forsøket kun ble utført to ganger, er det høy usikkerhet i verdiene.

GA1, GA2 og GA1Fr1-4 ble testet for potensialet til å kunne aktivere makrofager *in vitro*. GA1Fr1 viste mest potent effekt sammenlignet med lipopolysakkarid (LPS). GA1Fr1 og GA1Fr2 var de eneste prøvene som gav aktivitet i området rundt 10 µg/ml. GOA1 og GOA2 gav ingen respons i denne testen, hvor konsentrasjoner opp mot 500 µg/ml ble testet. Hovedgrunnen for dette er mest sannsynlig at metoden ble forbedret like før prøvene i denne oppgaven ble testet.

In vivo forsøk

Det ble testet om pektiner fra *G. oppositifolius*, isolert etter ionebytter, gav akutt toksisk virkning i forsøksdyr ved oral administrasjon på 200 mg/kg kroppsvekt. 16 forsøksdyr ble benyttet, hvorav 8 fikk pektinekstrakt. Resultatene fra alle prøvene tilsier ingen akutt toksisk effekt av den testede fraksjon.

DEL 2

Etnofarmakologisk studie i Mali

Det ble innhentet informasjon fra i alt 54 healere om fem medisinplanter, *Erythrina senegalensis*, *Opilia celtidifolia*, *Combretum glutinosum*, *Biophytum petersianum* and *Syzygium guineense*. All informasjonen ble grundig gjennomgått og samelignet med tidligere arbeid ut-

ført på de samme plantene i Mali i tidsrommet 2003-2006. Det viste seg å være en relativ god korrelasjon med informasjon som tidligere var funnet. Det ble utarbeidet en detaljert tabell, hvor det ble lagt vekt på formulering, administrasjon og indikasjon. Mange av healere hadde overraskende mye kunnskap om anatomi og patologi med tanke på lite skolegang. Tabellen finnes som vedlegg A. Denne ble skrevet på engelsk for mulig senere publikasjon.

Appendix A

Results of survey in Mali

Erythrina senegalensis

Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila (130 km in air line east of Bamako).

36 of 37 healers used the plant for medicinal purposes.

69 % of the total amount of healers we interviewed comes from this area.

Age range: 38-80 years.

President of the association: Fanto Yaya Diabaté

Indications	Preparation	Use
Malaria – 9 citations (Fidelity level 25 %)	- powder of the root.	Add 1 tsp of the root to porridge and drink 2 times daily every second day in one week.
		When side effect is diarrhoea, use diluted solution of potash to drink.
	Mix powder of the roots with water.	Drink.
	- decoction of the stem bark.	1 handful stem bark in one teapot, 1 tea glass is drunk 3 times daily.
	- maceration of the roots, and roots of <i>Entada africana</i> Guill. & Perr. and roots of <i>Cochlospermum planchonii</i> Hook.F..	Drink 1 teacup daily for 1 week.
	Mix 1 handful trunk bark with 1 L water,	Drink $\frac{1}{2}$ teacup daily for 1 week.

<p>Make root maceration, but remove the upper parts, cut in small pieces and add a few lemons. It is ready for use the next day, and it can be kept for 1 week.</p>	<p>Drink ca 200 ml twice daily, until well.</p>
<p>- with back pain and constipation</p>	<p>- decoction of the roots. Drink 3 handfuls and take a bath once a day for 2 days.</p>
<p>-neurological malaria</p>	<p>Make fumigation of the pounded east and west trunk bark. Inhale.</p>
<p>- trunk bark powder, east, west, north, and south, mix with water.</p>	<p>Wash the baby and give a small quantity to drink, once daily for 3^o-4^o days.</p>
<p>Jaundice - 8 citations (Fidelity level 22.2 %)</p>	<p>- macerate of the root bark and stem bark. Drink one teacup 3 times daily for 1 week.</p>
<p>-east, west, north and south, made with water used for washing millet.</p>	<p>This preparation can be used for children and adults.</p>
<p>-an overnight maceration of one handful root bark powder in 750 ml water.</p>	<p>The next day drink 3 tea glasses (70 ml) daily for one week.</p>
<p>Make decoction of one handful stem bark powder in 1 L water. Boil every day until there is nothing more to extract. If not cured, make a new decoction using new powder.</p>	<p>2 tea glasses (70 ml) daily.</p>

- decoction of the leaves, roots and stem bark.	Drink 1 teacup twice daily for 1 week.
- decoction of the dry roots or a maceration of the fresh roots.	Drink 1 teacup once daily for 1 week
- decoction of the leaves and stem bark.	Drink and take a bath.
Use the plant material until the water takes no colour. If not cured, use new plant material.	
Mix root powder with water.	Drink all.
- decoction of the roots made one day before use.	Drink 3 handfuls.
<hr/>	
Amenorrhoea – 8 citations (Fidelity level 22.2 %)	- fumigation of the root powder of the sexual parts, or mix 3 fingers with the porridge.
	- root bark decoction and use the decoction to make porridge.
	- root decoction and add to soup of red meat. Bleeding will start.
	- decoction of the dry flowers and a dry red nut from <i>Cola nitida</i> L.

- root powder, but remove the upper parts of the root.	1 tsp of the powder is added on the porridge morning and evening.
- powder of the flowers.	1 tsp is added to the porridge once a day
- decoction of the flowers or leaves.	Drink and take a bath morning and evening for 2 days.
- infusion of 1 tsp flower powder and one tea glass of water.	Drink the filtrate once daily for 2 days.
<hr/>	
Tonic - 8 citations (Fidelity level 22.2 %)	- decoction of the leaves or roots or stem bark is used (3 citations)
-will make you stronger	Take a bath once a day for one week.
	- decoction of flowers, roots and stem bark. Take a bath.
	- 3 fingers of the root powder is mixed with water. It is drunk occasionally.
-weak children (0.5-16 years)	- decoction of stem bark powder and use the filtrate to make porridge. Drink the porridge. This will kill bacteria.
-as sexual tonic	-no information
-weakness	- decoction of the trunk bark with water used for washing millet. Drink the porridge.
<hr/>	
GI problems - 7 citations (Fidelity level 19.4 %)	
-abdominal pain	1 tea glass is drunk twice daily

-stomach disorder	- root decoction. - powder of the leaves or trunk bark.	Drink this and it will solve the problem. Mix 3 fingers powder with porridge, once a day.
-constipation	- decoction of the roots and leaves, add 1 L of honey, close for 2-3 days. Make trunk bark maceration.	Drink 1 tea glass (70 ml) when needed. $\frac{1}{2}$ teacup is drunk 3 times per day for 1 week
-internal wounds	Mix the root powder with milk.	Drink once a day. A side effect is vomiting
-diarrhoea	- trunk bark decoction with water used for washing millet.	Drink the decoction.
Infections – 4 citations		
-UTI	- decoction with water used for washing millet and the root - stem bark decoction.	Treat for 2-3 weeks. No information
-especially for children	- decoction of the stem bark.	Drink $\frac{1}{2}$ tea glass twice daily
-brought by the wind (bacterial or fungi)	- macerate of the root bark and stem bark made with water used for washing millet.	Drink one teacup 3 times daily for 1 week
Fewer – 2 citations		
	- decoction of the leaves, roots and stem bark. Make powder of the roots.	Drink and take a bath once daily for 4 days. Drink 3 fingers mixed with water

Anuria – 2 citations	Pound the fresh trunk bark, add water, and wait for a few minutes .	Drink 1 teacup twice a day.
	- maceration of the roots without bark.	Drink $\frac{1}{2}$ -1 tea glass morning and evening for 3 days.
Contraceptive – 2 citations	Collect the seeds.	Eat the seed whole, one seed for one year, 2 seeds for 2 years.
The period will not stop - 2 citations	- decoction.	Drink one part and apply locally the second part
	- powder of the flowers.	Eat 3 fingers daily for 4 days
Pneumonia	- root decoction.	Take a steam bath and wash the chest.
Inflammation	Pound fresh stem bark, or make a dry powder.	Apply fresh stem bark on the inflammation (external) once per day or mix powder with oil.
Snake bite	- root decoction.	Wash the snake bite and take a bath once daily for 3 σ^7 -4 σ days.
Candidiasis	- decoction.	Drink one part and apply locally the second part.
Dizziness	- leaf decoction.	Drink 1 teacup, take a steam bath, and an ordinary bath twice daily.
Secondary sterility	- leaf decoction.	1 tea glass is drunk twice daily.

