

**Struktur – og aktivitetsstudier av
polysakkarider fra *Opilia celtidifolia*
– en medisinplante fra Mali**

Etnofarmakologiske studier i Mali



Ragnhild Kårvatn Evjenth
Hovedfagsoppgave for graden Cand. Pharm.
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet
Universitetet i Oslo
2007

**Struktur – og aktivitetsstudier av polysakkarider fra
Opilia celtidifolia
– en medisinsplante fra Mali**

Etnofarmakologiske studier i Mali

Hovedfagsoppgave for graden Cand. Pharm.
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet
Universitetet i Oslo

Ragnhild Kårvatn Evjenth
Oslo, november 2007

Veiledere

Berit Smestad Paulsen
Drissa Diallo

FORORD

Jeg ønsker først å takke min veileder professor Berit Smestad Paulsen for, for gode råd og veiledning underveis i arbeidet med oppgaven. Samt for tilrettelegging under feltarbeidene i til Mali.

Videre ønsker jeg å takke min veileder i Mali, professor Drissa Diallo. Du gjorde en uvurdelig jobb i forhold til tilrettelegging av feltarbeidene, som oversetter og intervjuer under feltarbeidene.

Torunn takkes for god og mye hjelp gjennom året, du har vært uvurdelig! Takk til Finn Tønnesen, John Remme og Terje E. Michaelsen for veiledning i det praktiske arbeidet på laboratoriet. Marit Inngjerdingen fortjener en stor takk for hjelpen du har ytt, spesielt mot slutten.

Ellers alle i 3. etasje på farmasibygget. Takk for et trivelig hovedfagsår!

Til kjæresten min. Takk for all støtte, oppmuntring og tålmodig. Takk for at du er så snill mot meg.

Oslo, 29.11.07

Ragnhild K Evjenth,

1	FORKORTELSER.....	6
2	SAMMENDRAG.....	9
3	INNLEDNING.....	11
3.1	PLANTENS CELLEVEGG.....	11
3.1.1	<i>Cellulose</i>	11
3.1.2	<i>Hemicellulose</i>	12
3.1.3	<i>Pektiner</i>	12
3.1.4	<i>Proteiner i celleveggen</i>	15
3.2	BIOLOGISK AKTIVITET.....	16
3.2.1	<i>Immunsystemet</i>	16
3.2.2	<i>Makrofagaktivering</i>	17
3.2.3	<i>Komplementsystemet</i>	18
3.3	<i>OPILIA CELTIDIFOLIA</i> (GUILL. & PERR.) ENDL. EX WALP (OPILIACEAE).....	21
3.3.1	<i>Taksonomisk klassifisering</i>	21
3.3.2	<i>Botanikk</i>	22
3.3.3	<i>Tradisjonell bruk</i>	22
3.3.4	<i>Forskning på Opilia celtidifolia. (Guill. & Perr.) Endl. Ex Walp</i>	22
4	OPPGAVENS MÅLSETTING.....	24
5	METODER OG MATERIALER.....	25
5.1	GENERELLE METODER.....	25
5.1.1	<i>Vannkvalitet</i>	25
5.1.2	<i>Volumreduksjon</i>	25
5.1.3	<i>Innveiting</i>	25
5.1.4	<i>Vask av dialyseslanger</i>	26
5.1.5	<i>Dialyse</i>	27
5.1.6	<i>Frysetøking</i>	28
5.1.7	<i>Blanding av løsninger</i>	28
5.1.8	<i>Sentrifugering</i>	29
5.1.9	<i>Filtering</i>	29
5.1.10	<i>pH-målinger</i>	30
5.1.11	<i>Degassing/ evakuering av luft</i>	30
5.1.12	<i>Syrevask av glassutstyr</i>	30
5.1.13	<i>Absorbansmåling</i>	31
5.2	ISOLERING AV POLYSAKKARIDER.....	32
5.2.1	<i>Ionebyttekromatografi – DEAE® Sepharose Fast Flow</i>	32
5.2.2	<i>Gelfiltrering</i>	35
5.2.2.1	<i>Bio-Gel® P-6 DG</i>	35
5.2.2.2	<i>Bio-gel® P-30</i>	37
5.2.2.3	<i>Sephacryl™ S-400 HR</i>	38
5.2.2.4	<i>PD-10</i>	39
5.3	KVANTITATIVE OG KVALITATIVE TESTER PÅ KARBOHYDRATINNHold.....	40
5.3.1	<i>Metanolyse</i>	40
5.3.2	<i>TMS-derivatisering</i>	41

5.3.3	<i>Gasskromatografi</i>	43
5.3.4	<i>Fenolsvovelsyretesten</i>	45
5.3.5	<i>FPLC – superose 6</i>	46
5.4	STRUKTUROPPKLARING.....	48
5.4.1	<i>Enzymatisk degradering av pektin</i>	48
5.4.2	<i>Bestemmelse av bindingsforhold</i>	50
5.4.2.1	<i>Karboksylysrereduksjon</i>	50
5.4.2.2	<i>Metylering</i>	52
5.4.2.3	<i>Hydrolyse</i>	54
5.4.2.4	<i>Reduksjon</i>	55
5.4.2.5	<i>Acetylering</i>	56
5.4.2.6	<i>GC-MS</i>	57
5.4.3	<i>Modifisert Lowry proteinbestemmelse</i>	59
5.4.4	<i>IR – spektroskopi</i>	60
5.5	BIOLOGISK AKTIVITET.....	62
5.5.1	<i>Komplementfikseringstest</i>	62
5.5.2	<i>Måling av NO-frigjøring fra makrofager</i>	67
5.5.3	<i>Indusering av B-celle-proliferasjon</i>	70
6	RESULTATER OG DISKUSJON	73
6.1	ISOLERING AV POLYSAKKARIDER	73
6.1.1	<i>Gelfiltrering - Bio-Gel® P-6 DG</i>	73
6.1.2	<i>Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose Fast Flow</i>	74
6.1.3	<i>Gelfiltrering – Sephacryl™ S-400 HR</i>	76
6.2	KARBOHYDRATANALYSE	77
6.2.1	<i>Monosakkaridbestemmelse - metanolyse</i>	77
6.2.2	<i>Undersøkelse av bindingsforholdene i fraksjonene</i>	80
6.2.3	<i>Molekylvektsfordeling</i>	83
6.2.4	<i>Bestemmelse av funksjonelle grupper i molekylene – IR-spektroskopi</i>	85
6.2.5	<i>Bestemmelse av proteininnhold</i>	86
6.3	BIOLOGISK AKTIVITET	87
6.3.1	<i>Komplementfiksering</i>	87
6.3.2	<i>Måling av NO-frigjøring fra makrofager</i>	89
6.3.3	<i>B-celleproliferasjon</i>	90
6.4	STRUKTUR OG BIOLOGISK AKTIVITET ETTER ENZYMATISK DEGRADERING	92
6.4.1	<i>Enzymatisk degradering</i>	92
6.4.2	<i>Monosakkaridbestemmelse – metanolyse</i>	94
6.4.3	<i>Undersøkelse av bindingsforholdene i de enzymdegraderte fraksjonene</i>	95
6.4.4	<i>Molekylvektsfordeling</i>	97
6.4.5	<i>Biologisk aktivitet</i>	98
6.4.5.1	<i>Komplementfiksering</i>	98
6.4.5.2	<i>Måling av NO-frigjøring fra makrofager</i>	100
7	ETNOFARMAKOLOGISK ARBEID I MALI	101
7.1	MALI – ET OVERBLIKK	101
7.2	TRADISJONELL MEDISIN I MALI	102
7.3	ETNOFARMAKOLOGISKE STUDIER I MALI	103
7.4	HEALERINTERVJUER.....	104
7.4.1	<i>Dioliaregionen</i>	104
7.4.2	<i>Sikassoregionen</i>	112

8	KONKLUSJON.....	116
9	REFERANSER.....	118

1 Forkortelser

α	OH-gruppen ved C1 er trans konfigurasjon til -CH ₂ OH-substituenten i C5
AG I	Arabinogalaktan type I
AG II	Arabinogalaktan type II
AGP	Arabinogalaktan protein
APC	Antigenpresenterende celler
Ara	Arabinose
AraF	Arabinofuranosidase
β	OH-gruppen ved C1 er cis konfigurasjon til -CH ₂ OH-substituenten i C5
CFSE	Carboxyfluorescein diacetate
CMC	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)- carbodiimide-metho-p-toluensulfonat (carbodiimide)
COOH	Syregruppe
d	Diameter
Da	Dalton
DCM	Diklormetan
DEAE	Diethylaminoetyl
f	Furanoseform, 5-ring
FHI	Nasjonalt Folkehelseinstitutt
FID	Flammeionisasjonsdetektor
FSS	Fenolsvovelsyretest
Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
β -Gal	β -galaktosidase
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi/Massespektrometri
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
h	Høyde
H ₂	Hydrogengass
HR	High Resolution
ICH ₅₀	Konsentrasjon som gir 50% hemming av hemolyse

IR	Infrarød
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysakkarid
Man	Mannose
Me	Metyl
MeOH	Metanol
MLR	Mikset Lymfocytt Reaksjon
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off; porestørrelse i dialyseslanger
N ₂	Nitrogengass
O	Oksygenatom
O ₂	Oksygengass
OC50S1	Høymolekylær sur fraksjon <i>Opilia celtidifolia</i> isolert etter separasjon på DEAE Sepharose® Fast Flow
OC50S1NB	Høymolekylær sur fraksjon <i>Opilia celtidifolia</i> isolert etter separasjon på DEAE Sepharose® Fast Flow. Ny batch.
OC50S2	Høymolekylær sur fraksjon <i>Opilia celtidifolia</i> isolert etter separasjon på DEAE Sepharose® Fast Flow
OC50S2NB	Høymolekylær sur fraksjon <i>Opilia celtidifolia</i> isolert etter separasjon på DEAE Sepharose® Fast Flow. Ny batch.
OC50S1.1	Mellommolekylær sur fraksjon isolert etter gelfiltrering på Sephacryl S-400
OC50S1.2	Mellommolekylær sur fraksjon isolert etter gelfiltrering på Sephacryl S-400
OC50S2.1	Mellommolekylær sur fraksjon isolert etter gelfiltrering på Sephacryl S-400
OC50S2.2	Mellommolekylær sur fraksjon isolert etter gelfiltrering på Sephacryl S-400
OC50S1.2.H	Høymolekylær enzymdegradert fraksjon isolert etter behandling med arabinofuranosidase
OC50S1.2.L	Lavmolekylær enzymdegradert fraksjon isolert etter behandling med arabinofuranosidase
OC50S1.2.H.H	Høymolekylær enzymdegradert fraksjon isolert etter behandling med β -galaktosidase
OC50S1.2.H.L	Lavmolekylær enzymdegradert fraksjon isolert etter behandling med β -galaktosidase
p	Pyranoseform, seksring

PM II	Plantago Major fraksjon II
RG I	Rhamnogalakturonan type I
RG II	Rhamnogalakturonan type II
rpm	Runder per minutt
Rha	Rhamnose
SEC/MALLS	Size-exclusion Chromatography/multi-angle laser light scattering
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller fra sau
T	Terminal
UV	Ultrafiolett lys
VIS	Synlig lys
Xyl	Xylose

2 Sammendrag

Opilia celtidifolia (Guill. & Perr.) er en malisk medisinplante med utstrakt tradisjonell bruk, blant annet mot malaria, innvollsorm, som sårhelende og appetittøkende. Dekokt av bladene er en mye brukt tilberedelsesmåte og denne drikkes. Det er sannsynlig at planten kan ha immunmodulerende effekt. Et stort antall polysakkarider fra planter har i studier vist effekt i biologiske systemer, som blant annet komplementsystemet.

Målet med denne oppgaven har vært todelt. Det skulle utføres studier på polysakkarider isolert fra planten, med hensyn til karbohydratinnhold, strukturer og aktivitet i biologiske systemer relatert til immunsystemet. Videre skulle det gjennomføres etnofarmakologiske studier i Mali, der healere skulle intervjues vedrørende den tradisjonelle medisinske bruken av planten. Dette arbeidet er et ledd i å øke sikkerheten rundt tradisjonell medisinbruk i Mali.

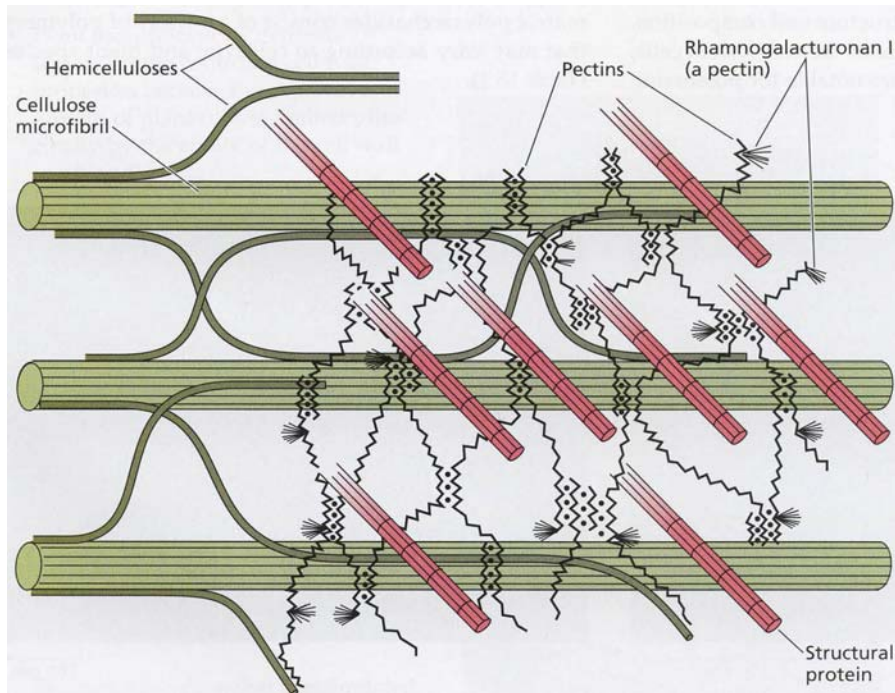
Råekstraktet OC50 fra bladene til *Opilia celtidifolia* ble rensset på Bio-Gel® P6 DG. Det ble videre separert på DEAE Sepharose® Fast Flow. Dette resulterte i de sure fraksjonene OC50S1 og OC50S2. Separasjon etter molekylstørrelse ble gjort ved gelfiltrering på Sephacryl™ S-400 HR. Dette gav fire fraksjoner; OC50S1.1, OC50S1.2, OC50S2.1 og OC50S2.2. Fraksjonen OC50S1.2 ble enzymatisk degradert først ved hjelp av arabinofuranosidase, deretter galaktosidase. Separering på Bio-Gel® P30 gav fire fraksjoner; OC50S1.2.H, OC50S1.2.L, OC50S1.2.H.H og OC50S1.2.H.L.