Dysmenorrhoea	- maceration of the root bark and stem bark made with water used for washing millet,	Drink one teacup 3 times daily for 1 week.
Oedema	- decoction of the roots, or make a powder and mix with water.	Drink and wash your body with the decoction, drink powder with water.
Mouth wounds of babies	- trunk bark powder.	1 tsp is added to the mother's porridge.
Metrorrhagia (irregular period)	- decoction of the leaves or trunk bark.	Drink 1-2 tea glass and take a bath daily for 1 week.
Prevent abortion if the woman has had a miscarriage.	- powder of the roots of <i>E. senegalensis</i> A. Rich, the fruits of <i>Aframomum melegueta</i> K.Schum and salt.	3 fingers powder 3 times daily for 1 week.
Pleurisy	Make foam with water.	The foam is applied externally on the lungs, twice per day for 3 days.
Night-diseases for babies (fewer, insomnia, crying)	Make root maceration.	Drink 1 handful and take a bath.

***Erythrina senegalensis* A. Rich**

Koutiala and nearby area, ca 240 km in air line east of Bamako.

13 of 17 used the plant for medicinal purposes.

31 % of the healers we interviewed come from this area.

Age range: 44-81 years.

President for the association: Moussa Diarra 60 years.

Indications	Preparation	Use
Malaria – 4 citations (Fidelity level 31 %)	- decoction or maceration of the trunk bark. - root decoction.	Drink every morning and evening. Drink a lot every day for 1 week. An effect should come before the end of the week.
	- decoction.	Drink 1 teacup once a day for 3 days. Side effect is diarrhoea.
	- maceration of the leaves or trunk bark.	Drink 1 tea glass for the baby, and 2 tea glasses for the adults.
Jaundice – 4 citations (Fidelity level 31 %)	- maceration of the trunk bark of <i>E. senegalensis</i> A. Rich and the roots from <i>Cochlospermum planchonii</i> L. - trunk bark powder and mix 1 tsp with coffee or make a trunk bark decoction.	Drink 1 teacup. Drink the coffee mixed with powder. Drink 1 teacup of the decoction once per day for 30 days.

- decoction.	Drink 1 teacup once a day for 3 days. Side effect is diarrhoea.
- root maceration.	Drink 1 teacup twice daily.
Pain – 4 citations	Use the decoct for a steam bath, and use
-back pain	the leaves from the decoction for a mas-sage of the back.
-headache	Use once per day, preferably at night.
- fumigation of 3 fingers of the trunk bark powder.	Use once per day, preferably at night.
Take the leaves in cold water.	Use it the same way as a steam bath, but do not heat.
UTI – 3 citations	- trunk bark powder and mix 3 – 4 × 2
(Fidelity level 23 %)	fingers with fish soup. Drink the soup.
- over night maceration of roots made of water from washing millet.	Should be drunk once a day for 1 week
- decoction of the leaves, trunk bark or roots and water from washing millet	Drink 3 tea glasses daily for 4-7 days
GI problems. - 2 citations	
-abdominal pain	Mix 3 fingers powder of the trunk bark with hot water or porridge or make ma- ceration with 3 fingers trunk bark powder. Drink the formulation for choice once daily.
-diarrhoea	- decoction of the trunk bark and roots drink 1 tea glass twice daily for 3 days

Tonic – 2 citations	<ul style="list-style-type: none"> - decoction of the trunk bark, leaves and roots. Especially for lazy children. - root decoction, Especially for weak children. 	<ul style="list-style-type: none"> Drink one handful. No problem to drink a lot.
Epistaxis, nose bleed	<ul style="list-style-type: none"> Heat a piece of pottery with leaves, add water. 	<ul style="list-style-type: none"> Use it as a steam bath once daily for 3 days.
Typhoid fever	<ul style="list-style-type: none"> - decoction or maceration of the trunk bark. 	<ul style="list-style-type: none"> Drink every morning and evening.
Dysmenorrhoea	<ul style="list-style-type: none"> - maceration of the leaves or trunk bark. 	<ul style="list-style-type: none"> Drink 1 tea glass for babies, and 2 tea glasses for adults.
Internal wound	<ul style="list-style-type: none"> - maceration of the leaves or trunk bark. 	<ul style="list-style-type: none"> Drink 1 tea glass for babies and 2 tea glasses for adults.

***Opilia celtidifolia* Endl.**

Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila.

All the healers used the plant for medicinal purposes.

Indications

Appetiser - 21 citations
(Fidelity level 56.8 %)

Preparation

- leaf decoction (3 citations)

- leaf or root decoction.

- decoction of the leaves and the small stems.

- decoction of some leaves in a teacup. Boil with 3 tea glasses of water.

- decoction. The leaves can be used many times, as long as they give a yellow colour to the extract.

- decoction with 1 L water and 1 bundle of the plant.

- decoction.

- decoction of the leaves and small stems.

- decoction

Use

Drink sufficient amounts once a day, maximum for 1 week.

Drink 1 tea glass every day for some days, then continue with 2 tea glasses.

Drink once per day

Drink up to 5 times per day.

Drink 1 tea glass a day for 15 days.

Drink 1 tea glass morning, midday and evening.

Drink 1 tea glass every day for 1 week.

Drink 1 tea glass once a day for 4 days.

- decoction of 1-3 bundles.	Drink 1 tea glass and wash the body once a day for 3 days.
- leaf decoction.	Drink 100 ml once a day.
- leaf decoction.	Wash the body and drink the decoction for 3 days. Start with 3-4 tea glasses a day and increase to maximum 500 ml per day.
- decoction with the leaves and small stems, or a decoction of 3σ ² -4φ bundles in 10 L water.	Wash the body and drink 1-2 tea glasses for 7 days or filter the 10 L and take a bath.
- decoction of the leaves and stems.	Drink 1 tea glass.
- leaf decoction.	Drink the decoction.
- leaf decoction.	Drink and wash the body.
- leaf decoction.	Do not drink too much, 1 tea glass is enough. A common side effect is diarrhoea.
- decoction of 1 bundle and 1 teacup of water.	Drink 1 tea glass. It is toxic.
- leaf or root decoction	Wash the baby and give a handful to drink.
- leaf decoction. (3 citations)	Drink and wash your body, once a day for 7 days. (Can also be used for animals.)
-for children	
Taeniasis - 13 citations	
(Fidelity level 35.1 %)	

- leaf decoction.	Drink 1 tea glass every morning before breakfast for 3 days without eating first.
- decoction of the leaves and the small stems.	Drink 1 tea glass ever day for some days, then continue with 2 tea glasses.
- decoction of some leaves in a teacup with water.	Drink all once per day.
- decoction with 1 L water and 1 bundle of the plant.	Drink 1 tea glass a day for 15 days.
- decoction.	Drink 1 tea glass morning, midday and evening.
- decoction of the leaves and small stems.	Drink 1 tea glass every day for 1 week.
- decoction	Drink 1 tea glass once a day for 4 days.
- leaf decoction.	Drink 100 ml once a day.
-reports of side-effects	Remove the outer part of the roots, cut the roots in small pieces and make a maceration with 3 × 3 fingers in one teacup. Side effect can be vomiting.
	- decoction of 1 bundle and 1 teacup of water. Drink 1 tea glass. It is toxic.

Malaria 12 citations
(Fidelity level 29.7 %)

- leaf decoction. It is finished when it starts boiling. Drink 1 tea glass of the decoction when it is cold morning, midday, evening.

- fine powder of the roots.	Mix the powder with water and drink, or eat the powder plain.
- decoction of the leaves and stems.	Drink 1 tea glass.
- leave decoction.	Drink ca 150 ml once a day for 1 week.
- leaf decoction.	Drink 1 tea glass once a day for 3 days.
- 7 days leaf maceration.	On the 8th day wash the child and give some to drink for 3-4 days
- leaf decoction.	Drink 1 tea glass twice per day for 3-4 days.
- leaf decoction. Add honey (adults).	Drink 1 glass morning and evening for 1 week.
- leaf decoction.	Drink 2-4 handfuls every day until there is nothing more to extract from the plant.
- decoction of the leaves and stem bark.	Drink ca 150 ml and wash the body.
- leaf decoction.	Drink a $\frac{1}{2}$ teacup in the morning before breakfast and not more because of the side effect, vomiting.
-reports of side-effects	Remove the outer part of the roots, cut the roots in small pieces and make a maceration with 3×3 fingers in one teacup. Side effect can be vomiting.