Monosakkaridsammensetningen til samtlige fraksjoner ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse. Bindingsforholdene ble undersøkt ved hjelp av karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og etterfølgende GC-MS-analyse. Resultatene fra disse forsøkene viste et betydelig innhold av arabinose og galaktose, med mange forgrenings-punkter. Det ble undersøkt for innhold av proteiner og forestrede grupper. OC50S1.1 og OC50S1.2 inneholder sannsynligvis både arabinaner, arabinogalaktaner av både type I og II, i tillegg til rhamnogalakturonan I. Strukturene man ser er typiske for ”hårete” områder av pektiner. Fucose og xylose kan komme fra substituenten i sidekjedene i RG-I. Fraksjonene inneholder mannose og dette er ingen naturlig bestanddel i RG-I. Dette kan indikere innhold av hemicellulose av typen glukomannaner.

Forbindelsene ble undersøkt med hensyn til immunmodulerende effekt ved komplementfiksering og makrofagaktivering. Man ser i alle forsøkene høyest effekt ved fraksjonene fra DEAE Sepharose[®] Fast Flow. Mye av effekten ser ut til å være bevart også for fraksjonene fra Sephacryl[™] S-400 HR og de enzymdegraderte fraksjonene. Evne til B-celleproliferasjon ble undersøkt for fraksjonene fra DEAE Sepharose[®] Fast Flow og Sephacryl[™] S-400 HR. Tidligere forskning på polysakkarider indikerer en mulig sammenheng mellom evne komplementfiksering og B-celleproliferasjon. Dette synes å være tilfelle også i disse studiene. Alle fraksjonene har evne til å stimulere B-celleproliferasjon ved de høyeste konsentrasjonene med prøveløsning, men ikke så mye som den positive kontrollen LPS.

3 Innledning

3.1 Plantens cellevegg



Figur 3.1 Skjematisk tegning av celleveggs hovedkomponenter (Taiz and Zeiger 2006).

Celleveggs funksjon består i å gi struktur og form til cellen, samt regulere cellens volum. Celleveggs matriks består stort sett av cellulose, hemicellulose og pektiner, i tillegg til strukturelle proteiner. I den primære celleveggen er dette innholdet rundt 25 % cellulose, 25 % hemicellulose, 35 % pektiner og 1-8 % strukturelle proteiner (Se figur 3.1) (Taiz and Zeiger 2006).

3.1.1 Cellulose

Cellulose består av tett pakkede mikrofibriller av homogene, lineære kjeder av β -(1 \rightarrow 4) D-glukose. Molekylene er bundet sammen i lange strukturer og glukane fremstår i et ordnet nettverk, bundet sammen ved hjelp av hydrogenbindinger og hydrofobe interaksjoner.

Cellulose har en svært sterk struktur, som er uløselig, kjemisk stabil og relativt immun mot

kjemisk og enzymatisk nedbrytning. Dette gjør cellulose til en ideell byggesten i celleveggen (Taiz and Zeiger 2006).

3.1.2 Hemicellulose

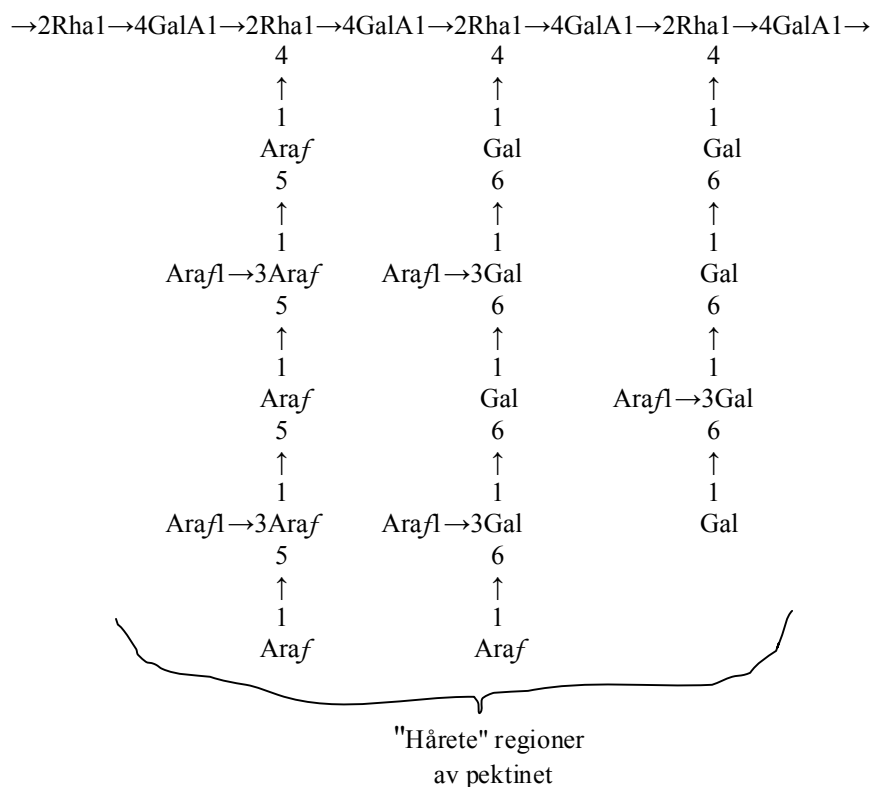
Hemicelluloser er heterogene grupper av polysakkarider som er tett bundet til cellulose i celleveggen. Det finnes mange ulike typer hemicelluloser i plantens cellevegg. I den primære veggen er xyloglukaner de mest forekommende. På samme måte som cellulose har hemicelluloser en β -(1 \rightarrow 4) D-glukose ryggrad. Disse kan ha korte sidekjedder bestående av xylose, galaktose og noen ganger terminal fucose. Sidekjedene forhindrer at xyloglukan trer inn i en krystallinsk mikrofibrillstruktur. Andre eksempler på hemicelluloser er xylaner, glukuronoarabinaner og glukomannaner (Taiz and Zeiger 2006).

3.1.3 Pektiner

Pektinene kan deles inn i 3 grupper. Homogalakturonan (HGA), Rhamnogalakturonan I (RG-I) og Rhamnogalakturonan II (RG-II) (Willats, McCartney et al. 2001). Pektinene finnes mellom celler eller i den primære celleveggen i planten (Paulsen and Barsett 2005). Pektiner er en heterogen gruppe av polysakkarider som karakteriseres av å inneholde sure sukkere som galakturonsyre og nøytrale monosakkarider som rhamnose, galaktose og arabinose. Pektinene er de lettest løselige av polysakkaridene i celleveggen. De er store og komplekse molekyler sammensatt av flere forskjellige typer pektin-polysakkarider (Taiz and Zeiger 2006).

Rhamnogalakturonan I (RG I)

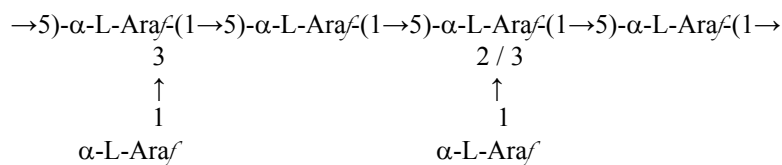
Rhamnogalakturonan I er et stort molekyl med en lang ryggrad med ulike sidekjedder. Sidekjedene i molekylet består av tett forgrenede "hårete" områder av arabinaner og galaktaner (Se figur 3.2). I mellom sidekjedene finnes "glatte" områder av homogalakturonan. Dette er lange kjeder av α -(1 \rightarrow 4)-GalA-enheter (Taiz and Zeiger 2006). Ryggraden i RG-I består av alternerende α -1,4-GalA og α -1,2-Rha. Rha-enhetene i ryggraden er forgreningspunktet, der arabinaner og galaktaner av varierende struktur er bundet (Figur 3.2) (Paulsen and Barsett 2005).



Figur 3.2 Rhamnogalakturonan I-ryggrad substituert med arabinan og arabinogalaktan i 4-posisjon (Paulsen and Barsett 2005).

Arabinaner

Arabinanene man finner i planter består i hovedsak av L-arabinofuranosider. Avhengig av kilde, kan de være enten lineære eller forgrenede. Generelt er kjerneforgreningen hos arabinaner i 5-posisjon, men det forekommer også i 2-og 3-posisjon (figur 3.3) (Paulsen and Barsett 2005).



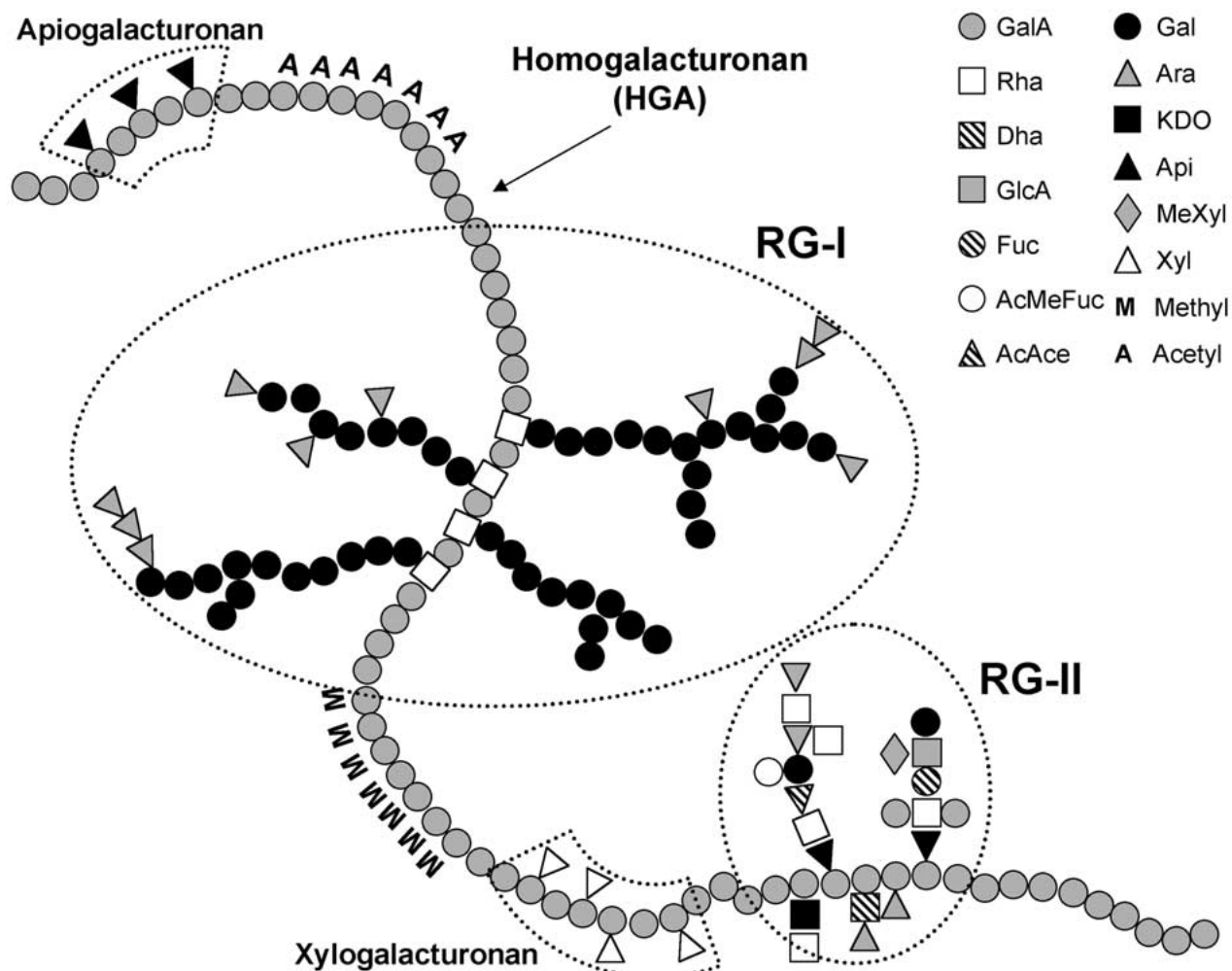
Figur 3.3 Foreslått delstruktur for et arabinan (Paulsen and Barsett 2005).

Arabinogalaktaner Type I og II

Arabinogalaktanene klassifiseres ofte i 3 grupper: Arabino-4-galaktaner (Type I), arabino-3,6-galaktaner (Type II) og polysakkarider med arabinogalaktan-sidekjeder (ekte pektiner). AG-I finnes i celleveggen og består av en β -1,4-galaktan-ryggrad med sidekjeder av arabinaner bundet i posisjon 3 på galaktoseenheten. AG-I -strukturen finnes for det meste som bestanddel i pektinkomplekset Rhamnogalakturonan I (figur 3.2). Hovedbestanddelen i AG-II er et galaktan med bindinger i 3 eller 6-posisjon, i hovedkjeden. Det er tett forgrenet med 1,3,6-bundede galaktose-enheter i forgreningspunktet. AG-II finnes ofte bundet til RG-I (Paulsen and Barsett 2005).

Rhamnogalakturonan II (RG-II)

Til tross for likhet i navnet med RG-I er strukturen svært ulik. Rhamnogalakturonan II er et polysakkarid med kompleks struktur. Det er sammensatt av minst 10 ulike sukker i et komplisert mønster. RG-II-enheten kan være bundet sammen med borat-diestere og dette er viktig for strukturen i celleveggen (Taiz and Zeiger 2006).



Figur 3.4 Foreslått struktur av et pektin (Pérez, Rodríguez-Carvajala et al. 2003)

3.1.4 Proteiner i celleveggen

Strukturelle proteins rolle i celleveggen er usikker, men man tror de bidrar med mekanisk styrke til veggen. Det finnes mange forskjellige klasser av strukturelle proteiner i celleveggen. Disse klassifiseres vanligvis etter de mest forekommende aminosyrene, for eksempel hydroxyprolin-rike glykoproteiner (Taiz and Zeiger 2006).

En annen type protein i celleveggen er arabinogalaktanproteinene (AGP). Disse proteinene finnes som oftest i mengder på mindre enn 1 % og er sterkt glykosylerte med arabinose og galaktose (Taiz and Zeiger 2006).

3.2 Biologisk aktivitet

Polysakkarider fra planter har et bredt spekter av terapeutiske egenskaper. De har relativt lav toksisitet og gir sammenlignet med syntetiske forbindelser kun få og milde bivirkninger. Dette gjør dem til ideelle kandidater nye legemidler med immunstimulerende, antitumor eller baktericid effekt. Opphavet til effekten antas å komme fra stimulering av makrofager og modulering av komplementsystemet (Schepetkin and Quinn 2005).

Polysakkarider som har vist immunmodulerende aktivitet finnes i et stort utvalg glykaner. Alt fra homopolymere til svært komplekse heteropolymere. Det foreligger ingen klar informasjon om hvordan strukturen til et polysakkarid må være for at effekten på immunsystemet skal være optimal. På generell basis kan man si at det antas at molekyler med høy molekylvekt er mer aktive enn molekyler med lav molekylvekt og at de bør inneholde forgreninger og sidekjeder for at aktiviteten skal være optimal (Lin 2005).

Polysakkarider fra flere medisinplanter som er brukt tradisjonelt i Mali har vist immunmodulerende aktivitet i biologiske screeningsystemer (Diallo, Paulsen et al. 2003; Nergaard, Matsumoto et al. 2004; Inngjerdingen, Coulibaly et al. 2006; Togola, Inngjerdingen et al. 2007).

3.2.1 Immunsystemet

Kroppens immunrespons består av to deler; gjenkjennelse av patogenet – den medfødte immunresponsen og destruksjon av patogenet – den ervervede immunresponsen. Huden utgjør kroppens første forsvar mot infeksjon. Så lenge huden er hel og ubrutt, utgjør den en robust, impermeabel, fysisk barriere (Parham 2005). Når et patogen trenger igjennom kroppens fysiske barrierer, aktiveres immunsystem. Fagocytter utgjør kroppens førstelinjeforsvar mot inntrengende patogener. (Madigan, Martinko et al. 2003).

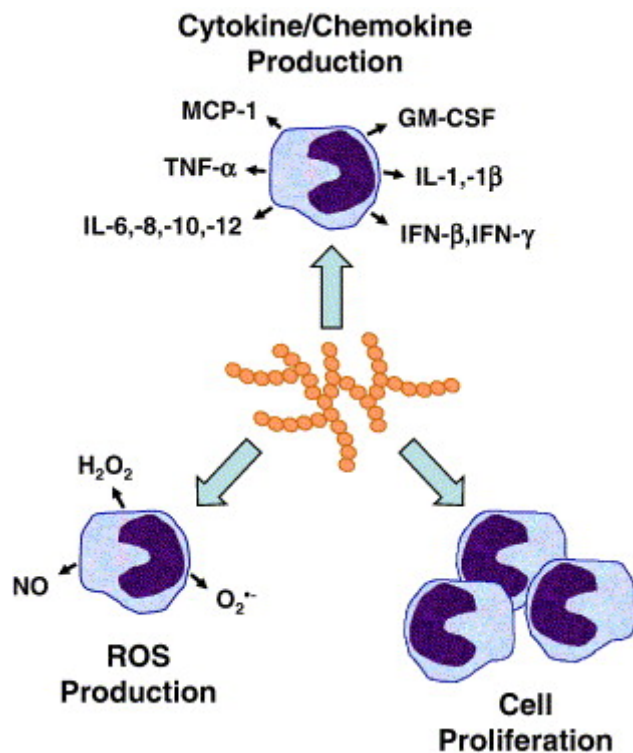
Neste steg i immunresponsen er fagocyttenes presentasjon av antigener for T-celler av typen T_hhjelper-celler (T_H-celler). Disse cellene bidrar ikke direkte i responsen, men rekrutterer og stimulerer andre celler. T_H1-celler er antigen-spesifikke, og trekker til seg og aktiverer fagocytter som makrofager og neutrofiler (Se avsnitt 3.2.2). Disse produserer en inflammatorisk reaksjon som begrenser omfanget av infeksjonen. T_H2-celler aktiverer andre

typer lymfocytter; B-celler. B-cellene produserer antistoffer, som reagerer spesifikt med antigener på patogener. Selv kan de ikke drepe patogener. Komplementsystemet har evnen til å feste seg til antistoffer bundet til patogener. Dette kan føre til cellelyse (Se avsnitt 3.2.3). (Madigan, Martinko et al. 2003).

3.2.2 Makrofagaktivering

Makrofager er store fagocytter og er godt utstyrt til å utføre fagocytose. De fanger og degraderer patogener som kommer til lymfen fra infeksjonssteder ellers i kroppen. Dette gjør at makrofager kan presentere patogener for T-celler og forhindre at infeksjoner når blodet og blir systemiske (Parham 2005). Makrofagene spiller en sentral rolle som antigen-presenterende celler (APC) i både antigenmediert og cellemediert immunitet. Makrofager binder seg til, tar hånd om og presenterer antigener for T_H1 -celler. Som fagocytterende celler tar makrofagene opp og dreper visse fremmede celler. Dette blir stimulert via T_H1 -celler. De har evnen til å drepe patogener intracellulært. Makrofagener blir aktivert via cytokiner fra $T_{innflammatoriske}$ celler. (Madigan, Martinko et al. 2003).

Polysakkarider fra mange ulike plantefamilier har vist å kunne modulere makrofagfunksjonen. Dette antas å gjøres ved og øke makrofagers cytotoxiske aktivitet mot tumorceller og mikroorganismer, aktivere fagocytose, øke reaktive oksygen species (ROS) og nitrogenmonoksid (NO), øke sekresjonen av cytokiner og kjemokiner (Se figur 3.5). (Schepetkin and Quinn 2005).



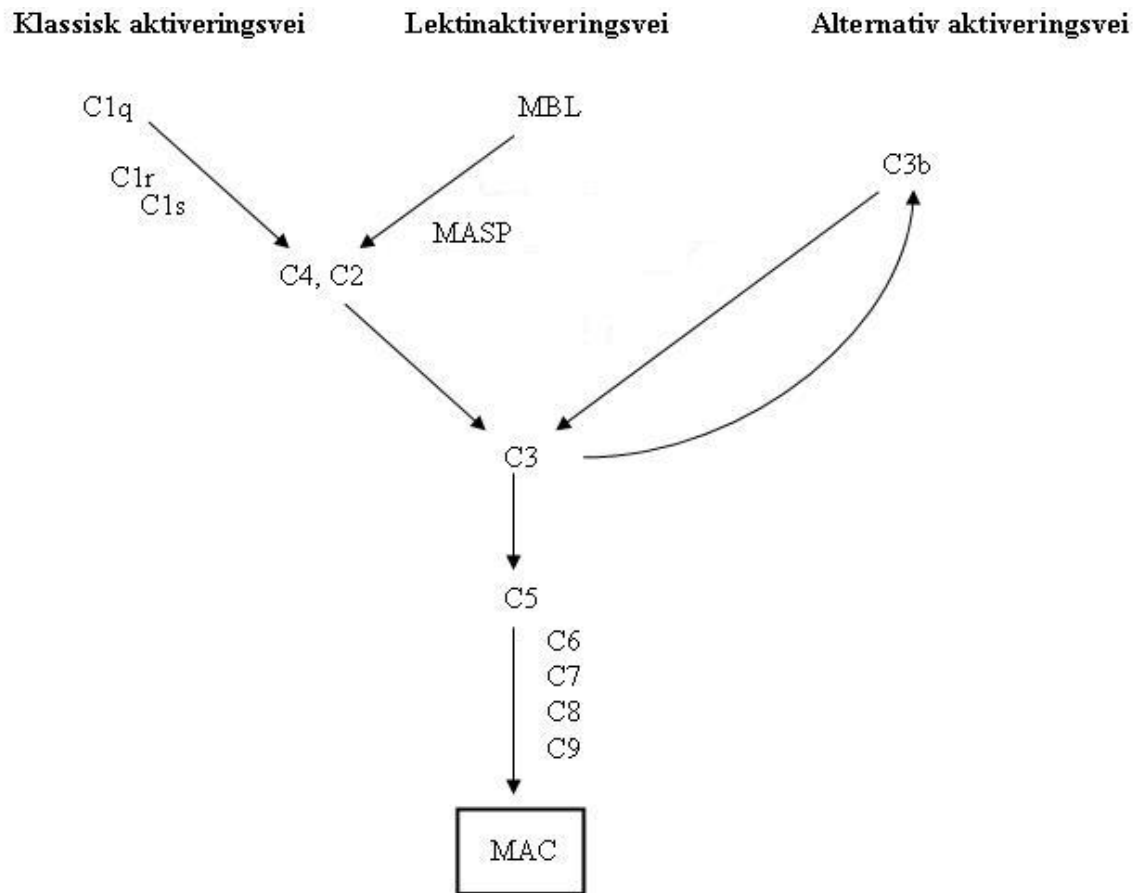
Figur 3.5 Makrofagaktivering ved hjelp av plantepolysakkarider (Schepetkin and Quinn 2005).

3.2.3 Komplementsystemet

Komplementsystemet spiller en viktig rolle i den humane immunresponsen. Den er en del av det medfødte immunsystemet og førstelinjeforsvaret mot patogener. Det består av en serie proteiner som aktiveres via interaksjon med antigen-antistoff-komplekser. Flere forskjellige komplement-proteiner reagerer i en kaskadereaksjon og forårsaker til slutt celledøds (Madigan, Martinko et al. 2003).

Komplementsystemet aktiveres via antistoffer av typen IgG og IgM. Komplementproteinene sirkulerer i blodet og kaskaden initieres som følger: 1. Et antistoff binder seg til et antigen. 2. C1 binder seg til antigen-antistoffkomplekset. Dette fører til binding av C2-C4 på cellemembranen i nærheten. Denne bindingen aktiverer C3 som binder seg på samme sted. 3. C3 på membranen katalyserer dannelsen av C5-C6-C7-komplekset et annet sted på membranen. C8 og C9 slutter seg til C5-C6-C7-komplekset og danner membranangrepskomplekset (MAC). Dette fører til at membranen går i stykker og cellen lyses (Se figur 3.6). Reaksjoner som involverer C3 tiltrekker og aktiverer fagocytter og bidrar dermed til økt fagocytose. Reaksjoner som involverer C5 fører til tiltrekking av T-celler og frisetelse av

cytokiner. Kun gram-negative bakterier destrueres av komplementaktivering (Madigan, Martinko et al. 2003).



Figur 3.6 Komplementaktivering via klassisk, alternativ og lektinaktivert vei.

I et friskt individ er komponentene i systemet stort sett inaktive, men de kan aktiveres på tre forskjellige måter. Klassisk aktiveringsvei, alternativ aktiveringsvei og lektinaktiveringsveien. Klassisk aktivering inntreffer når et antistoff har bundet seg til et antigen; det foreligger et immunkompleks. Alternativ vei aktiveres når C3 spaltes av konvertaser og et av produktene, C3b, binder seg til mikroorganismens membran. Lektinveien aktiveres av akutfasereaktanten mannose-bindende lektin (MBL) (Se figur 3.6) (Lea 2000).

Det foreligger flere studier på pektintype polysakkarider som antyder at innhold av forgrenede rhamnogalakturonan-kjeder forbindelsene er viktig for effekt på komplementsystemet. Det er blitt foreslått at den potente komplementfikserende aktiviteten til de forgrenede områdene er

et resultat av rhamnogalakturonan-ryggraden kombinert med kjeder av nøytrale sukkere i forbindelsene (Yamada and Kiyohara 1999).

Mange pektinpolysakkarider med komplementfikserende aktivitet har også vist mitogen B-celleaktivitet. Det antas at de forgrenede områdene av pektinet er viktig også for denne aktiviteten (Yamada and Kiyohara 1999).

3.3 *Opilia celtidifolia* (Guill. & Perr.) Endl. ex Walp (opiliaceae)

3.3.1 Taksonomisk klassifisering

(Judd, Campbell et al. 1999)

Rike:	<i>Plantae</i> (planteriket)
Underrike:	<i>Viridaeplantae</i> (grønne planter)
Divisjon:	<i>Tracheophyta</i>
Underdivisjon:	<i>Spermatophytina</i>
Infradivisjon:	<i>Angiospermae</i>
Klasse:	<i>Magnoliopsida</i>
Underklasse:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Santales</i>
Familie:	<i>Opiliceae</i>
Slekt:	<i>Opilia</i>
Art:	<i>celtidifolia</i>



Figur 3.7 *Opilia celtidifolia* (Ejenth 2007)

3.3.2 Botanikk

Opilia celtidifolia (figur 3.7) er en tett forgrenet, klatrende busk eller tre som kan bli opptil 10 meter høyt. Den vokser helst i spredt skog eller på savannen, ofte på toppen av maurtuer. Den vokser i hele det Vest-Afrikanske sahelområdet fra Senegal til Nigeria og spredt i tørre deler av det tropiske Afrika (Burkill 1997).

3.3.3 Tradisjonell bruk

I tradisjonell bruk, har planten en hel rekke bruksområder. De fleste deler av planten blir brukt og vanligvis som et dekokt som drikkes. Planten blir brukt rensende både innvortes og utvortes mot lepra. Den brukes mot innvollsorm ved å tømme magen. I Senegal brukes *O. celtidifolia* mot ødem, søvnløshet, munntørhet, som gurglevann mot sår i tannkjøttet og ellers som generelt stimulerende. I Elfenbenskysten brukes planten som febernedsettende. I Tanganyika brukes den mot hodepine og som smertestillende (Burkill 1997).

Under etnofarmakologiske studier i regionene Diolia, Kolokani og Siby i Mali i 2005, ble det nevnt en hel rekke bruksområder for *O. celtidifolia*, der sårheling, malaria, nevrologisk malaria, magesmerter og appetittøkende var de mest brukte. Man tilbereder oftest planten ved å lage dekokt av bladene (Togola, Diallo et al. 2005). De sårhelende egenskapene til planten er gjengitt i flere feltarbeider utført i Mali (Diallo, Sogn et al. 2002), (Inngjerdingen, Nergaard et al. 2004) og (Togola, Diallo et al. 2005). Tradisjonell bruk og toksiske effekter av planten er blitt undersøkt i et feltarbeid i Bamako i Mali. Typiske toksiske effekter assosiert med bruk av *O. celtidifolia* er diaré, skjelvninger og oppkast (Maiga, Diallo et al. 2005).

3.3.4 Forskning på *Opilia celtidifolia*.(Guill. & Perr.) Endl. Ex Walp

Det finnes så langt en begrenset mengde forskningsmateriale publisert vedrørende *Opilia celtidifolia*. Det er utelukkende *in vitro* studier som er utført. Den tidligste forskningen er fra 1992, da en fransk gruppe isolerte og fant frem til strukturen til seks saponniner fra *O. celtidifolia* (Crespin, Olliver et al. 1993). En gruppe i Tanzania undersøkte *O. celtidifolia* for antimikrobiell effekt, ettersom planten brukes som tannkost i landet. Det ble testet for effekt mot mikroorganismene *S. mutans*, *A. viscosus*, *C. albicans*. Det ble ikke funnet noen

antimikrobiell effekt mot noen av mikroorganismene som ble undersøkt (Khan, Ngassapa et al. 2000).

O. celtidifolia har før vist høy komplementfikserende aktivitet og induksjon av doseavhengig NO-frigjøring fra makrofager (Togola, Inngjerdingen et al. 2007). I tillegg er planten blitt undersøkt i en hovedfagsoppgave (Rangjord 2003).

4 Oppgavens målsetting

Målet med oppgaven var todelt:

1. Det skulle utføres studier av polysakkarider fra den maliske medisinplanten *Opilia celtidifolia*. Disse skulle isoleres fra plantematerialet og videre identifiseres med hensyn til karbohydratinnhold, strukturer og aktivitet i biologiske systemer relatert til immunsystemet.
2. Det skulle gjennomføres etnofarmakologiske studier i Mali i Vest-Afrika, der healere skulle intervjues i to distrikter sør i landet. Man skulle samle inn informasjon vedrørende den medisinske bruken av *Opilia celtidifolia*, som ledd i å øke kunnskapen rundt den tradisjonelle bruken av planten.

5 Metoder og materialer

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Vannkvalitet

Det ble benyttet destillert vann i alle metoder når annet ikke var presisert.