Tonic – 7 citations (Fidelity level 19 %)	- decoction of the leaves and stems.	Wash the body once a day. Do not drink. Use this only for 2 days.
-become well	- leaf decoction. It is finished when it starts boiling.	Drink 1 tea glass of the decoction when it is cold morning, midday, evening.
-Asthenia	- leaf decoction	Wash the body and drink the decoction for 3 days. Start with 3-4 tea glasses a day and increase to maximum 500 ml per day.
-tired and the body is feeling bad.	- decoction.	Wash the body.
-weak person	- leaf powder.	Drink the powder mixed with porridge, or boil and use as you use tea or coffee, every day.
-sexual tonic	- decoction of the leaves and roots.	Drink and wash the body.
-gives strong muscles	No information.	No information.
Jaundice - 4 citations	- leaf decoction.	Do not drink too much, 1 tea glass is enough. A common side effect is diarrhoea.
	- decoction of 1 bundle and 1 teacup of water.	Drink 1 tea glass. It is toxic.

	Remove the outer part of the roots, cut the roots in small pieces and make a maceration with 3 × 3 fingers in one teacup.	Drink a very small quantity. Side effect can be vomiting.
-hepatitis	- leaf decoction.	Wash the body, take a steam bath and drink once a day of 1 week.
Fever – 4 citations, but 3 persons using it.	- leaf decoction.	Wash the body, drink a small quantity, and make a steam bath.
	- leaf decoction	Wash the body and drink the decoction for 3 days. Start with 3-4 tea glasses a day and increase to maximum 500 ml per day.
	- decoction with the leaves and small stems	Wash the body and drink 1-2 tea glasses for 7 days
	- decoction of 3♂-4♀ bundles in 10 L water.	Filter and take a bath.
Wounds – 4 citations		Apply the powder directly or mix the powder with oil and apply.
- new, bleeding	Make a powder of the stem bark.	
- old	Make carbonised roots.	Wash the wound, apply the powder directly.
-gastric ulcer	- decoction.	Drink the filtrate once a day for 5 days.
-small wounds on the body	Make a decoction.	Drink and take a bath.
GI- problems – 3 citations		

-abdominal pain	- leaf or root decoction.	Drink sufficient amounts once a day, maximum for 1 week.
- gas in the intestines	- decoction	Drink 1 tea glass once a day for 4 days.
Prevent epidemic diseases	- decoction of the leaves.	Drink 1 tea glass daily for 1 week.
3 - citations	- leaf decoction.	Give to the whole family in November.
	- leaf decoction.	Wash the body, drink a small quantity, and make a steam bath.
	- leaf decoction.	Wash the body.
Pain – 3 citations	- leaf decoction.	Wash the body and drink 1 tea glass
-back pain, headache and tired		
-chest pain	- leaf decoction.	Wash the body, take a steam bath and drink 1 tea glass for 3 ^o -4 ^o days.
-muscle pain	- decoction of the stems and leaves.	Wash the body, take a steam bath and drink as much as you can.
Psychological problems:		
-bad mood.	Collect the plant Monday and Tuesday.	No information.
-psychoses	- decoction of leaves of <i>O. celtidifolia</i>	Drink the decoction.
	Encl. the roots from <i>Aloe buettneri</i> Berger	
	and the leaves from <i>Landolphia heudelotii</i>	
	A.DC.	

Epilepsy	- decoction of the leaves and roots.	Wash your body and take a steam bath once a day.
Oedema	- leaf decoction.	Wash the body and drink once a day. Do not eat goat meat during treatment.
Malnutrition	- decoction.	The baby has to drink 1 handful. (The hair looks different)
When the baby is afraid during the night	- decoction.	Wash the baby, it will give a tranquillising effect.
Antiemetic	- leaf decoction. It is finished when it starts boiling.	Drink 1 tea glass of the decoction when it is cold morning, midday, evening.
Dysmenorrhoea	- leaf decoction, and use the decoction for making chicken soup.	Drink the soup. Side effect could be diarrhoea.
Vulvovaginal infection for children	- decoction, cool it down. <i>Landolphia heudelotii</i> A.DC.	Let the child sit in the solution. Shake some of it until it makes a foam, wash the baby and give 2 handfuls to drink.
Onchocerciasis	- decoction of leaves of <i>O. celtdiifolia</i> Endl. the roots from <i>Aloe buettneri</i> Berger. and the leaves from <i>Landolphia heudelotii</i> A.DC..	Drink the decoction.
Bad eyesight	- decoction.	Wash the eyes.

Opilia celtidifolia Endl.

Field work in Koutiala and nearby area.

14 of 17 used the plant for medicinal purposes.

Indications	Preparation	Use
Malaria – 9 citations (Fidelity level: 64 %)	- decoction of <i>O. celtidifolia</i> Endl. <i>Tamarindus indica</i> L. and lemons. - decoction of the roots, add lemon or the fruit of <i>Tamarindus indica</i> L. - root or leaf decoction.	Drink the acidic solution. Drink ca 100 ml once a day. Wash the body, and drink 1 tea glass every morning before breakfast for 3 days.
	- decoction of the leaves from <i>Heeria insignis</i> Kuntze. and <i>O. celtidifolia</i> Endl. - leaf decoction. - decoction of the roots or leaves. - leaf decoction.	Wash the body, and drink 1 tea glass every day. Drink 1 teacup twice a day. Wash the body and drink 1 handful. Drink 2 tea glasses or 3 handful, once a day for 1 week.
	- decoction of the leaves and stems.	Drink $\frac{1}{2}$ tea glass. A side effect is diarrhoea. Be careful. The plant is toxic.

- powder of the leaves and stems of 6 years > , drink 1 tablespoon a day
- O. celtdifolia* Endl., salt, *Afromomum* 6-15 years, drink 1 tea glass a day.
- melequeta* K.Schum and the fruit of *Xylopiya aethiopica* A.Rich. More than 15 years, 3 tea glasses a day. A side effect is diarrhoea.
-
- decoction of the stem bark and the leaves. Drink 2 tea glasses morning and evening.
- decoction of 3σ-4φ bundles of *O. senegalensis*, *Cassia nigricans* Vahl. and *Tamarindus indica* L. Drink the decoction.
- powder of the leaves and stem bark. Eat first a banana or papaya, then mix 1 tsp of powder with water and drink all, morning and evening for 2 days.
- decoction from powder. Eat first 1 banana, then drink 1 tea glass daily.
- leaf powder. Mix $\frac{1}{2}$ tsp of the powder with milk. Drink this before breakfast.
- powder of the roots and lemon zest. 1 tsp of powder is mix with porridge.
- (50/50)

Taeniasis – 8 citations
(Fidelity level: 57 %)

	- powder of the leaves and stems of <i>O. celtidifolia</i> Endl, salt, <i>Afromomum melegueta</i> K.Schum and the fruit of <i>Xylopiia aethiopica</i> A.Rich.	6 years > , drink 1 tablespoon a day 6-15 years, drink 1 tea glass a day. More than 15 years, 3 tea glasses a day. A side effect is diarrhoea.
Onchocerciasis – 3 citations (Fidelity level: 21 %)	- powder of the roots from <i>O. celtidifolia</i> Endl, millet, mango and garlic. - powder of salt and <i>Capsicum frutescens</i> and make a decoction of 2-4 bundles of <i>O. celtidifolia</i> - powder of the leaves and stems of <i>O. celtidifolia</i> Endl, salt, <i>Afromomum melegueta</i> K.Schum and the fruit of <i>Xylopiia aethiopica</i> A.Rich.	Eat 3-4 2 fingers of the powder every day. Diarrhoea is a side effect. Take the powder on the tongue. Make a stem bath of the head, wash the body and drink 1 tea glass twice a day for 15 days. 6 years > , drink 1 tablespoon a day 6-15 years, drink 1 tea glass a day. More than 15 years, 3 tea glasses a day. A side effect is diarrhoea.
Appetiser – 2 citations	- decoction of the stem bark and the leaves. - root or leaf decoction.	Drink 2 tea glasses morning and evening.
Abdominal pain and constipation	- decoction of the leaves and stems.	Drink $\frac{1}{2}$ tea glass. A side effect is diarrhoea. Be careful, the plant is toxic.
Sterility	- powder of the roots and bark.	2 × 2 fingers in porridge once a day for 24 days.
UTI	- powder of the roots and lemon zest. (50/50)	1 tsp of powder is mix with porridge.