5.1.2 Volumreduksjon

Prinsipp:

Man kan redusere volumet til en løsning ved fordamping på rotavapor. Lavt trykk kan dannes ved vannstrålepumpe eller en annen type vakuumpumpe. Flyktige stoffer fordamper og forbindelser i løsningen blir oppkonsentrert.

Utstyr:

Rotavapor (Büchi R-200) med vakuumpumpe og kjøleoppsats
Pærekolbe

Prosedyre:

Løsningene ble dampet inn under vakuum ved hjelp av rotavapor og vannbad på 40 – 50 °C.

5.1.3 Innveiing

Analysevekt:	Sartorius BP 221 S
Overskålsvekt:	OHAUS PORTABLE Advanced

5.1.4 Vask av dialyseslanger

Prinsipp:

Dialyseslangene ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle celluloserester og glycerol.

Reagenser:

2 % NaOH-løsning (VWR International)

0,05 % Natriumazidløsning (NaN_3) (Kebolab)

Utstyr:

Dialyseslanger Spectra/Por[®]3, MWCO 3.500 Da, d:29 mm

Hansker og briller

Kokeplate

Begerglass

Prosedyre:

1. Dialyseslangene ble klippet til ønsket lengde (50-60 cm) og skylt godt i springvann.
2. Slangene ble deretter kokt i 10 minutter i 2 % NaOH-løsning.
3. Etter kokingen ble slangene skylt grundig utvendig og innvendig. Først med springvann, deretter med destillert vann.
4. Slangene ble kokt i destillert vann i 10 minutter.
5. Slangene ble så skylt i destillert vann.
6. Frem til bruk ble slangene oppbevart i 0,05 % natriumazidløsning ved 4 °C for å hindre bakterievekst.

5.1.5 Dialyse

Prinsipp:

Dialyse utføres for å rense løsninger for salter og andre lavmolekylære forbindelser. Stoffer med lavere molekylvekt enn dialyseslangens cut off-verdi (MWCO), vil diffundere ut gjennom porene i slangen. Dette skjer på grunn av konsentrasjonsforskjellen mellom de to væskene. Det er viktig å skifte ut væsken på utsiden av slangene jevnlig for opprettholde konsentrasjonsforskjellen

Reagenser:

Toluen (Prolabo)

Mettet AgNO₃-løsning (10 %)

Utstyr:

Dialyseklemmer

Magnet og magnetrører

Dialyseslanger Spectra/Por[®]3, MWCO 3,500 Da, d: 29 cm

Glasstaver

Begerglass (4-5 L)

Prosedyre:

1. Dialyseslangene ble skylt med destillert vann inni og utenpå, og deretter lagt i destillert vann i 30 minutter for å fjerne rester av natriumazidløsning.
2. Dialyseslangene ble lukket med klemmer i den ene enden.
3. Litt destillert vann ble fylt i slangene for å sjekke at de var tette. Slangene ble hele tiden holdt i kontakt med væske, fordi de lett ødelegges av tørrhet.
4. Slangene ble fylt 2/3 fulle med prøveløsning.
5. 1-2 dråper toluen ble tilsatt som konserveringsmiddel.
6. Luft ble presset ut og slangen lukket med en knute i den åpne enden.
7. Slangene ble lagt i en bøtte med rennende springvann og destillert over natten. (Dette trinnet ble sløffet dersom saltkonsentrasjonen var lav).

8. Slangene ble så overført til et stort begerglass med destillert vann og dialysert i ett døgn under stadig omrøring med magnet. Glasstaver ble plassert i begerglasset for å holde slangene unna magneten. Det ble skiftet vann flere ganger under dialysen.
9. Dialysen ble avsluttet når 2 ml vann fra begerglasset ikke lenger ble blakket av en dråpe AgNO₃-løsning.

5.1.6 Frysetørring

Prinsipp:

Vann ble fjernet fra en prøve ved sublimasjon når prøven fryses ned og settes under vakuum.

Utstyr:

Frysetørker:	Christ Alpha I-4
Metanolbad:	Hetofrig (Heto Birkerød, Danmark)
Pærekolber	(store volum, utvendig frysetørring)
Glassrør	(små volum, innvendig frysetørring)

Prosedyre:

1. Prøveløsningen ble dampet inn på rotavapor til ønsket mengde.
2. Store volum ble frosset ned i pærekolber på metanolbad ved – 40 °C og små volum i glassrør i fryser.
3. Pærekolber ble satt på utenpå frysetørkeren, mens glassrør ble satt inn i frysetørkeren dekket med perforert parafilm.
4. Prøvene ble tatt av frysetørkeren når de hadde nådd romtemperatur. Normal tørketid er 24-48 timer.

5.1.7 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet på:	Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)
	Whirlimixer (Fisons)
	MS2 Minishaker

5.1.8 Sentrifugering

Prinsipp:

Løsninger ble sentrifugert for å separere bunnfall og supernatant, eller for å fjerne luftbobler.

Utstyr:

MSE Bordmodell

Heraeus multifuge 4 KR

Christ 901 (FHI)

CP Centrifuge (Beckman) (FHI)

5.1.9 Filtering

Utstyr:

Glassfiberfilter: Rundfilter Glasfaser no. 110 og 90 mm (Sclacher og Schüll)

Membranfiltre: Acro[®] 50A Device with 0,45 µm Versaspore[®] membran (PALL Gelman Laboratory

Acro[®] 50A Device with 5 µm Versaspore[®] membran (PALL Gelman Laboratory)

Durapore[®] Membrane Filters, 0,22 µm GV (vanndig) (Millipore)

Millex[®] AA Syringe Driven Filter Unit 0,8 , sterile, (Millipore)

Millex[®] HA Syringe Driven Filter Unit 0,45 , sterile, (Millipore)

Millex[®] HA Syringe Driven Filter Unit 0,45 , non-sterile, (Millipore)

Prosedyre:

Ved store væskemengder ble det benyttet nutsj og vakuumsugeoppsats. Sprøyte og filterenhet ved små væskemengder.

5.1.10 pH-målinger

Utstyr:

pH-strips: Neutralit[®] pH 1-14 (Merck)

5.1.11 Degassing/ evakuering av luft

Prosedyre:

1. Degassing med vakuum fra vannstråle eller pumpe i 1 time, eller til man ikke lengre observerte bobler.
2. Degassing med gjennombobling av helium i 10-20 minutter avhengig av volum.

5.1.12 Syrevask av glassutstyr

Prinsipp:

Glassutstyr som har vært lagret i papp- og papiremballasje kan inneholde forurensninger fra cellulose. Dette kan påvirke karbohydratanalyser. For å fjerne disse og andre potensielle karbohydratforurensninger brukes konsentrert saltsyre. Dette spalter polysakkaridene og de fjernes ved grundig skylling i springvann og destillert vann i etterkant.

Reagenser:

Konsentrert saltsyre (37% HCl) (VWR Int. Prolabo)

Springvann

Destillert vann

Utstyr:

Briller og hansker

pH-strips: Neutralit[®] pH 1-14 (Merck)

Stort begerglass

Varmeskap

Prosedyre:

1. Glassutstyret ble fylt/dekket av saltsyre.
2. Henstand i 30 minutter.
3. Glassutstyret ble skylt grundig i springvann, deretter i destillert vann.
4. Glassutstyret ble tørket i varmeskap ved 80°C.

5.1.13 Absorbansmåling**Utstyr:**

BIO-RAD MODEL 3550 mikroplateleser

Thermomax mikroplateleser

Pharmacia Biotech Novaspec II

Helios Epsilon Spectrophotometer, Thermoelectron Corporation

5.2 Isolering av polysakkarider

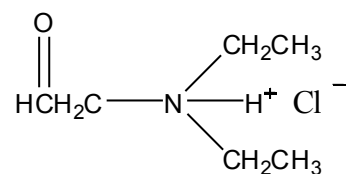
5.2.1 Ionebyttekromatografi – DEAE[®] Sepharose Fast Flow

(Greibrokk 1994; GE Healthcare Bio-Sciences AB 2006)

Prinsipp:

En ionebytter består av en uløselig matriks, med kovalent bundne ioniserte grupper. Til disse gruppene er det knyttet mobile motioner, som reversibelt kan byttes ut med andre ioner med samme ladning. Separasjonen skjer fordi ulike substanser har ulik affinitet til kolonnematerialets ioniske grupper på grunn av ladningsforskjellene. Polysakkarider er bygget opp av forskjellige monosakkarider og vil derfor ha ulik grad av og antall ladde grupper.

DEAE Sepharose[®] Fast Flow er en svak anionbytter med dietylamiñoetyl som kation (figur 5.1). De negativt ladde polysakkaridene binder seg med ulik styrke til disse kationene og kan elueres ut med økende surhetsgrad ved hjelp av en gradient med økende ionestyrke. Nøytrale polysakkarider vil ikke binde seg til kolonnematerialet og elueres derfor ut først.



Figur 5.1 DEAE og kloridmotioenet (modifisert figur fra Pharmacia Fine Chemicals, 1983)

Reagenser:

Destillert vann

2 M NaCl (VWR Int. Prolabo)

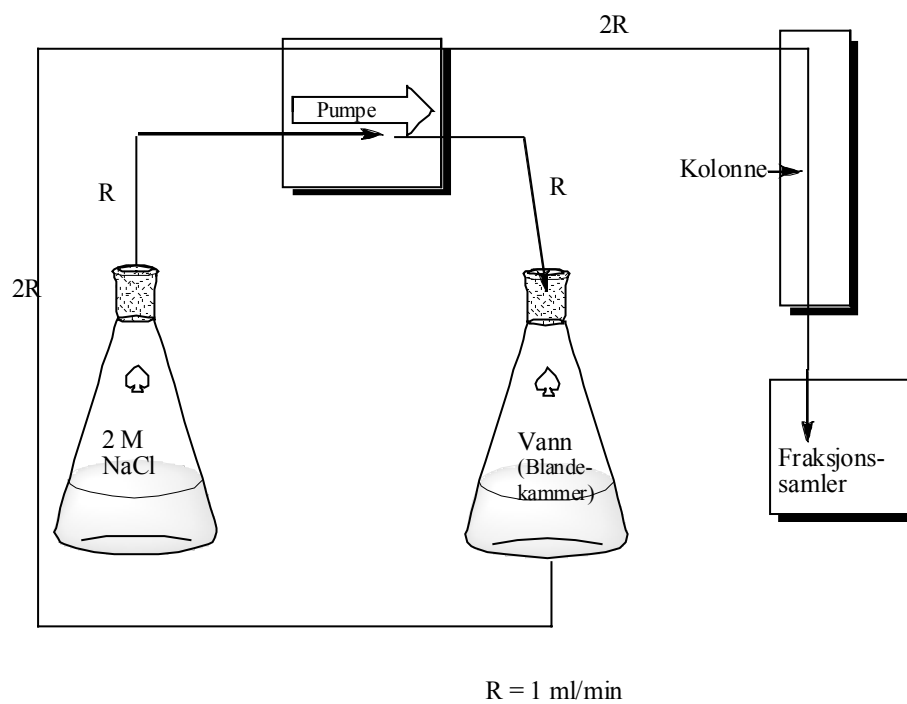
Mettet AgNO₃-løsning

0,05 % NaN₃ (Kebolab)

Alle løsninger som skulle appliseres på kolonnen ble degasset (metode 5.1.11).

Utstyr:

Kolonne:	Pharmacia
Kolonnematrix:	DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech AB)
Kolonnevolum:	H: 28 cm D: 5 cm Ca 550 ml
Pumpe:	Perimax Spetec (Holger teknologi)
Porestørrelse:	45-165 μm
Fraksjonssamler:	LKB Superfrac (Pharmacia)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør RB, plast, 15 ml (Heger AS)
Glasstav	
Nutsj og vakuumsugeoppsats	



Figur 5.2 Oppsett for generering av NaCl-gradient.

Prosedyre:

1. ca. 300 ml prøve ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/min.
2. De nøytrale molekylerne ble eluert ut med 2 kolonnevolum destillert vann og samlet i en stor erlenmeyerkolbe. Flowhastigheten var her 2 ml/min.
3. Fraksjonen ble ikke tatt vare på videre.
4. Sure polysakkarider ble så eluert med NaCl-gradient (0-1,5 M) i 15 timer. (Figur 5.2).

Flowhastigheten fra saltløsningen til blandekar: 1ml/min.

Flowhastigheten fra blandekar til kolonne: 2 ml/min

5. Saltgradienten ble beregnet etter følgende formel:

$$\frac{C}{T} = \frac{(C_0 \times R_1)}{V_0}$$

C = Konsentrasjonsgradient ved tiden T

C₀ = Utgangskonsentrasjonen fra saltkammer

T = Elueringstid etter antall rør og fylningsvolum per rør

R = Hastighet mellom salt – og blandekammer.

V₀ = Startvolum i blandekammer

6. Fraksjonene ble samlet opp i 10 ml reagensrør på fraksjonssamler. Disse ble testet ved hjelp av fenolsvovelsyretest (metode 5.3.4) for å fastsette karbohydratprofilen. Fraksjoner ble slått sammen på grunnlag av dette testresultatet.
7. Kolonnen ble til slutt eluert med 2 M NaCl i ca 2 timer, for å rense kolonnen for de sureste forbindelsene.
8. Fraksjoner ble dampet inn (metode 5.1.2), dialysert (metode 5.1.5) og frysetørket (metode 5.1.6).
9. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

5.2.2 Gelfiltrering

(Greibrokk 1994)

Prinsipp:

I gelfiltrering separeres molekyler etter deres molekylstørrelse. Stasjonærfasen er en gelmatriks med gitt porestørrelse. Mobilfasen fører prøven igjennom kolonnen og forbindelsene i prøven vil ha ulik evne til å passere gjennom porene i gelen, avhengig av størrelsen på dem. Forbindelser som er for store til å passere gjennom porene, føres med mobilfasen mellom partiklene og elueres først ut. Retensjonen i kolonnen øker dermed med synkende molekylstørrelse.

5.2.2.1 Bio-Gel[®] P-6 DG

(Bio-Rad Laboratories 2000)

Prinsipp:

Bio-Gel[®] P-6 DG er en polyakrylamidgel. Den svært hydrofil og nesten uten ladning og er derfor velegnet til å separere ladede forbindelser i henhold til molekylstørrelse. Gelen har et fraksjoneringsområde fra 1000-6000 Da, og den egner seg godt til å separere høymolekylære fra lavmolekylære substanser.

Reagenser:

Destillert vann

Utstyr:

Kolonne:	XK50 (Pharmacia Biotech)
Kolonnematriks:	Bio-gel P-6 DG
Kolonnevolum:	H: 54 cm D: 5 cm Ca 1060 ml
Partikkelstørrelsesfordeling:	90 – 180 µm
Fraksjonssamler:	LKB Superfrac (Pharmacia)
Pumpe:	Perimax Spetec (Holger Teknologi)
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)

Filter: Acro[®] 50A Device with 5 µm Versaspore[®] membrane (PALL
Gelman Laboratory
Acro[®] 50A Device with 0,45 µm Versaspore[®] membran (PALL
Gelman Laboratory

Plastsprøyte (BD)

Glasstav

Prosedyre:

a) Pakking av kolonne

1. Mengde kolonnemateriale ble beregnet ut fra kolonnens volum til 163 gram.
2. 1550 ml destillert vann ble tilsatt gelmaterialet
3. Gelen fikk svulle i 4 timer.
4. Blandingen ble rørt opp og deretter fikk gelmaterialet synke. Usvullet materiale som fløt oppå vannet ble dekantert av.
5. Luft ble fjernet fra blandingen ved hjelp av vannstrålevakuum.
6. Kolonnematerialet ble overført til kolonnen ved å helle langs en glasstav for å unngå luftbobler.
7. Kolonnen ble pumpet gjennom med destillert vann natten over slik at kolonnematerialet fikk pakket seg.

b) Separasjon av prøvemateriale

1. Vannekstaktet ble filtrert 5µm og 0,45 µm.
2. 100 ml prøveløsning ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/min.
3. Det ble samlet fraksjoner på ca 10 ml
4. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av fenolsvovelsyretesten (metode 5.3.4) og deretter slått sammen på bakgrunn av testresultatene.
5. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

5.2.2.2 Bio-gel[®] P-30

(Bio-Rad Laboratories 2000)

Prinsipp:

Bio-gel[®] P-30 er en polyakrylamidgel. Den svært hydrofil og nesten uten ladning og er derfor velegnet til å separere ladede forbindelser i henhold til molekylstørrelse. Gelen har et fraksjoneringsområde fra 2500-40000 Da og den egner seg godt til å separere store polysakkarider.

Reagenser:

Destillert vann

Utstyr:

Kolonne: Pharmacia

Kolonnematriks: Bio-gel P-30

Kolonnevolum: H: 73 cm D: 2,5 cm
Ca 360 ml

Partikkelstørrelsesfordeling: 90 – 180 µm

Fraksjonssamler: LKB Superfrac (Pharmacia)

Pumpe: Perimax Spetec (Holger Teknologi)

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)

Filter: Acro[®] 50A Device with 5 µm Versaspore[®] membrane (PALL
Gelman Laboratory
Acro[®] 50A Device with 0,45 µm Versaspore[®] membran (PALL
Gelman Laboratory

Plastsprøyte (BD)

Glasstav

1. Ekstraktet fra enzymdegraderingen ble filtrert 0,45 µm.
2. Prøveløsning ble satt på kolonnen med en flowhastighet på 0,33 ml/min.
3. Det ble samlet fraksjoner på ca 5 ml

4. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av FSS (metode 5.3.4) og deretter slått sammen på bakgrunn av testresultatene. De respektive fraksjonene ble etter sammenslåing frysetørket.

5.2.2.3 Sephacryl™ S-400 HR

(GE Healthcare 2007)

Prinsipp:

Sephacryl™ HR geler består av allyldekstran kovalent tverrbundet med N,N-metylen-bisakrylamid. Den er hydrofil og rigid, med nøye kontrollert porestørrelse og minimal uspesifikk absorpsjon. Høy elueringshastighet tåles. Fraksjoneringsområdet er mellom 10 000 og 2 000 000 Da for dextraner, noe som gjør den velegnet for separasjon av polysakkarider.

Reagenser:

Destillert vann

10 mM NaCl – løsning (regenerering av kolonnen)

Utstyr:

Kolonne: Pharmacia XK 26/100

Kolonnematriks: Sephacryl™ S-400 HR

Kolonnevolum: H: 90 cm D: 5,0 cm
ca 450 ml

Pumpe: Pharmacia LKB Pump P-1

Filter: Acro® 50A Device with 5 µm Versaspore® Membrane (PALL Gelman Laboratory).

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør, 15 ml (Heger AS)

Fraksjonssamler: Frac 920 (Amersham Biosciences)

Sprøyte, 10 ml (BD)

Glasstav

Prosedyre:

1. Kolonnematriksen ble tilsatt destillert vann, ristet opp og satt på sug i ca 2 timer for å fjerne luft.

2. Kolonnen ble klargjort for pakking, og matriksen ble helt på via en glasstav for å hindre at luft ble blandet inn.
3. Det ble eluert med degasset, destillert vann natten over så kolonnen fikk pakket seg tilstrekkelig.
4. 10 ml prøveløsning ble filtrert 0,45 µm og applisert kolonnen ved ca 1 ml/min.
5. Prøven ble eluert med degasset, destillert vann ved 1 ml/min og fraksjoner på 10 ml ble samlet opp.
6. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av FSS (metode 5.3.4) og deretter slått sammen på bakgrunn av testresultatene.

5.2.2.4 PD-10

(GE Healthcare Biosciences AB 2007)

Prinsipp:

PD-10 er ferdigpakkede kolonner bestående av Sephadex™ G-25 medium med fraksjoneringsområde 1000-5000 Da og benyttes til desalting av prøver.

Reagenser:

Destillert vann

0,05 % NaN₃-løsning (Kebolab)

Utstyr:

Kolonne:	PD-10 (GE Healthcare)
	H: 5 cm D: 1,5 cm
Kolonnematriks:	Sephadex™ G-25
Filter:	Acro® 50A Device with 0,45 µm HT
Oppsamlingsrør:	Trombotestrør, 7 ml (Heger AS)
Skilletrakt	
Plastsprøyte, 10 ml (BD)	
Finnpipette®, 1 ml	

Prosedyre:

1. Ca 25 ml destillert vann ble dryppet igjennom kolonnen for å ekvibrere kolonnen.
2. Prøven (høyst 2,5 ml) ble applisert kolonnen med plastsprøyte.

3. Det ble eluert med destillert vann og samlet opp fraksjoner på ca 0,5 ml.
4. Hvert rør ble testet for karbohydratinhold ved hjelp av fenolsvovelsyretest (metode 5.3.4). Ønskede fraksjoner ble tatt vare på.
5. Prøvene ble frysetørket (metode 5.1.6) for videre analyse.

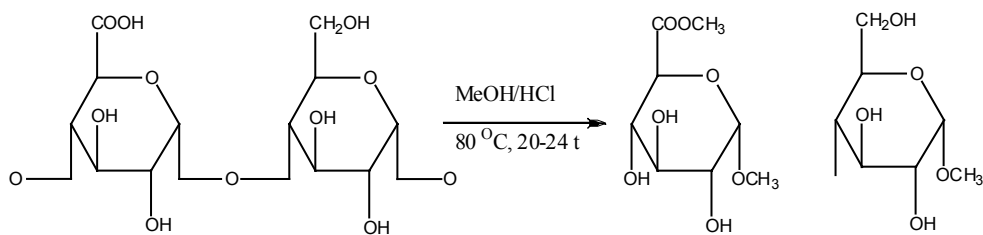
5.3 Kvantitative og kvalitative tester på karbohydratinhold

5.3.1 Metanolyse

(Chambers and Clamp 1971)

Prinsipp:

Glykosidbindingene brytes i et surt, vannfritt metanolholdig miljø og polysakkaridene spaltes til monosakkarider. OH-gruppen ved C1 metyleres og COOH-grupper i C6-posisjon forestres med metylgrupper. Reaksjonen skjer i vannfritt miljø for å hindre hydrolyse.



Figur 5.3 *Metanolyse av en glykosidbinding mellom et surt og et nøytralt monosakkarid i en polysakkaridkjede.*

Reagenser:

4 M HCl i MeOH (VWR Int. Prolabo) (Sigma-Aldrich)

Mannitol (1,0 µg/µl) i 1 M HCl i MeOH (intern standard)

Vannfri MeOH (Sigma-Aldrich)

Utstyr:

Alt glassutstyr syrevasket (metode 5.1.12)

Supelcorør (4 ml) med teflonbelagt (PTFE/liner) skrukork (Supelco)

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

2 ml glasspipette med peleusballong

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med nitrogengass

P₂O₅-evakuert vakuumeksikator

Kanyle

Parafilm

Prosedyre:

1. 0,5-1,0 mg prøve ble veid inn i et syrevasket supelcorør.
2. Supelcorøret ble dekket med perforert parafilm og tørket under vakuum i - P₂O₅-eksikator i minimum 24 timer ved romtemperatur.
3. 1 ml 4 M HCl i MeOH og ca 100 µl mannitol-løsning (minst 10 % av innveidd mengde prøve) ble tilsatt prøven.
4. Korken ble skrudd til og satt i varmeskap ved 80 °C i 20-24 timer. Etter 15 minutter ble korken igjen skrudd til for å hindre metanolenfordamping.
5. Prøven ble dampet inn til tørrhet under N₂-gass ved ca 40 °C.
6. 200 µl vannfri MeOH ble tilsatt prøven, som igjen ble tørket under N₂-gass.
7. Punkt 6 ble gjentatt 2 ganger til.
8. Prøven ble tørket i P₂O₅-eksikator i minimum 1 time før TMS-derivatisering.

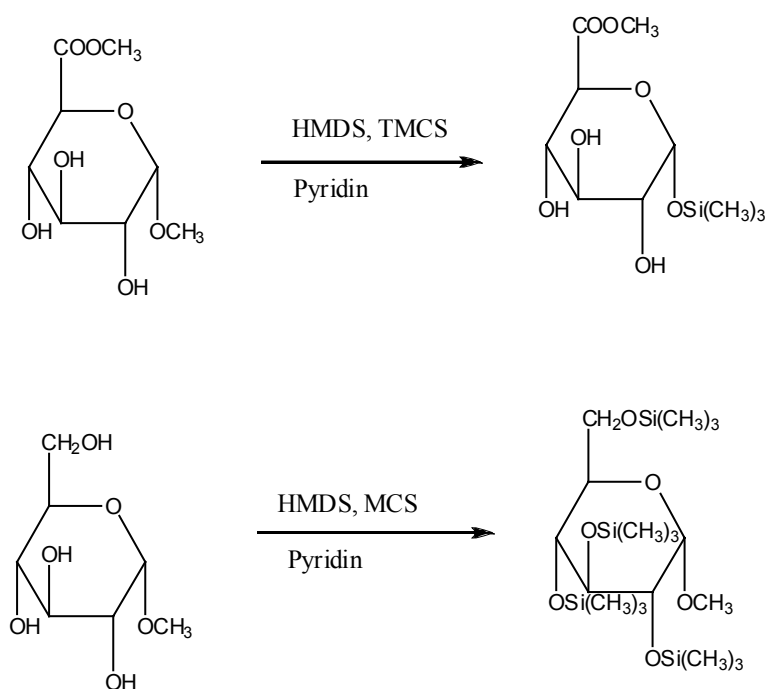
5.3.2 TMS-derivatisering

(Sweeley, Bentley et al. 1963)

Prinsipp:

Monosakkarider er polare og lite flyktige, og derfor dårlig egnet for gasskromatografisk analyse. Derivatisering der de frie hydroksylgruppene reagerer med trimetylklorosilan og heksametyldisilazan fører til dannelse av flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter som

gjør forbindelsene velgnet for analysen. Dette hindrer også uønskede kolonneinteraksjoner som kan gi adsorpsjon og haledannelse (figur 5.4).



Figur 5.4 Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens.

Reagenser:

TMS-reagens:	Trimetylklorosilan (TCMS) (Supelco)	1 ml
	Heksametyldisilazan (HMDS) (Aldrich)	2 ml
	Pyridin, vannfri (Merck)	5 ml

Utstyr:

Brand Transferpettor 100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries til transferpettor (syrevasket etter metode 4.1.12)

Whirlimixer (Fisons)

Prosedyre:

1. Prøven fra metode 5.3.1 ble tilsatt 200 µl TMS-reagens og mikset godt på whirlimixer.
2. Prøven ble satt til henstand i minst 30 minutter i romtemperatur før gasskromatografisk analyse. (Prøver som ikke skulle kjøres samme dag ble ikke tilsatt TMS-reagens).

5.3.3 Gasskromatografi

(Rasmussen 1994)

Prinsipp:

Gasskromatografi (GC) er en kolonnekromatografisk metode. Forbindelser som skal analyseres må foreligge på flyktig og termisk stabil form. De separeres på bakgrunn av flyktighet, løslighet i stasjonærfasen og temperatur. Mobilfasen i GC kalles bæregass og frakter flyktige stoffer gjennom kolonnen. Den må være inert, og skal derfor ikke reagere med prøven eller stasjonærfasen. Stasjonærfasen i GC kan være to typer. Gass-fast stoffkromatografi (GSC), der stasjonærfasen er et adsorbsjonsmiddel og gass-væskerkromatografi (GLC), der stasjonærfasen er en ikke-flyktig væske. Sistnevnte er den mest anvendte ved GC-analyser. Det er en væske med god termisk stabilitet og kan derfor brukes over det store temperaturområdet som benyttes under analysen (140-300 °C).

Før analysen settes i gang, varmes injektoren opp. Når prøven injiseres vil den fordampe og føres til kolonnen ved hjelp av bæregassen. Forbindelsene i prøven separeres i kolonnen og ved passering av detektoren generes et elektrisk signal, som videre forsterkes før det skrives ut som et kromatogram.

Monosakkarider kan foreligge på både pyranose- og furanoseform, som igjen kan ha α - og β -konfigurasjon. I tillegg kan monosakkaridene ha åpen struktur og de ulike konformasjonene vil interagere forskjellig med stasjonærfase. Siden de retarderes ulikt, vil et monosakkarid kunne gi opphav til flere topper. Dette gir et spesifikt mønster som kan sammenlignes med retensjonstider og mønster fra tidligere kjørte standardkurver. Disse kan brukes til identifikasjon av monosakkaridene. Analysen utføres med intern standard for å korrigere for variasjoner og tap som kan ha skjedd under prøveopparbeidelsen.