Intoxication	- leaf decoction.	Mix one part with oil and eggs, drink enough to vomit and wash the body with the other part. A side effect is diarrhoea.
Chest pain	- decoction of the leaves and stems.	Drink $\frac{1}{2}$ tea glass. A side effect is diarrhoea. Be careful. The plant is toxic.
Asthenia	- powder of the leaves and stems of <i>O. celtidifolia</i> Endl. salt, <i>Afromomum melegueta</i> K.Schum and the fruit of <i>Xylopiya aethiopica</i> A.Rich.	6 years > , drink 1 tablespoon a day. 6-15 years, drink 1 tea glass a day. More than 15 years, 3 tea glasses a day. A side effect is diarrhoea.

***Combretum glutinosum* Perr.**

Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila.

36 of 37 healers used the plant for medicinal purposes.

Indications	Preparation	Use
Malaria – 9 citations (Fidelity level: 25 %)	- decoction. - decoction of the powder of the leaves. - leaf decoction. - leaf decoction, put this on the fruits of <i>Tamarindus indica</i> L.. - leaf decoction - powder, or /and make a decoction. - leaf decoction. - leaf powder the same day. - stem bark powder.	Wash the baby, take a steam bath and drink. Wash the body. Wash the body, and drink a small quantity every day for 1 month. Drink the solution. Drink and make a steam bath of the bark. Mix the powder with water and drink or /and wash the body and drink 1 tea glass of the decoction twice a day. Wash the body, and drink 1 tea glass 3 times a day for 1 week. Eat 3 fingers of the powder directly or with water. Mix 1 tsp with porridge once a day until well.

Neurological type	- decoction of the powder of the leaves.	Wash the body.
Tonic – 9 persons (Fidelity level: 25 %)	- decoction.	Wash the body to gain energy.
	- decoction with 1 handful leaves and I tea-cup water.	Drink the filtrate.
-for children	- powder of <i>Loranthus sp L.</i>	Mix 3 fingers with the water from washing millet, use this to wash the baby. It will make it stronger.
	- leaf decoction.	Wash the baby to make it strong.
-to be strong	- leaf decoction.	Wash the body.
	- decoction of the leaves and small branches.	Wash the body several times. It can also be drunk.
-when the child is not walking when 2-3 years	- decoction.	Wash the body, the child will have the energy for walking.
	- leaf decoction, and mix with shea butter.	Wash the body once a day for 1 week.
-fatigue in the body	- leaf decoction.	Wash the body, take a steam bath and drink a lot.
-Asthenia		
	- decoction of the small leaves.	Drink and wash the body.
GI-problems – 7 citations (Fidelity level: 19 %)		
	- decoction.	Drink $\frac{1}{2}$ L morning and evening.
-gas in the abdomen		

-constipation	- leaf decoction. (2 citations)	Drink the decoction.
-stomach ache	- leaf decoction, put this on the fruits of <i>Tamarindus indica</i> L.. - stem bark powder.	Drink the solution. Mix 1 tsp with porridge once a day until well.
-diarrhoea	- powder of young leaves. - maceration of the young leaves, or chew them.	Mix the powder with water and drink.
Wound healing – 5 citations (Fidelity level: 14 %)	The leaves are used.	No information.
-external	- powder. - powder of the roots.	Wash the wound and apply the powder directly. If it is old; wash the wound and apply the powder. Small new wound; mix the powder with oil, apply.
-internal	- decoction of <i>Loranthus sp</i> L. - powder of the stem bark or roots.	Drink 1 teacup once a day for 1 week. Eat 1 tsp every day.
Chest pain – 4 citations	- leaf decoction. - decoction.	Wash the body, take a steam bath of the chest and drink. Wash the baby, take a steam bath and drink.

- decoction of 3σ-4φbundles and a fumigation.	Drink and use the boiled bundles for a massage. Make a fumigation of the chest.
- decoction of 3σ-4φbundles	Do this for 3σ-4φdays
- decoction of 3σ-4φbundles	Drink and use the boiled bundles for a massage.
<hr/>	
Fever – 4 citations	Drink once per day for 1 week. Effect after 4 days.
- decoction of <i>Loranthus sp</i> L. from the <i>C. glutinosum</i> , large leaves.	Wash the body, take a steam bath and drink.
- decoction of 3σ-4φ bundles and let it boil until the leaves changes colour.	Drink and wash the body.
- decoction.	Wash the body
- powder of the roots of <i>C. glutinosum</i> , <i>Afromomum melegueta</i> K.Schum and salt.	Eat the powder with water.
- decoction of 3 fingers of the powdered <i>Loranthus sp</i> L. and a decoction of the small leaves.	Drink the <i>Loranthus sp</i> L. morning and evening, and wash the body with the decoction of the small leaves. It will kill all the micro organisms in the body.
- leaf decoction.	Make a steam bath and inhale the steam 3 times per day. It has antibacterial effect.
-against weakness caused by infection	
-in the trough	

-voice problems	- root decoction.	Drink the decoction and use the root as a tooth brush.
Dysentery – 3 citations	- decoction of the leaves of <i>C. glutinosum</i> and <i>Anogeissus leiocarpus</i> DC. Collect young leaves. - powder of the stem bark.	Drink 1 teacup. Chew young leaves, drink the liquid. Eat 1 tsp every day for 3 days.
Lumbago – 2 citations	- decoction of the leaf powder, 3 × 3 fingers in 1 teacup. - decoction.	Drink the filtrate. Drink the filtrate.
Muscle pain - 2 citations	- decoction of 3 bundles. - decoction of the roots or leaves.	Wash and massage the body. Wash and massage the body.
Arthritis - 2 citations	- decoction of <i>Loranthus sp L</i> - decoction with the leaves, salt and shea butter	Wash the body and drink. Wash and massage the body once a day for 3-4 days.
Jaundice – 2 citations	- leaf decoction.	Wash the body and drink a small quantity daily for 1 month.
-hepatitis	- leaf decoction.	Wash the body and drink 1 tea glass 3 times a day for 1 week.
Amenorrhoea	- powder of the young leaves, and make a decoction of 3 fingers of the powder.	Drink the decoction.

	- stem bark powder, and mix with hot water.	Drink once a day for 4 days.
Child crying for unknown reason	- decoction.	Wash the baby, and give a small quantity to drink. Tranquillising effect.
Unknown diseases	- decoction of the leaves and bark.	Wash the body.
Cold extremities	- decoction.	Wash the body 3 σ -4 ϕ days.
Head ache	- decoction.	Wash the head and drink once per day.
Back pain	- decoction.	Make a hole in the ground, put the content in the hole and lay on top.
Tooth pain	- root decoction.	Wash the teeth, and use the root as a tooth brush.
Hypertension	- decoction of 1 bundle of the leaves.	Drink 2 tea glasses per day.
Schistosomiasis	- leaf powder or a decoction.	Mix 3 fingers of the powder in porridge or drink the decoction. Cholagogue effect.
Prevent diseases	- leaf decoction.	Wash the body.
Psychosis	- decoction with equal amounts of leaves from <i>C. glutinosum</i> Perr., leaves from <i>Ficus vteophylla</i> Miq. and <i>Cordia myxa</i> L..	Drink and wash the body. This must happen at night, not during the day.
Otitis	Heat young leaves.	Squeeze the leaves, and drip some of the liquid in the ears.

When the menstrual bleeding do not stop	- leaf decoction.	Take a steam bath of the sexual parts.
Aphrodisiac	- decoction.	Drink 1 tea glass every night.
Flue	- leaf decoction.	Wash the body, and drink once a day for 1 week. No problem to drink a lot.
Anaemia in babies	- decoction of <i>Loranthus sp L.</i>	Wash the baby morning end evening for 1 week.

***Combretum glutinosum* Perr.**

Field work in Koutiala.

15 of 17 healers used the plant for medicinal purposes.

Indications	Preparation	Use
Jaundice – 5 citations (Fidelity level: 33 %)	- decoction of the roots of <i>C. glutinosum</i> Perr., <i>Cochlospermum tinctorium</i> and <i>Entada africana</i> Guill. & Perr.	Wash the body once a day and drink 1 tea glass morning, midday and evening.
	- leaf decoction, and add the fruit of <i>Tamarindus indica</i> L. or lemons.	Drink $\frac{1}{2}$ tea glass morning, midday and evening and 1-3 tea glass (child-adult) before bedtime. Do this for 3 days. Effect after 1 day.
	- decoction of <i>C. glutinosum</i> Perr. and <i>Entada africana</i> Guill. & Perr.	Drink 2 tea glasses before eating , morning, midday, evening, for 1 week.
	- leaf decoction.	Drink a lot for 1 week.
GI problems – 5 citations (Fidelity level: 33 %)	- leaf decoction, and add <i>Tamarindus indica</i> L..	No information.
-simplify digestion	- leaf decoction or a stem bark powder	Drink 1 teacup of the decoction, or eat 1 tsp of the powder mixed with water every morning.
-haemorrhoids		

-gastric ulcer	- root bark powder.	Mix 3σ-4φ×2 fingers with water and drink 3 times a day.
-stomach ache	- decoction of the roots of <i>C. glutinosum</i> and <i>Ximения americana</i> L.	Mix 1 tsp with water and drink.
-with malaria	- powder leaves from <i>C. glutinosum</i> , <i>Zingiber officinale</i> Rosc. and salt.	Eat 3 fingers 3 times a day.
	- decoction of the leaves of <i>C. glutinosum</i> and <i>Guiera senegalensis</i> Lam..	Drink the decoction.
Wounds – 3 citations	- powder.	Eat and apply the powder directly on the wound.
-internal	- leaf decoction or a stem bark powder	Drink 1 teacup of the decoction, or eat 1 tsp of the powder mixed with water every morning.
	- leaf decoction of leaf powder.	Drink.
Head ache – 3 citations	- leaf decoction.	Take a steam bath.
	- leaf decoction.	Wash the head.
-Migraine	- leaf decoction or a powder.	Wash the head or make fumigation.
Aphrodisiac – 2 citations	- leaf powder.	Mix 3 × 3 fingers with water.
	- powder of carbonised roots of <i>C. glutinosum</i> Perr., salt and the fruits of <i>Aframomum melegueta</i> K.Schum.	Mix 3 fingers with soup or eat directly.

Tonic	- powder of carbonised roots of <i>C. glutinosum</i> Perr., salt and the fruits of <i>Aframomum melegueta</i> K.Schum.	Mix 3 fingers with soup or eat directly.
Appetiser	- leaf decoction.	Drink 3 handfuls daily for adults, and 1 tsp for children.
Hypertension	- root powder.	Mix 3 σ^7 -4 ϕ \times 2 fingers with water and drink 3 times a day.
Hypotension	- leaf powder.	Mix 3 σ^7 -4 ϕ \times 2 fingers with water and drink 3 times a day.
Dizziness	- leaf decoction.	Drink 1 tea glass morning and evening.
Infection	- leaf powder by pounding the leaves before and after drying. Make an antiseptic	Mix 1 tsp with porridge or coffee twice a day, and wash locally with the antiseptic
-UTI/vulvovaginitis	of 2 tablespoons powder and 4 L water.	3 times a day. Do both for 1 week.
Prevent abortion	- decoction.	Drink and wash the body.
Asthma	- decoction of the roots and leaves.	Wash the body once a day for 1 week and drink 1 teacup 3 times a day for 1 week.
Tranquilliser	- decoction of the leaves.	Wash the body once a day, day of night.
Give affection between people	- decoction.	Drink and wash the body.

***Biophytum petersianum* Klotzsch.**

Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila.

32 of 37 healers used the plant for medicinal purposes and all used the aerial part of the plant.

Indications	Preparation	Use
Neurological malaria - 13 citations (Fidelity level: 41 %)	- powder and mix with water.	First wash the head, then the rest of the body. The convulsions will stop.
- decoction.	Put the whole plant in water.	Wash the body and drink morning and evening until cured.
Urgent treatment: Mix the powder with water in your hand. If the child is in a coma put the child on the lap and make fumigation underneath. The child might wake up.	Urgent treatment: Apply on the head on the baby when it is having convulsions. After convulsion, if not in a coma, give the powder mixed with water to the baby.	Wash the baby and give some to drink.
- decoction with addition of <i>Vitex doniana</i> Sweet. (1:1). - very fine powder.	The healer decides the dose when he sees the size and age of the child.	The healer decides the dose when he sees the size and age of the child.
Put some in the nose, some on the abdomen and some on the head. Massage the whole body.		Wash the body and drink.

- maceration of the fine powder.	Put some of the filtrate in the nose and wash the body.
- powder with addition of <i>Heeria insignis</i> Kuntze. Make fumigation, then mix some of the powder with oil and then heat water with a small amount powder.	Apply the oily powder on the body and give some of the decoct to drink.
Make fumigation and mix some of the powder with oil.	Apply on the whole body.
- decoction.	Wash the body.
First, carbonise the plant and apply on the body, secondly wash the baby with a maceration and then make a fumigation.	
- decoction.	Wash the baby on the 3rd day after birth.
- decoction.	Wash the pregnant women, the child will not have neurological malaria.
Haemorrhoids – 6 citations (Fidelity level: 19 %)	
Carbonise the plant and mix with oil. (2 citations)	Apply directly.
Carbonise the plant in addition with head of turtle.	Apply directly.
Take the fresh plant, heat it up.	Apply directly.
- decoction.	Drink and use as a enema.

	- powder and a decoction.	Drink 1 tea glass and apply the powder directly until well. This takes a long time.
Breecb birth – 4 citations	- powder. Mix the powder with oil. - powder. Carbonise the plant and mix with oil.	Eat 1 tsp. Apply on the abdomen and down on the woman. Apply on the abdomen and down on the woman. Apply on the abdomen and down on the woman.
Sexual asthenia – 3 citations	- powder. -fumigation of the powder. - powder and add some salt, also make fumigation.	Eat the powder on boiled meat. Once a day. Eat the powder and make the fumigation for 1 week.
Otitis – 3 citations	- decoction. - maceration of fresh or dry plant. - decoction or maceration of the fresh or dry plant.	Drip some drops in the ear for some days, until cured. Drip some drops in the ear. Drip some drops in the ear for 1 week.
When the child is not walking - 2 citations	- powder and mix it with oil. - decoction.	Apply on the body. The child will stand up and walk. Apply on the legs.

Schistosomiasis - 2 citations	- decoction with 1 handful of the plant and 1 teacup of water. - decoction with 1 handful of the plant in 1 teapot.	Drink 1 tea glass once a day. Drink all once a day for 1 week.
Tranquilliser - 2 citations -when the child is afraid	- decoction of $\frac{1}{2}$ bundle and 1 teacup water. - decoction.	Drink all. Wash the child twice a day for 3-4 days.
Abdominal pain	- powder.	Mix 3 fingers with 1 tea glass of water and drink.
When the cranium is not growing together	Carbonise the plant.	Apply on the roof of the mouth morning and evening.
Head ache	- fumigation.	
Sterility	- powder.	Mix the powder with water and drink.
Epilepsy	First, carbonise the plant and apply on the body, secondly wash the body with a maceration, then make a fumigation.	
Bad eyesight	- decoction.	Wash the eyes.
Bronchitis	- powder.	Eat 2 fingers straight and mix some with oil and put in the nose at night.

Biophytum petersianum

Field work in Koutiala.

13 of 17 healers used the plant for medicinal purposes, and all used the aerial part of the plant.

Indications	Preparation	Use
Neurological malaria – 4 citations (Fidelity level: 31 %)	Mix powder of the plant with powder of the stem bark, east and west, of the palm tree and oil. - decoction with addition of <i>Scoparia dulcis</i> L. and make a fumigation.	Apply on the whole body. Wash the body, give a small quantity to drink and make a fumigation once a day.
Wounds – 2 citations	First make a fumigation of the powder, then mix the powder with pot ache, then mix some of the powder with the juice from 2 lemons. - decoction.	Apply the basic liquid on the whole body and then give the acidic liquid to drink. Wash the baby, and give a lot to drink.
-internal	- powder.	Eat the powder and apply directly on the wound.
-gastric ulcer	- powder with addition of <i>Piliostigma reticulatum</i> DC.	Mix 1 tsp with porridge morning and evening. Eat 3 × 3 fingers for 1 week.