Utstyr:

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 Vega Series 2. Programmeringsenhet: ICU 600
Integrator:	Shimadzu C-R6A
Detektor:	FID

Injektor: Splitt: Splittless
Kolonne: DB-5 (J&W Scientific) "Fused Silica" kapillærkolonne
Lengde: 25 m
Indre diameter: 0,32 mm
Filmtykkelse: 0,25 µm
Bæregass: Helium
Flow: Kolonne: 1,8 ml/min
Splitt flow: ~11 ml/min
Splittforhold: 1:6
Injeksjonsvolum: 0,5-1,0 µl
Injektortemperatur: 260 °C
Detektortemperatur: 310 °C

Temperaturprogram: 140 °C $\xrightarrow{1^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 170 °C $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 °C $\xrightarrow{30^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 °C

Prosedyre:

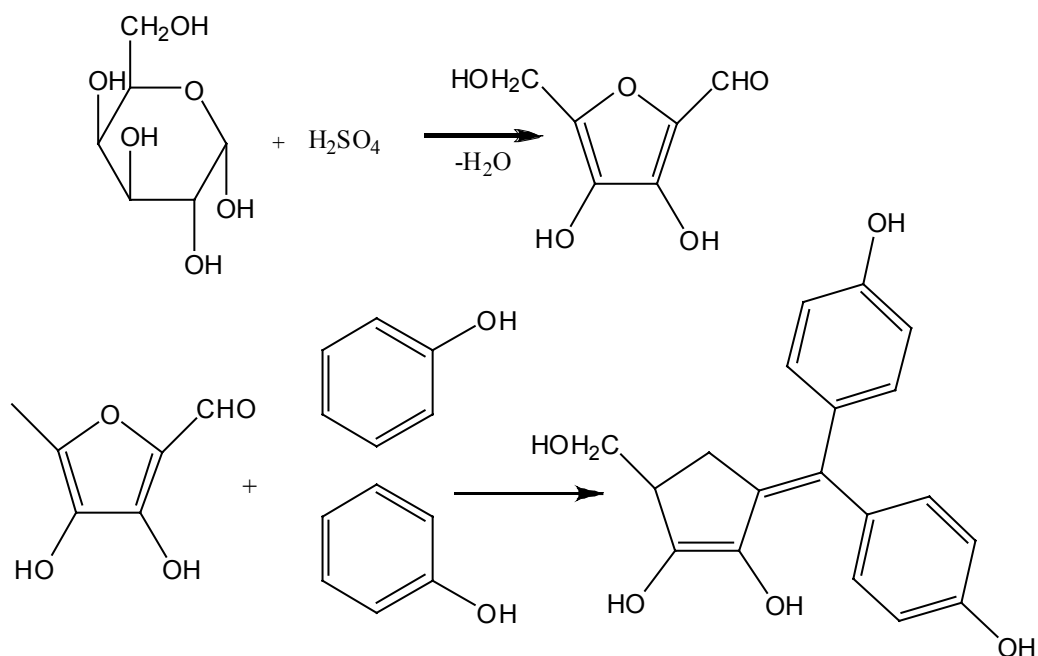
1. Det ble åpnet for gasstrømmene og GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble skylt 3 ganger med pyridin.
3. 0,5-1,0 µl av den TMS-derivatiserte prøven (metode 5.3.2) ble injisert.
4. Sprøyten ble skylt 3 ganger med pyridin etter hver prøveinjeksjon.
5. Gassen til FID ble stengt etter siste kjøring. Hele programmet tok ca 50 minutter.

5.3.4 Fenolsvovelsyretesten

(Dubois 1956; Sturgeon 1990)

Prinsipp:

Fenolsvovelsyretesten benyttes til å bestemme innhold av karbohydrat i en løsning. På denne måten kan man bestemme elueringsprofilen til karbohydrater. Konsentrert svovelsyre spalter polysakkarider som omdannes til furfuraldehyder. Disse danner i reaksjon med fenol et gulfarget kompleks (figur 5.5). Løsningen absorberer lys ved 490 nm og dette kan detekteres ved hjelp av et spektrofotometer.



Figur 5.5 Reaksjonen mellom et monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som deretter kondenserer med to fenolmolekyler til et gulfarget kompleks.

Reagenser:

Fenol 4 % (Merck)

Konsentrert svovelsyre (95-97 % H₂SO₄) (Merck)

Utstyr:

Finnpipette 40-200 µl

Glassrør, 6 ml

Whirlimixer (Fisons)

Mikrotiterplater

BIO-RAD MODEL 3550 MICROPLATEREADER

Briller, hansker og labfrakk

Prosedyre:

1. 100-200 μ l prøveløsning av hver fraksjon ble overført til glassrør og tilsatt 200 μ l fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Blandingen ble mikset på whirlimixer.
3. Blandingen ble satt til henstand i 30 minutter ved romtemperatur.
4. 100 μ l fra hvert rør ble overført til hver sin brønn på mikroplaten.
5. Absorbans ble målt ved 490 nm.

5.3.5 FPLC – superose 6

(GE Healthcare Bio-Sciences AB 2006)

Prinsipp:

FPLC er en metode basert på gelfiltreringsprinsippet, som er beskrevet generelt under metode 5.2.2. Superose 6-matriksen består av agarose. Den kan anvendes i pH-området fra 4-10 og er egnet til å separere molekyler i størrelsesorden opp til 5 000 000 Da.

Molekylvektfordelingen for polysakkaridprøver ble bestemt ved hjelp av FPLC og dekstraner med kjent molekylvekt. Det ble lagd en standardkurve der logaritmen til molekylvekt av dekstranstandardene ble plottet mot elueringsvolumet.

Reagenser:

Elueringsvæske: 10 mM NaCl, (WWR Int. Prolabo) filtrert 0,22 μ m og degasset med helium

Vask av kolonnen: 50 % eddiksyre, filtrert 0,22 μ m (Prolabo)

Utstyr:

AKTA-FPLC (Amersham Pharmacia Biotech)

Kolonne: Tricorn Superose 6 10/300 GL (prepacked)

Volum: 24 ml

Pumpe: P-920

Injektor: Valve Inv-907

Monitor: UPC-900

Fraksjonssamler: Frac-900 (Amersham Pharmacia Biotech)

Dataprogram: UNICORN V4.00.16

Skriver: Hpdeskjet 980 cxi, professional series

Sprøyter, 1 ml (BD)

Oppsamlingsrør: Trombotestrør, 7 ml (Heger)

Millex[®] HA Syringe Driven Filter Unit, 0,45 µm, non-sterile

Durapore[®] Membrane Filters, 0,22 µm GV (vanndig), (Millipore)

Systembetingelser:

Konsentrasjon på prøve: 1 mg/ml

Elueringshastighet: 0,5 ml/min

Injeksjonsvolum: 0,5 ml

Antall rør: 36

Standarder:

Det ble brukt 6 dekstraner med kjent molekylvekt som standarder. Disse ble brukt til å lage en standardkurve til å beregne omtrentlig molekylvekt i prøveløsningene utifra. (tabell 5.1).

Tabell 5.1 Oversikt over molekylvekt av dekstranstandardene som ble brukt i forsøket.

	Mw (Da)	Mn (Da)
T500, lot 9307	475.000	153.000
T250 (Dextran Lot 8374)	233.000	123.000
31422	150.000	
31421	80.000	
31420	50.000	
B512 (Dex 40T Fr 7, 8030)	19.000	18.500
B512 (Dex PD 5558 Fr. 1)	11.700	10.750
B512 (Fraction 11640-II-IV)	5.600	3.170
B512 (Dex fr 11640-I-IV)	2.360	2.000

Prosedyre:

1. 2 mg prøve eller dekstran ble løst i 2 ml 10 mM NaCl og filtrert 0,45 µm.
2. 0,5 ml ble injisert i FPLC og eluert ved 0,5 ml/min.
3. 36 fraksjoner à 1,0 ml ble samlet og karbohydratinnholdet ble bestemt ved hjelp av FSS (metode 5.3.4).

5.4 Strukturoppklaring

5.4.1 Enzymatisk degradering av pektin

(Voragen, Daas et al. 2000; Nergaard, Matsumoto et al. 2004)

Prinsipp:

Enzymer med kjent aktivitet ble i to omganger brukt for å skille henholdsvis terminale arabinoseenheter og galaktoseenheter fra resten av pektinet. Først ble arabinofuranosidase benyttet og deretter galaktosidase. De forgrenede områdene i prøven ble skilt fra de andre delene etter enzymdegradering, ved gelfiltrering enten på PD-10-kolonne (5-10 mg) eller Bio-Gel P-30-kolonne (30-150 mg).

Reagenser:

30 mM Acetatbuffer, pH = 4,2

Ara "B" 4002, 10 mg/ml, exo- α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, fra Waageningen, Nederland

β -galaktosidase, 8000 U/mg, 4000 U/ml (fra *Aspergillus niger*, Lot 60102, Megazyme, Irland)

Utstyr:

Små erlenmeyerkolber

Magnet og magnetrører

Varmeskap

pH-strips: Neutralit[®] pH 1-14 (Merck)

Millex[®] HA Syringe Driven Filter Unit 0,45 , non-sterile (Millipore)

Heraeus multifuge 4 KR

Prosedyre arabinofuranosidase:

1. 5 mg frysetørket prøve ble løst i 1 ml acetat-buffer og tilsatt 10 μ l enzym.
2. Løsningen ble inkubert i 72 timer ved 40 °C i varmeskap.
3. Etter 36 timer ble ytterligere 3 μ l enzym tilsatt løsningen.
4. Løsningen ble kokt opp for å inaktivere enzymet.
5. Løsningen ble avkjølt og etter sentrifugering (metode 5.1.8) ble supernatanten filtrert 0,45 μ m.
6. Løsningen ble satt på en PD-10 kolonne (metode 5.2.2.4) eller Biogel P30 (metode 5.2.2.2) for separasjon.
7. Karbohydratprofilen ble bestemt ved hjelp av FSS (metode 5.3.4).
8. Prøven ble frysetørket (metode 5.1.6) og deretter ble det utført tester med tanke på karbohydratsammensetning (metode 5.3.1-5.3.3), struktur (metode 5.4.2) og biologisk aktivitet (metode 5.5.1 – 5.5.3).

Prosedyre β -galaktosidase:

1. 5 mg frysetørket prøve ble løst i 1 ml acetat-buffer og tilsatt 10 μ l enzym.
2. Løsningen ble inkubert i 72 timer ved 40 °C i varmeskap.
3. Etter 36 timer ble ytterligere 3 μ l enzym tilsatt løsningen.
4. Løsningen ble kokt opp for å inaktivere enzymet.
5. Løsningen ble avkjølt og etter sentrifugering (metode 5.1.8) ble supernatanten filtrert 0,45 μ m.
6. Løsningen ble satt på en PD-10 kolonne (metode 5.2.2.4) eller Biogel P30 (metode 5.2.2.2) for separasjon.
7. Karbohydratprofilen ble bestemt ved hjelp av FSS (metode 5.3.4).
8. Prøven ble frysetørket (metode 5.1.6) og deretter ble det utført tester med tanke på karbohydratsammensetning (metode 5.3.1-5.3.3), struktur (metode 5.4.2) og biologisk aktivitet (metode 5.5.1 – 5.5.3).

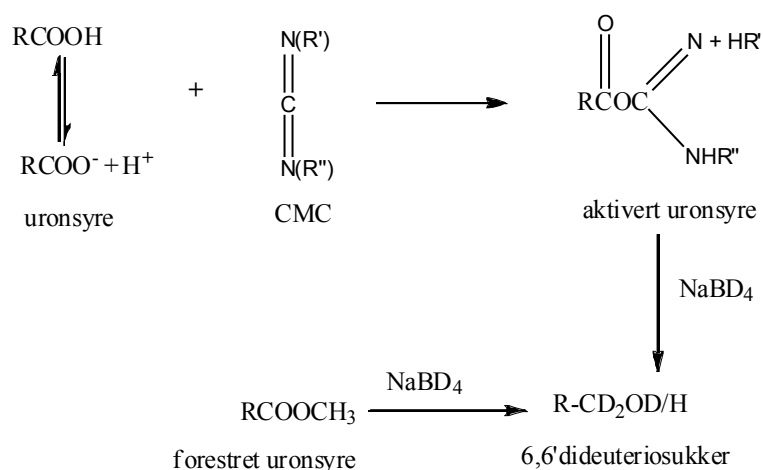
5.4.2 Bestemmelse av bindingsforhold

5.4.2.1 Karboksylsyre-reduksjon

(Kim and Carpita 1992)

Prinsipp:

Før metylering (metode 5.4.4.2) må forestrede polysakkarider og frie karboksylsyregrupper på galakturonsyre-enheten reduseres. Forestrede uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer ved bruk av NaBD₄, mens frie uronsyrer aktiveres ved hjelp av carbodiimid før reduksjon. Produktene som dannes er 6,6-dideuteriosukker (Figur 5.6). De kan skilles fra nøytrale sukkerer ved GC-MS-analyser, fordi de vil ha fragmenter med molekylvekt M+2. GS-MS-analysen vil gi det totale antall uronsyrer, både esterbundne og frie.



Figur 5.6 *Aktivering og reduksjon av karboksylsyregrupper i uronsyre og reduksjon av forestret uronsyre.*

Reagenser:

500 mM imidazol-HCl

100 mg/ml NaBD₄ (Isotec) i imidazol-HCl (nylaget)

Iseddik p.a. (Merck)

0,2 M MES (2-[N-morfolino]etansulfonsyre), pH 4,75 (Sigma)

2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9 (Sigma)

500 mg/ml carbodiimid (1-cykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)-carbodiimid-meto-p-toluensulfonat) (nylaget)

Oktanol (antiskummiddel), (Merck)

Utstyr:

Metyleringsrør (syrevasket etter metode 4.1.12)

Is

pH-papir

Dialyseslanger - Spectra/Por[®]3, MWCO 3.500 Da, d:29 mm

MS2 Minishake IKA[®]

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

Finnpipetter[®] (Labsystems)

Prosedyre:

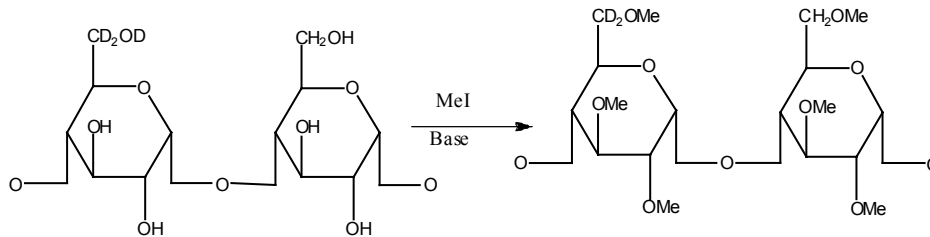
1. 2 mg prøve ble løst i 5 ml iskald imidazole-HCl
2. Karboksylsyrene ble redusert ved å tilsette 1 ml nylaget 100 mg/ml NaBD₄ i imidazole-HCl porsjonsvis à 300 µl + 300 µl + 400 µl. Prøvene ble mikset og satt på is i 5 minutter etter 1. og 2. tilsetning og 30 minutter etter 3. tilsetning.
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved langsom tilsetning av 5 x 100 µl iseddik. Nøytraliseringsreaksjonen ble antatt fullført når løsningen ikke lenger boblet og pH var < 7.
4. Prøvene ble dialysert i destillert vann etter metode 5.1.5 over natten.
5. Prøvene ble overført til glassrør og frysetørket i 48 timer.
6. De frysetørkede prøvene ble løst i 1 ml destillert vann og deretter tilsatt 200 µl MES og 400 µl nylaget 500 mg/ml CMC. Prøvene ble deretter inkubert i 3 timer ved ca 25 °C.
7. Prøvene ble tilsatt 1 ml 2M TRIZMA og 4 dråper oktanol og avkjølt på is.
8. Deretter ble det tilsatt 1 ml nylaget 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH.
9. Prøvene ble inkubert over natten ved 4 °C.
10. Prøvene ble dialysert i 3 timer i rennende springvann og deretter over natten i destillert vann (metode 5.1.5).
11. Prøvene ble overført til glassrør og frysetørket (metode 5.1.6) i 48 timer.

5.4.2.2 Metylering

(Ciucanu 2006)

Prinsipp:

Frie hydroksylgrupper i polysakkarider metyleres vha metyljodid etter deprotonering i sterkt basisk miljø (figur 5.7).



Figur 5.7 Metylering av hydroksylgrupper.