Amenorrhoea - 2 citations	- decoction with the addition of <i>Khaya senegalensis</i> A. Juss. - decoction.	Drink 1 tea glass. The bleeding will start the same day as this is drunk. Wash the sexual parts.
Menstrual bleeding will not stop - 2 citations	- powder with the addition of <i>Piliostigma thonnigii</i> Milne-Redh. - decoction.	Mix 5 fingers with milk. The bleeding will stop. Drink 2 tea glasses daily.
Meningitis	- decoction.	Drip 2 drops in the nose morning, and 2 drops in the ear every night.
Convulsion	- decoction.	Drip 2 drops in the nose morning, and 2 drops in the ear every night.
Haemorrhoids	- powder with addition of mushroom (1:1).	Apply directly.
Unknown diseases	- fumigation of the powdered plant.	
Dysmenorrhoea	- decoction.	Drink 2 tea glasses morning and evening.
Sterility	- decoction with addition of the leaves of <i>Guiera senegalensis</i> Lam. and lemon or the fruits of <i>Tamarindus indica</i> L..	Drink 1 tea glass morning, midday, evening and 2 tea glasses before bedtime.
Breech birth	- decoction.	Drink a small quantity. (Not much)

Syzygium guineense DC

Field work in Dioila, Beleco, N'cadougoutiguila.

21 of 37 healers used the plant for medicinal purposes.

Indications	Preparation	Use
Tonic – 6 citations (Fidelity level: 26 %)	- decoction of leaves.	Wash the body.
-tired	- decoction of the leaves and stem.	Drink 2 handfuls and wash the body frequently to keep healthy.
-tired, weak, lazy	- decoction. (3 citations)	Wash the body and drink 1 teacup.
Dermatitis – 3 citations	- decoction of the leaves and small stems.	Wash the body.
	If the problem is on the body: Make a decoction of the young leaves. If the problem is on the scalp: Make a traditional soap with the powder.	Wash the body for 1 week with the decoction. Wash the scalp with the soap.
-small wounds/blisters	Mix the powder with oil.	Apply on the body.
	- leaf decoction.	Wash the skin.
Muscle pain – 3 citations	- decoction. (2 citations)	Wash the body and drink.
	- decoction of leaves and small stems.	Wash the body and make a stem bath.
Malaria – 2 citations	- decoction of 1 bundle.	Drink.
	- leaf decoction.	Drink 1 teacup for a few days.
Fever – 2 citations	- leaf decoction.	Drink.

- decoction.	Wash the body, drink and have a massage with decoction mixed with shea butter.
Hypotension and dizziness – 2 citations	Wash the body and drink.
- decoction with 3σ ⁷ -4φ bundles, fresh or dry. Cover the leaves with water.	
- decoction.	Take a steam bath of the head.
Haemorrhoids – 2 citations	Use the filtrate as an enema.
Mix leaves with water and <i>Zingiber officinale</i> Rosc. and add water.	
-in the urine and anal canal for woman	The woman sits down in the lukewarm decoct for a few minutes every day.
Arthritis – 2 citations	Drink and wash once a day for 30 days.
- decoction of the stem and leaves.	Wash the body and drink.
- decoction.	
Infectious diarrhoea	Eat 3 fingers
Insomnia	Wash the body and drink.
Prophylactic against diseases	Drink.
Hepatitis	Wash the body and drink 2 tea glasses every morning for 1 week.
Very ill persons who can not speak	Wash the body and drink.
Syphilis (wounds on the placenta)	Drink and wash the body. The baby should also be treated the same way.

Impetigo	Carbonise 1 part of the trunk bark, and make a powder of the second.	Apply the carbonised part directly, and mix 3 tsp of the second part in the porridge.
Infection	- root decoction.	Mix 3 tsp in the porridge. A side effect is diarrhoea in high doses.
Internal wounds	- leaf decoction.	Drink ca 200 ml every day.

***Syzygium guineense* DC.**

Field work in Koutiala.

9 of 17 healers used the plant for medicinal purposes.

Indications	Preparation	Use
Menstrual bleeding will not stop	- powder of the leaves of <i>S. guineense</i> DC. and the stem bark from <i>Butyrospermum parkii</i> Kotschy.	3 × 3 fingers in the porridge for 4 days.
Malaria	- leaf decoction.	Drink 1 tea glass or 2 handfuls once a day.
Intoxication	- soup of the fruits and fish.	Eat the soup.
Cough	- decoction of the leaves of <i>S. guineense</i> DC. and <i>Cola cordifolia</i> R Br..	Drink 1 teacup and wash the body for 4 days.
Appetiser	- decoction.	Drink 2 tea glasses for 3 days.
Dehydration	- decoction.	Drink 2 tea glasses 2 times a day.
Constipation	- leaf decoction, and add lemon or tamarind.	Drink 1 tea glass once a day. 1 dose is enough.
Oedema with inflammation of the skin	- decoction of the leaves and small stems.	Make a steam bath and use the bundles for a massage once a day for 3 days.
Prostate	- leaf powder and add <i>Cassia italica</i> (Mill.) Spreng.	Eat 3 fingers a day.

Appendix B

Sub- acute toxicity test

(Joshi *et al.*, 2007)

This appendix is only slightly edited from the original text written by Dr. Ababacar Maiga, DMT, Bamako, Mali.

B.1 Chemical tested

2 g polysaccharides from *Glinus oppositifolius* was provided by the University of Oslo, Department of Pharmacognosy. The material was white.

B.2 Animals

The animals (NMRI mice) obtained from the CNAM (Centre National de Lutte contre la Maladie) were housed in PVC cage (polyvinyl chloride) and bred in our laboratory were they were acclimatised. They were fed at *libitum*(free-feeding) and expose to 12 hours light and 12 hours darkness. The mice of either sex, weighing 30- 40 g, were randomly distributed in 2 groups of 8 (4 male and 4 female). All animals were fasted overnight before dosing. Group I receive distillate water for 21 days and group II received the polysaccharide of *G. oppositifolius* (GP) in distillate water at the dose of 200 mg/kg weigh orally once daily for 21 days. All animals were observed immediately after dosing and then 1 hour, 8hours, and 3 times a day from day 1 to day 21. Body weigh, food and water intake were monitored. The animals were scarified on day 22. Blood samples were collected for haematological parameter

	Day 1	Day 7	Day14	Day 21
Control female	34.97 \pm 1	35.64 \pm 1.9	35.84 \pm 2	35.8 \pm 1.3
Treated male	33.98 \pm 1.6	35.26 \pm 1.9	34.45 \pm 2.4	34.21 \pm 2.1
Treated female	37.09 \pm 1.2	38.29 \pm 2.5	40.13 \pm 2.6	39.86 \pm 2.2
Treated male	39.13 \pm 0.8	39.2 \pm 1.74	39.91 \pm 1.5	40.57 \pm 1.4

Table B.1: Body weight of mice after 21 days oral administration of *G. oppositifolius* polysaccharides. Data are mean of 4 animals

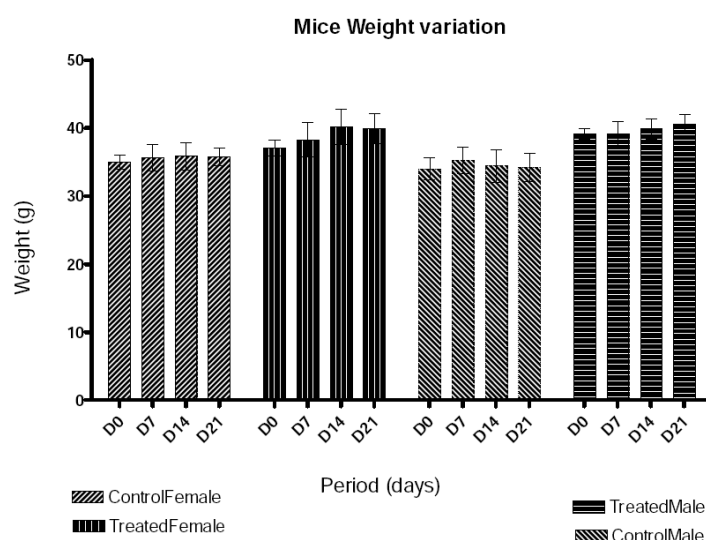


Figure B.1: Effect of GP oral administration on body weight increment in 21 days.

like Hb, red blood cells (RBC) count, erythrocyte sedimentation rate, differential count [neutrophils (N), lymphocytes (L), eosinophils (E), basophils (B), and biochemical parameters like serum glutamate oxalo acetate transaminase (SGOT) and serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT), serum alkaline phosphatase serum creatinine. Statistical analysis: Data were presented as mean \pm SE. Results were given as mean \pm standard deviation. Statistical analysis were performed by one way ANOVA for comparing the weight and the *t*-test for comparing organs between treated animals and controls using GraphPad prism (version 4).