Reagenser:

Vannfri MeOH (Sigma-Aldrich)

Dimetylsulfoksid (DMSO) (Merck)

NaOH-pellets, (tørre, oppbevares i P₂O₅-eksikator) (Merck)

Metyljodid (Fluka)

100 mg/ml natriumtiosulfat (Merck) i destillert vann

Kloroform (Prolabo)

Utstyr:

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

Brand Transferpettor 200 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

MS2 Minishake IKA[®]

Varmeenhet til tørking under nitrogengass: Reacti-Therm[™] III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med nitrogengass

Vibrax-VXR (IKA Labortechnik) ristestativ

Agatmorter

MS2 Minishaker

Sentrifuge: MSE Bordmodell

Ultralydbad

Prosedyre:

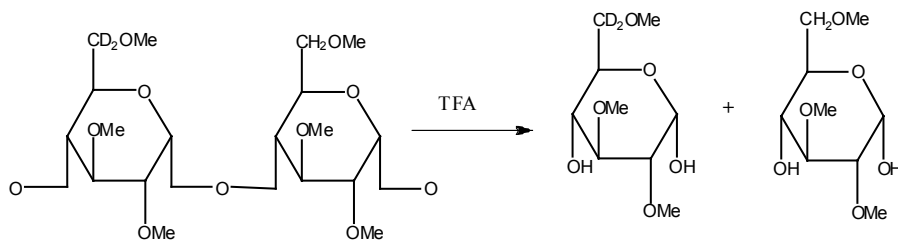
1. Den frysetørkede prøven fra karboksylsyre-reduksjonen (metode 5.4.2.1) ble løst i 200 μ l vannfri MeOH og tørket under N_2 -gass for å dehydrere prøven.
2. Prøven ble tilsatt 500 μ l DMSO og satt til risting i 20 minutter ved 200 rpm for å løse sukrene. Dårlig løselige prøver ble sonikert på ultralydbad og varmet i varmeskap.
3. NaOH-pellets ble revet med DMSO i agatmorter til konsentrasjonen var 120 mg/ml.
4. 500 μ l DMSO/NaOH-suspensjon ble tilsatt prøven uten å berøre glassveggen.
5. Prøven ble flushet med N_2 -gass og deretter satt til risting i 30 minutter ved 200 rpm.
6. Prøven ble tilsatt 100 μ l metyliodid og satt til risting i 10 minutter ved 200 rpm.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. Prøven ble tilsatt 200 μ l metyliodid og satt til risting i 20 minutter ved 200 rpm.
9. Deretter ble prøven tilsatt 2 ml kloroform og 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat i destillert vann. Det ble blandet godt og sentrifugert for å separere fasene.
10. Den øverste fasen ble fjernet (vanndig fase).
11. Kloroformfasen ble vasket med 4 x 5 ml destillert vann. Det ble blandet godt og sentrifugert før vannfasen ble fjernet. Mellomsjiktet tas ikke med.
12. Kloroformfasen ble tørket under N_2 -gass.

5.4.2.3 Hydrolyse

(Kim and Carpita 1992)

Prinsipp:

Metylerede polysakkarider spaltes til monosakkarider ved hydrolyse i surt miljø (figur 5.8).



Figur 5.8 Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA.

Reagenser:

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

Utstyr:

Varmeenhet til tørking under N₂-gass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med N₂-gass

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Varmeskap: Function Line, Heraeus Instruments

MS2 Minishake IKA®

Prosedyre:

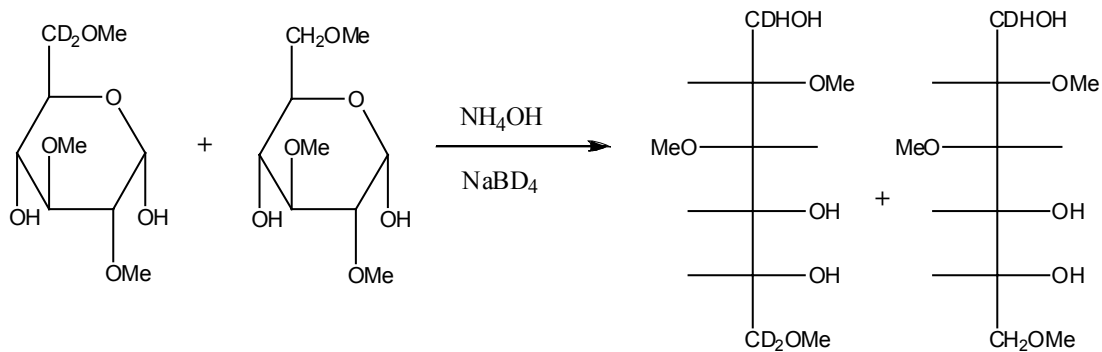
1. Den metylerte prøven fra metode 5.4.2.2 ble tilsatt 500 µl 2,5 M TFA og flushet med N₂-gass.
2. Prøven ble deretter inkubert ved ca. 100 °C i 2 timer, deretter avkjølt og dampet til tørrhet med N₂-gass ved 40 °C.

5.4.2.4 Reduksjon

(Kim and Carpita 1992)

Prinsipp:

Ringstrukturen i monosakkarider brytes ved at det sykliske hemiacetalet reduseres til alditol ved C1 (figur 5.9).



Figur 5.9 Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1.

Reagenser:

2 M NH_3 (Merck)

1 M NaBD_4 (Isotec) i 2 M NH_3 , (nylaget)

Iseddik (Merck)

5 % eddiksyre i MeOH

MeOH (Sigma-Aldrich)

Utstyr:

Ultralydbad

Varmeskap: Function Line, Heraus Instruments

Varmeenhet til tørking under N_2 -gass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med N_2 -gass

Finnpipetter® (Thermo Labsystems), med spisser

MS2 Minishake IKA®

Prosedyre:

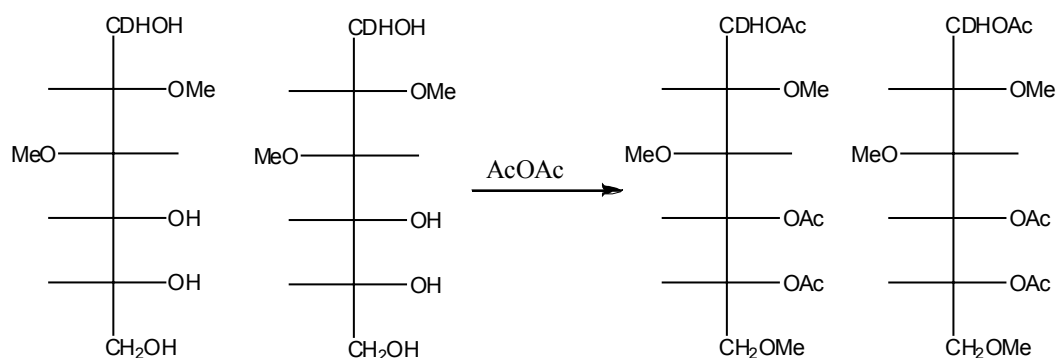
1. Prøven fra metode 5.4.2.3 ble løst i 500 μ l 2 M NH_3 og tilsatt 500 μ l nylaget 1 M NaBD_4 i 2 M NH_3 .
2. Prøven ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før den ble inkubert i 1 time ved 60 $^\circ\text{C}$.
3. Overskudd av reduktant ble ødelagt med tilsetning av 3 x 50 μ l iseddik.
4. Prøven ble tørket under N_2 -gass.
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i MeOH ble tilsatt prøven som deretter ble tørket under N_2 -gass.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml MeOH ble tilsatt prøven for å fjerne borsyren. Prøvene ble deretter tørket under N_2 -gass.
8. Punkt 7 ble gjentatt. Prøven skulle nå være fri for borsyre.

5.4.2.5 Acetylering

(Kim and Carpita 1992)

Prinsipp:

Monosakkaridene som ble dannet ved hydrolyse (metode 5.4.2.3) og reduksjon (metode 5.4.2.4) acetyleres med eddiksyreanhydrid (figur 5.10). Dette gjør molekylene bedre egnet for GC-MS-analyse (metode 5.4.2.6).



Figur 5.10 Acetylering med eddiksyreanhydrid.

Reagenser:

1-metylimidazol (Fluka)

Eddiksyreanhydrid(Merck)

Diklormetan (DCM) (Fluka)

MeOH, vannfri (Sigma-Aldrich)

Utstyr:

MS2 Minishake IKA®

Ultralydbad

Varmeenhet til tørking under N₂-gass: Reacti-Therm™ III Heating Module (Pierce)

Oppsett til tørking med N₂-gass.

Prosedyre:

1. Den reduserte prøven fra metode 5.4.2.4 ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid. Det ble blandet godt og sonikert på ultralydbad og deretter satt til henstand i romtemperatur i 10 minutter.
2. Overskudd av eddiksyreanhydrid ble ødelagt ved tilsetning av 10 ml destillert vann. Det ble blandet godt og prøven ble satt til henstand i 10 minutter.
3. De delvis metylerte sukrene ble ekstrahert med 2 x 1 ml DCM. For hver ekstraksjon ble prøven blandet godt, sentrifugert og DCM-fasen tatt vare på.
4. Ekstraktene ble samlet og tilbakevasket med 2 x 5 ml destillert vann.
5. Diklormetanfasen ble overført til et supelcorør og tørket under N₂-gass.
6. Prøven ble løst i 50 µl vannfri MeOH og analysert ved GC-MS. (Prøver som ikke skulle kjøres samme dag ble froset ned for å hindre MeOH i å fordampe.

5.4.2.6 GC-MS

(Lundanes 1994)

Prinsipp:

Kombinasjonen av gasskromatografi (GC) (metode 5.3.3) med massespektrometri (MS) som detektor gir strukturinformasjon om analyttene i tillegg til separasjon og kvantifisering. Stoffene elueres på GC-kolonnen, og ledes deretter inn i massespektrometerets ionekilde hvor de vanligvis ioniseres til positive molekyllioner av en elektronstrøm. På grunn av høyt energiinnhold er molekyllionene ofte ustabile og vil raskt fragmentere.

GC-MS-analysene ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt.

Utstyr og betingelser for GC-MS-systemet:

GC-MS: Fisions GC 8065 (Fisions Instruments)

Spekteret ble kjørt ved 70 eV

Detektor: Masseselektiv detektor

GC-kolonne: SPB-1 Fused Silica

Injektor: Splitt-splittless

Filmtykkelse: 0,20 μm

Indre diameter: 0,20 mm

Lengde: 30 meter

Temperaturområde: 80-300 $^{\circ}\text{C}$

Injektortemperatur: 250 $^{\circ}\text{C}$

Viktige primærioner: 45, 47, 117, 118, 129, 131, 161, 162, 163, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 307

Temperaturprogram: $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ $300\text{ }^{\circ}\text{C}$
5 min 25 min

5.4.3 Modifisert Lowry proteinbestemmelse

(Lowry, Rosebrough et al. 1951)

Prinsipp:

Proteiner felles ut i nærvær av trikloreddiksyre og natrium-deoksykolat. Blandingen sentrifugeres og supernantanten fjernes. Supernanten inneholder en del interfererende komponenter. Proteiner reagerer med Folin Ciocalteus fenolreagens. Det dannes en blå farge som skyldes reduksjonsprodukter dannet fra den blandede molybden-wolframsyren i reagenset. Sensitiviteten for protein økes ved tilsetning av kobber. Kobberioner danner chelat med peptidstrukturen og letter derved elektrontransporten til den blandede syren. Absorbansen måles ved 660 nm.

Reagenser:

2 % Natriumdeoxykolat i destillert vann

24 % Trikloreddiksyre i destillert vann

Lowry A: 2 % Na_2CO_3 (Merck) i 0,1 M NaOH

Lowry B: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) i
100 ml 1 % Na-citrat

Lowry C: 25 ml Lowry A + 0,5 ml Lowry B

Lowry D: 2 M Folin Ciocalteus Fenolreagens (Merck)

Standard: 4, 15, 30 og 40 μl av Bovint serum albumin (BSA) 1,26 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Blindprøve: H_2O

Prøveløsning: 0,2 – 1,4 mg frysetørket prøve

Utstyr:

Whirlimixer

Finnpipette™ 1-40 μl (Labsystems)

Finnpipette™ 40-200 μl (Labsystems)

Finnpipette™ 200-1000 μl (Labsystems)

Reagensglass

Pasteurpipette

Helios Epsilon Spectrophotometer, Thermoelectron Corporation

Prosedyre:

1. Prøver og standarder ble fortynnet til 3 ml med destillert vann.
2. Hvert rør ble tilsatt 25 µl Na-deoxykolat. Det ble blandet godt på whirlimixer før rørene ble satt til henstand i 15 minutter.
3. Løsningene ble tilsatt 1 ml trikloreddiksyre og blandet godt på whirlimixer.
4. Løsningene ble sentrifugert (metode 5.1.8) ved 3300 g i 30 minutter.
5. Supernatanten ble fjernet forsiktig med pasteurpipette. Pellets ble så løst i 1,5 ml Lowry C og blandet godt på whirlimixer.
6. Det ble tilsatt 150 µl Lowry D, som øyeblikkelig ble blandet godt på whirlimixer.
7. Løsningene ble satt til henstand i mørke i 45 minutter.
8. Absorbansen ble målt ved 660 nm (metode 5.1.13).
9. Standardkurve ble tegnet opp og mengde protein i prøven ble bestemt ut fra denne.

5.4.4 IR – spektroskopi

(Pedersen-Bjergaard 1999)

Prinsipp:

IR- spektroskopi er elektromagnetisk stråling i bølgelengdeområdet 800-300000 nm, og er vesentlig mindre energirik enn UV/VIS-stråling. Dette betyr at IR-stråling ikke er tilstrekkelig energirikt til å kunne fremkalle elektronisk eksitasjon. Bestrålingen med IR-stråling kan derfor kun skape vibrasjoner og rotasjoner i molekylene under analysen. IR-spektrene er informasjonsrike og egner seg godt til strukturoppklaring og identifikasjon.

Organiske forbindelser absorberer elektromagnetisk stråling avhengig alt etter hvilke funksjonelle grupper og kjemiske bindinger stoffene inneholder. Området for avlesning av funksjonelle grupper befinner seg fra 1200-3600 cm^{-1} . Ulike funksjonelle grupper gir karakteristiske absorpsjonsbånd.

IR-spektroskopianalysen ble gjort under veiledning av John Remme ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi.

Reagenser:

Tørket kaliumbromid, KBr

Utstyr:

Morter og pistill

C-30 tablettpresse, Research & Industrial Instruments Company

IR-408 Infrared Spectrophotometer SHIMADZU

Prosedyre:

1. 1 mg frysetørket prøve ble blandet godt med ca 100 mg KBr i en morter.
Blandingen ble grundig revet.
2. Pulverblandingen ble deretter presset til en gjennomsiktig tablett i en høytrykkspresse ved 10 tonn/cm³.
3. Tablettens IR-spekter ble tatt opp ved måling i IR-spektrofotometer.

5.5 Biologisk aktivitet

5.5.1 Komplementfikseringstest

(Samuelsen, Paulsen et al. 1996; Yamada and Kiyohara 1999; Michaelsen, Gilje et al. 2000)

Komplementfikseringstesten ble utført ved Nasjonalt Folkehelseinstitutt under veiledning av Terje E. Michaelsen.