B.3 Results

The results of the test are showed in the tables and figures.

Groups	Organs weight (g /100)			
	Liver	Kidney	Heart	Spleen
I Control	4.84 + 0.24 (N=4)	0.51+0.13 (N=4)	0.54 +0.06 (N=4)	0.34+ 0.03
II Treated	5.12+ 0.67 (N=5)	0.6 +0.06 (N=5)	0.52+0.10 (N=5)	0.48+0.14 (N=5)

Table B.2: Effect of 21 days of oral administration of GP on organ weights in mice. *t*-test compare the means between treated and controls. The differences are not significant.

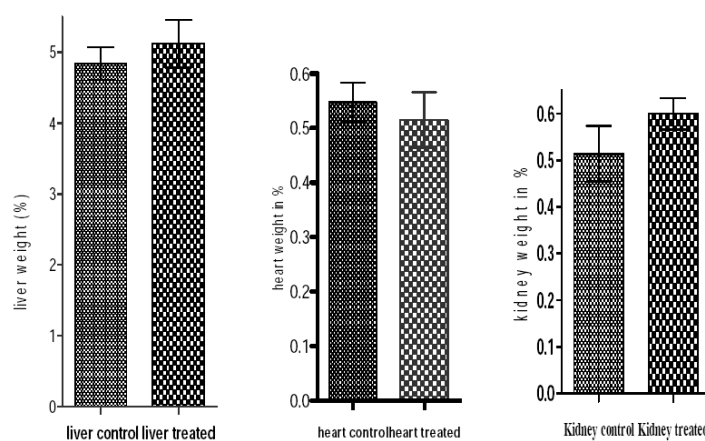


Figure B.2: Effect of 21 days oral administration of *Glinus* polysaccharide on organs weight.

Groups	SGOT (U)	SGPT (U)	ALP (U)
I Control	256 (25-100)	23 (64-180)	149 (20-55) male (45-85) female
II Treated	165	24	148

Table B.3: Effect of 21 days oral administration of GP on hepatic function in mice. SGOT: Serum glutamate oxalo acetate transaminase, SGPT: Serum glutamate pyrivate transaminase, ALP: alkaline phosphatase. The values in bracket are normal values for 18-20 weeks old B6C3 F mice (from Levine B S in Derelanko and Hollinger's Hand Book of toxicology, second edition, CRC press 2002).

Groups	Blood urea mmol	Serum creatinine mmol
I Control	4.41	54.47
II Treated	6.77	62.44

Table B.4: Effect of 21 days oral administration of GP on kidney function in mice.

	Control F	Control M	Treated F	Treated M
W1	1.43	4.29	4.29	4.29
W2	5.52	5.63	4.74	5.79

Table B.5: Food intake in g per day and per mouse.

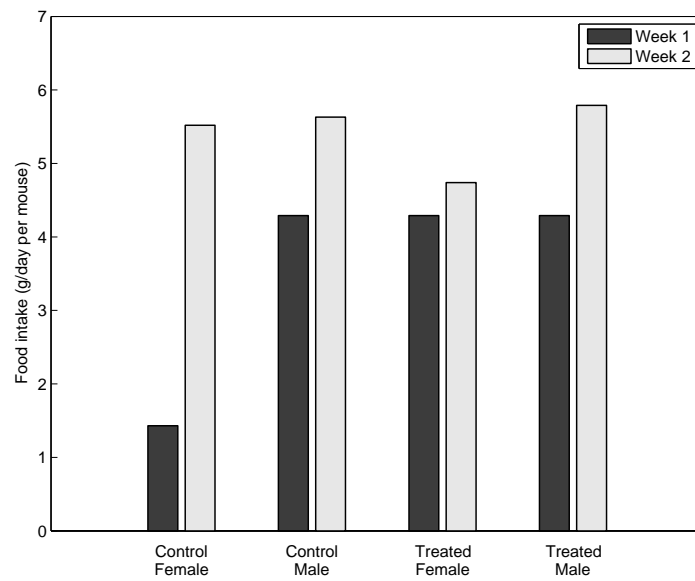


Figure B.3: Effect of GP oral administration on food intake. Increased food intake of food in week 2 compared to week 1.

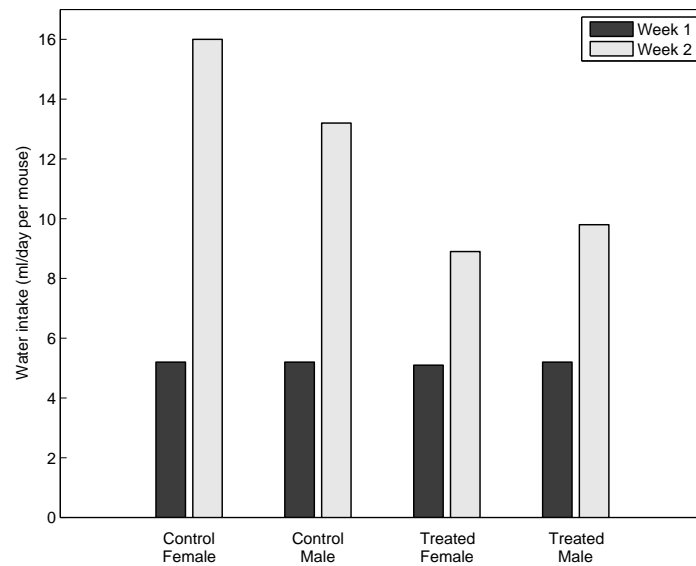


Figure B.4: Effect of GP oral administration on water intake. Increased water intake in all the groups in week 2 compared to week 1.

Bibliography

- AMERSHAMBIOSCIENCES 2004a Gel filtration. http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks, 24.09 2007.
- AMERSHAMBIOSCIENCES 2004b Ion exchange chromatography . http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks, 24.09 2007.
- AMERSHAMBIOSCIENCES 2004c Ion exchange chromatography. Appendix 3: Colum packing and preparation . http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks, 24.09 2007.
- BIO-RAD 2007 Bio-Gel P Polyacrylamide Gels. <http://www.bio-rad.com>, 09.10 2007.
- BRUMMER, Y. & CUI, S. W. 2005 Understanding Carbohydrate Analysis. In *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications* (ed. S. W. Cui), pp. 67–103. Taylor & Francis.
- BURKILL, H. M. 1997 *The useful plants of West Tropical Africa*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- CHAKRABARTI, P. & BARUA, A. K. 1964 Chemical investigation of *Mollugo spergula*. *Indian Journal of Chemistry* **2** (8), 339–40.
- CHAMBERS, R. E. & CLAMP, J. R. 1971 Assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal* **125** (4), 1009–18.
- CIUCANU, I. & KEREK, F. 1984 A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **131** (2), 209–17.

- DEBES, S. C. 1998 En medisiplante fra Mali, *Glinus oppositifolius*: Polysakkaridene; struktur og biologisk aktivitet. Etnofarmakologiske undersøkelser. Master's thesis, University of Oslo, Norway.
- DIALLO, D. 2000 Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinus oppositifolius*, *Diospyros abussinica*, *Entada africana*, *Trichilia emetica*. PhD thesis, University of Lausanne, Switzerland.
- DIALLO, D., MARSTON, A., TERREAUX, C., TOURÉ, Y., PAULSEN, B. S. & HOSTETTMANN, K. 2001 Screening of Malian medicinal plants for antifungal, larvicidal, molluscicidal, antioxidant and radical scavenging activities. *Phytotherapy research* **15** (5), 401–406.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A. & SMITH, F. 1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350–6.
- eFLORAS 2007 Flora of North America. <http://www.efloras.org>, 03.10.2007.
- FOLIN, O. & CIOCALTEU, V. 1927 Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *Journal of Biological Chemistry* **73**, 627–50.
- GE-HEALTHCARE 2007 PD-10 desalting columns. <http://www.gelifesciences.co.jp>, 01.10.2007.
- HDI 2006 Human Development Report 2006. <http://hdr.undp.org/hdr2006/statistics/>, 09.10.2007.
- HOKPUTSA, S., GERDDIT, W., PONGSAMART, S., INNGJERDINGEN, K., HEINZE, T., KOSCHELLA, A., HARDING, S. E. & PAULSEN, B. S. 2004 Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. *Carbohydrate Polymers* **56** (4), 471–481.
- INNGJERDINGEN, K. 2000 Sårhelende planter i Mali A. Videre studier over *Glinus oppositifolius* B. Feltarbeid i Dogonland og Sikasso. Master's thesis, University of Oslo, Norway.
- INNGJERDINGEN, K. T. 2007 Bioactive pectic polymers from Malian medicinal plants. PhD thesis, University of Oslo, Norway.

- INNGJERDINGEN, K. T., COULIBALY, A., DIALLO, D., MICHAELSEN, T. E. & PAULSEN, B. S. 2005a A Complement Fixing Polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotzsch, a Medicinal Plant from Mali, West Africa. *Journal of Ethnopharmacology* **7** (1), 48–53.
- INNGJERDINGEN, K. T., DEBES, S. C., INNGJERDINGEN, M., HOKPUTSA, S., HARDING, S. E., ROLSTAD, B., MICHAELSEN, T. E., DIALLO, D. & PAULSEN, B. S. 2005b Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *Journal of Ethnopharmacology* **101** (1-3), 204–214.
- INNGJERDINGEN, K. T., PATEL, T., CHEN, X., KENNE, L., ALLEN, S., MORRIS, G. A., HARDING, S. E., MATSUMOTO, T., DIALLO, D., YAMADA, H., MICHAELSEN, T. E., INNGJERDINGEN, M. & PAULSEN, B. S. 2007 Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology*, *In press* .
- JOSHI, C. S., PRIYA, E. S. & VENKATARAMAN, S. 2007 Acute and subacute toxicity studies on the polyherbal antidiabetic formulation Diakyur in experimental animal models. *Journal of Health Science* **53** (2), 245–257.
- KIM, J. B. & CARPITA, N. C. 1992 Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology* **98** (2), 646–53.
- KONE, W. M., ATINDEHOU, K. K., TERREAUX, C., HOSTETTMANN, K., TRAORE, D. & DOSSO, M. 2004 Traditional medicine in north Cote-d'Ivoire: Screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **93** (1), 43–9.
- LEVIGNE, S., THOMAS, M., RALET, M. C., QUEMENER, B. & THIBAUT, J. F. 2002 Determination of the degrees of methylation and acetylation of pectins using a C18 column and internal standards. *Food Hydrocolloids* **16** (6), 547–550.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265–75.
- LUNDANES, E. 1998 Koplinger med MS. In *Kromatografi* (ed. E. Lundanes, K. E. Rasmussen & J. Karlsen), pp. 255–264. Universitetsforlaget.
- MCMURRY, J. 1999 *Organic chemistry*, 5th edn. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole.

- 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** (5), 483–490.
- MILLER, G. L. 1959 Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426–8.
- NBG24:7 2007 Styrketrening for immunforsvaret. www.nbg247.no, 04.10.2007.
- NGABA, J., OLSCHWANG, D., GIONO-BARBER, H. & POUSET, J. L. 1980 African medicinal plants. III. Study of antitusive action of *Combretum glutinosum* Perr. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **38** (6), 529–36.
- O'NEILL, M. A. & YORK, W. S. 2003 The composition and structure of plant primary cell walls. *Annual Plant Reviews* **8** (Plant Cell Wall), 1–54.
- PALSDOTTIR, B. O. 2007 Methylation analysis of lichen polysaccharides - metode development. Master's thesis, University of Iceland, Iceland.
- PAULSEN, B. S. & BARSETT, H. 2005 Bioactive pectic polysaccharides. *Advances in Polymer Science* **186**, 69–101.
- PEREZ, S., RODRIGUEZ-CARVAJAL, M. A. & DOCO, T. 2003 A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **85**, 109–121.
- PETERSON, G. L. 1979 Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry* **100** (2), 201–20.
- PREOBRAZHENSKAIA, M. E., KUZNETSOVA, V. M. & ROZENFEL'D, E. L. 1961 Studies on the activity of yeast glucans in relation to the properdin system. *Monatsschr Unfallheilkunde Versicherungsmed* **7**, 158–63.
- PROMEGACORPORATION 2005 Griess reagent system. www.promega.com, 01.10 2007.
- RANGJORD, R. V. 2003 Sårhelende planter i Mali, feltarbeid i Dioila og Bandiagara og studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra *Opilia celtidifolia*. Master's thesis, University of Oslo, Norway.

- RASMUSSEN, K. E. 1998 Gasskromatografi. In *Kromatografi* (ed. E. Lundanes, K. E. Rasmussen & J. Karlsen), pp. 109–153. Universitetsforlaget.
- ROBERTSEN, B., RØRSTAD, G., ENGSTAD, R. & RAA, J. 1990 Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Fish Diseases* **13** (5), 391–400.
- RUSTEN, A. 2006 Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra *Syzygium guineense*. Etnofarmakologiske studier i Mali. Master's thesis, University of Oslo, Norway.
- SAGBERG, K. M. 2006 Nye stoffer med effekt på immunsystemet isolert fra sårhelende planter i Mali; polysakkarider fra *Combretum glutinosum*. Etnofarmakologiske studier i Mali med fokus på viktige medisinplanter, Kolokani og Dioila, *Combretum glutinosum*. Master's thesis, University of Oslo, Norway.
- SAIDU, K., ONAH, J., ORISADIPE, A., OLUSOLA, A., WAMBEBE, C. & GAMANIEL, K. 2000 Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology* **71** (1-2), 275–80.
- SINGH, B. P., JHA, O. P. & GHOSH, P. K. 1982a A study of wax alkanes of some Molluginaceae and Aizoaceae. *Plant Physiology & Biochemistry* **9** (1), 14–17.
- SINGH, B. P., SINGH, R. P. & JHA, O. P. 1982b Flavonoids of some Aizoaceae and Molluginaceae of Bhagalpur. *Biological Bulletin of India* **4** (3), 157–63.
- SPEKTRUM 2005 *Spectrum product instruction booklet. Følgehefte til Spectra/Por dialysemembraner*.
- SWEELEY, C. C., BENTLEY, R., MAKITA, M. & WELLS, W. W. 1963 Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society* **85** (16), 2497–2507.
- THEIS, A. 2006 *Erythrina senegalensis* - en medisinplante fra Mali: undersøkelse av antifungale komponenter; etnofarmakologiske studier. Master's thesis, University of Oslo, Norway.
- TOGOLA, A., DIALLO, D., DEMBELE, S., BARSETT, H. & PAULSEN BERIT, S. 2005 Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali, (West Africa)

- in the regions Doila, Kolokani and Siby. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **1** (1), 7.
- TRAORE, F., FAURE, R., OLLIVIER, E., GASQUET, M., AZAS, N., DEBRAUWER, L., KEITA, A., TIMON-DAVID, P. & BALANSARD, G. 2000 Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*. *Planta Medica* **66** (4), 368–371.
- TRAORE-KEITA, F., GASQUET, M., DI GIORGIO, C., OLLIVIER, E., DELMAS, F., KEITA, A., DOUMBO, O., BALANSARD, G. & TIMON-DAVID, P. 2000 Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. *Phytotherapy Research* **14** (1), 45–7.
- WAGNER, H., KRAUS, S. & JURCIC, K. 1999 Search for potent immunostimulating agents from plants and other natural sources. *Immunomodulatory Agents from Plants* pp. 1–39.
- YAMADA, H. 1996 Contribution of pectins on health care. In *Progress in Biotechnology 14, Pectins and Pectinases* (ed. J. Visser & A. G. J. Voragen), pp. 173–190. Elsevier Science.
- YAMADA, H. & KIYOHARA, H. 1999 Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In *Immunomodulatory Agents from Plants* (ed. H. Wagner), pp. 161–202. Birkhäuser Verlag.