Prinsipp:

I komplementfikseringstesten måles reduksjon i hemolysegrad for sensitiviserte røde blodceller fra sau (SRBC). Humant komplement kan reagere med immunkomplekser av SRBC og antigen fra kanin og dermed aktiveres komplementkaskaden via den klassiske aktiveringsveien og til slutt lyseres de røde blodcellene. Polysakkarider i prøvene får anledning til å interagere med det humane komplementet før blodcellene tilsettes. Siden både hemming og aktivering av komplementsystemet vil medføre lavere lyseringsgrad, er det ikke mulig å slå fast med en enkelt prøve hvilken mekanisme som er dominerende. Ved hemming av komplementsystemet er det mindre komplement tilgjengelig for lysering. Ved aktivering forbrukes komplement og mindre er dermed tilgjengelig for lysering.

Reagenser:

0,9 % NaCl (Merck)

Destillert vann

Veronal/BSA buffer: CFT pH 7,2 med 2 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) 30 %
og 0,02 % NaN₃-løsning

Saueblod: Hvit 142 15.02.07

Hvit 131 11.10.07

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor serum hemolysis
Fortynnet 1:10 med veronalbuffer

Komplementkilde: ECG 29.11.05

Standard: *Plantago Major* L, fraksjon II (PMII), 1 mg/ml

Utstyr:

Sentrifuger:	CP centrifuge (Beckmann) GLC-4, General Laboratory Centrifuge (SORVAL®)
Varmeskap med risteplater:	Termaks, 37 °C
Finnpipetter® (Thermo Labsystems), med spisser	
Mikrotiterplater	96 brønner med rund og flat bunn (NUNC™ MICROWELL PLATE/ NUNC™; NUNCLEON™ surface)
Mikroplateleser:	Thermomax
Whirlimixer (Fisons)	

Prosedyre:**a) Vasking av saueblodceller**

1. 100 µl saueblod per plate ble tatt ut uten å slemme opp blodet.
2. Blodet ble vasket to ganger med 0,9 % NaCl-løsning og en gang med veronal/BSA-buffer. Det ble sentrifugert, og gammelt vaskevannet ble fjernet.

b) Sensibilisering av saueblodceller

1. 5,925 ml veronal/BSA-buffer ble tilsatt 15 µl Virion 9020 Amboceptor og 60 µl vaskede blodceller (til sammen 6 ml som er nok til en plate).
2. Blandingen ble inkubert under risting i 30 minutter ved 37 °C.
3. Blodet ble vasket to ganger med 0,9 % NaCl-løsning og en gang med veronal/BSA-buffer. Det ble sentrifugert, og gammelt vaskevannet ble fjernet.
4. Siste gang ble vaskevannet fjernet og blodet fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA-buffer. (Forutsetter at 15 µl antistoff er brukt opp).

c) Fortynning av prøver og standard

1. Det ble veid inn 1 mg frysetørket prøve.
2. Prøvene ble løst i veronal/BSA-buffer til en konsentrasjon på 1 mg/ml for stamløsningen.
3. Det ble laget en fortynningsrekke for standard og prøver som vist i tabell 5.2.

Tabell 5.2 Fortynningsrekke for prøver og standard.

Rør #	Konsentrasjon	Innhold
1	500 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl stamløsning
2	250 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 1
3	125 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 2
4	62,5 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 3
5	31,3 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 4
6	15,6 µl/ml	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl fra rør 5

d) Titreringskurve for komplementkilden

Dette trinnet ble utført for å bestemme hvilken fortynning av komplement som ga ønsket lyseringsgrad av blodcellene.

1. 12 brønner i en U-bunnet mikrotiterplate ble tilsatt 100 µl destillert vann. 32 andre brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer.
2. Det ble laget en fortynningsserie av komplement i buffer som vist i tabell 5.3.

Tabell 5.3 Titreringskurve for komplementkilde

Forhold Komplement : buffer	Komplement, Mikroliter	Veronal/BSA-buffer, Mikroliter
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890
1:100	10	990
1:110	10	1090
1:120	10	1190

3. 50 µl av hver komplementfortynning ble tilsatt brønnene med buffer (4 paralleller per fortynning).
4. Platen ble dekket med en bred, blank tape for å hindre fordamping og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl sensibiliserte saueblodceller ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med en bred, blank tape og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platen ble sentrifugert (metode 5.1.8) ved 1450 rpm i 5 minutter.

7. 100 µl fra hver brønn ble deretter overført til nye brønner i en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering.
100 µl destillert vann ble tilsatt i en brønn som blindprøve ved absorbansmåling.
8. Absorbansen ble målt ved 405 nm.

e) Utføring av testen

1. 50 µl fra hver av prøvefortynningene (2 paralleller av hver) ble tilsatt hver brønn i en U-bunnet mikrotiterplate.
2. 100 µl destillert vann ble tilsatt tomme brønner som 100 % lysekontroll (4 paralleller). 50 µl veronal/BSA-buffer ble tilsatt tomme brønner som kontroll.
3. Komplement ble tatt opp av fryseren rett før bruk, fordi det ødelegges raskt i romtemperatur. Fortynningen ble bestemt utfra titeringskurven (Nærest mulig 50 %). 50 µl av denne fortynningen ble tilsatt alle brønnene, så nær som de med vann.
4. Platen ble dekket med en bred, blank tape og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C.
5. 50 µl sensibiliserte saueblodceller ble tilsatt hver brønn. Platen ble dekket med en bred, blank tape og satt til inkubering under risting i 30 minutter ved 37 °C.
6. Platene ble sentrifugert ved 1450 rpm i 5 minutter, før 100 µl fra hver brønn ble overført til nye brønner i en flatbunnet mikrotiterplate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering.
7. Absorbansen ble målt ved 405 nm.

f) Beregninger

Lyseringsgraden for komplement ble beregnet ved hjelp av følgende formel. Den tar høyde for komplementets egenpåvirkning:

Formel 5-1 Formel for lyseringsgrad av komplement.

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

Hemmingsgraden ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

Formel 5-2 *Formel for hemmingsgrad av komplement.*

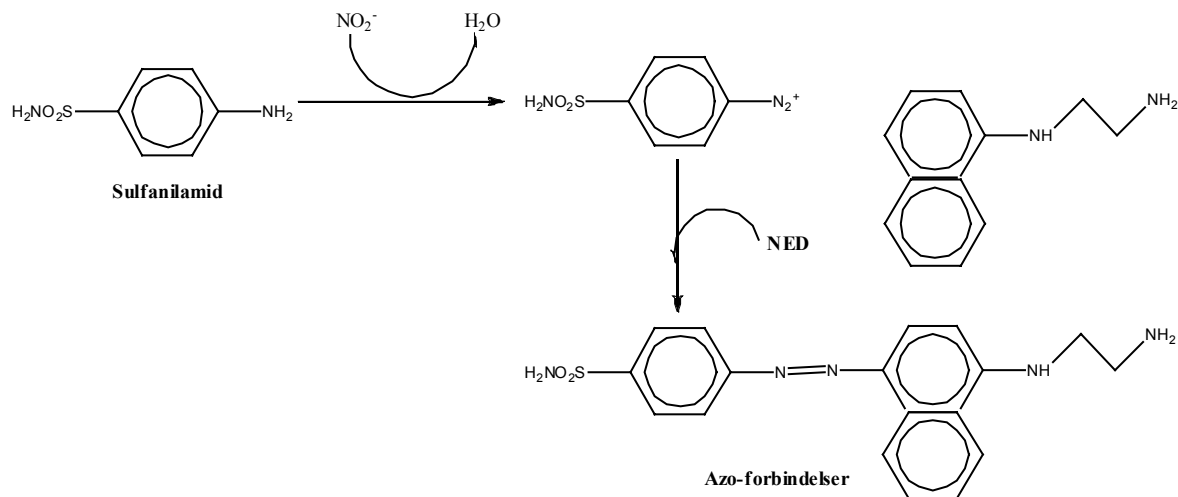
$$\% \text{ inhibering} = \frac{A_{\text{kontroll}} - A_{\text{prøve}}}{A_{\text{kontroll}}} \cdot 100 \%$$

5.5.2 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

(Promega Corporation 2005)

Prinsipp:

Når makrofager blir aktivert utskiller de nitrogenoksid (NO) og en rekke andre mediatorer som bidrar i immunresponsen. NO brytes ned til to produkter, et av disse er den stabile ikke-flyktige forbindelsen nitritt (NO_2^-) som har vist seg velegnet som et mål på makrofagaktivitet. Griess-reagenssystemet baserer seg på den kjemiske reaksjonen vist i figur 5.11, der nitritt reagerer med sulfanilamid og N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) i surt miljø. Azo-forbindelsen som dannes, farger løsningen rosa og konsentrasjonen kan avleses ved absorbansmåling. Griess-reagenssystemet er i stand til å detektere nitritt i en mengde forskjellige væskematrikser; inkludert plasma, serum, urin og cellekulturmedium.



Figur 5.11 Kjemisk reaksjon involvert i målingen av NO_2 ved hjelp av Griess Reagens System (Promega Corporation 2005).

Reagenser:

Dyrkingsmedium:	RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin og $5 \cdot 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol
Griess-reagens A:	1 % Sulfanilamid (Sigma S-9251)
Griess-reagens B:	0,1 % N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) (Sigma N-9125) 2,5 % fosforsyre
Cellelinje:	R2-makrofager derivert fra rottemakrofager
Isoton II:	0,09 % NaCl-løsning (komersiell)

Utstyr:

Celleteller:	Coulter Counter
Sentrifuge:	Beckman Rotanta 460R
Absorbansmåler:	Titerek Multiskan
Mikrotiterplater	96 brønner med U, V og flat bunnet (NUNC™ MICROWELL PLATE/ NUNC™; NUNCLEON™ surface)

Pipetter

Målingen av NO-frigjøring fra makrofager ble i sin helhet utført av Dr. Marit Inngjerdingen, ved Anatomisk Avdeling, Rikshospitalet.

Prosedyre:

1. Makrofager ble høstet fra en cellekultur.
2. 20 μ l celleduspensjon ble tilsatt 10 ml NaCl-løsning. Deretter ble cellen telt i en celledeller.
3. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter.
4. Cellene ble resuspendert til $1 \cdot 10^6$ celler/ml i dyrkningsmedium.
5. Cellene ble stimulert i en flatbunnet mikrotiterplate. 50 μ l celleduspensjon ($5 \cdot 10^4$ celler) ble tilsatt hver brønn.
6. 5 μ l pektinekstrakt ble tilsatt hver brønn.
7. Fortynningskurve med 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml og 0,1 μ g/ml pektinekstrakt ble laget.

8. Cellene ble inkubert natten over ved 37 °C.
9. 100 µl av supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate. Brettet ble spunnet ved 1300 rpm i 2 minutter.
10. 50 µl supernatant ble overført til en U-bunnet mikrotiterplate.
11. Fortynningsrekke av NaNO₃ ble laget med 100 µM, 10 µM, 5 µM, 1,25 µM og 0 µM konsentrasjoner.
12. Etter tilsetning av 50 µl Greiss A, ble prøvene satt til henstand i 10 minutter i mørke ved romtemperatur.
13. 50 µl Greiss B ble tilsatt prøvene.
14. Absorbans ble målt ved 540 nm.

5.5.3 Indusering av B-celle-proliferasjon

Prinsipp:

Celler kan innfarges med fluorescerende farge (CFSE). Når B-celler blir aktivert, vil de dele seg. Celledeling vil føre til et gradvis tap av intensiteten av farge per celle, siden dattercellene vil ha halvparten av CFSE i forhold til morcellen. Fluorescensen til cellepopulasjonen vil minke over tid ettersom cellene deler seg. Dette kan detekteres ved hjelp av flow cytometri.

Reagenser:

Cellelinje: B-celler derivert fra miltceller fra rotte
Positiv kontroll: Lipopolysakkarid (LPS)
Medium: Komplet RPMI medium (celledyrkningsmedium)
Dynalkuler belagt med antistoff mot rotte IgG (sau anti-rotte IgG)
Føtalt kalveserum (FCS)
carboxyfluorescein diacetate (CFSE)

Dyr:

Rotte, stamme PVG.RT7b. Avlet på dyrestallen på Institutt for Medisinske Basalfag (IMB), Medisinsk Fakultet.

Utstyr:

Dynabead[®] - 96-brønners U-bunnet mikrotiterplate
Celle teller Coulter Counter
Flow cytometer FACSCalibur, Becton Dickinson
Cell - "strainer"
Sentrifuge Beckman Rotanta 460R
Sprøyter

Test på B-celleproliferasjon ble i sin helhet utført av Dr. Marit Inngjerdingen, ved Anatomisk Avdeling, Rikshospitalet.

Prosedyre:

1. En 2-3 mnd gammel rotte avlives med CO₂-gass, og milten dissekeres ut.
2. Milten legges i en petriskål med 20 ml PBS + 2% FCS, og klippes i tre deler. Bitene legges i en "Cell strainer" og moses gjennom filteret med baksiden av en sprøyte.
3. Cellesuspensjonen overføres til et 50 ml rør, og skålen vaskes ut med 20 ml PBS + 2% FCS. Cellene sentrifugeres ved 1200 rpm i 10 minutter.
4. Cellepelleten resuspenderes i 40 ml PBS + 2% FCS, og cellekonsentrasjonen bestemmes ved hjelp av en celledetektor (Coulter Counter). Cellene sentrifugeres på nytt ved 1200 rpm i 10 min.
5. Cellepelleten resuspenderes i PBS + 2% FCS til final konsentrasjon 10 millioner celler/ml. 6 ml cellesuspensjon (= 60 millioner celler) tilsettes magnetiske rotte IgG-belagte Dynalkuler. Blandingen inkuberes på kjølerom i 30 minutter med rotering av røret.
6. B-celler vil binde til rotte IgG, og høstes ved å sette røret med celler og kuler på en magnet. Magneten drar ut celler som er bundet til kulene. Kulene vaskes tre ganger med 10 ml PBS + 2% FCS, ved hjelp av magneten.
7. Cellene legges ut i kultur overnatt i 10 ml komplett RPMI medium, i en liten T25 dyrkningsflaske. Kulene vil slippe taket i cellene etter overnatt kultur.
8. Cellene resuspenderes kraftig neste dag, og suspensjonen settes på nytt på magnet. Celler som ikke binder til magneten beholdes og telles i celledetektor.
9. Cellene sentrifugeres og løses i PBS + 2% FCS til final konsentrasjon 10 millioner celler/ml.
10. Cellene forvarmes på 37 °C i 1 min.
11. Det fluoreserende reagenset CFSE tilsettes celleblandingen i final konsentrasjon 5 µM, og cellene inkuberes 10 min ved 37 °C. Røret dekkes med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys.
12. Etter endt inkubasjon tilsettes 30 ml PBS + 2% FCS, og cellene sentrifugeres ved 1200 rpm i 10 min. Cellene resuspenderes i komplett RPMI medium til 4x10⁶ celler/ml.
13. Cellene plates ut i et rundbrønnet 96-brønners brett, med 2x10⁵ celler per brønn.

14. Pektinekstrakt tilsettes med final konsentrasjon 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml final konsentrasjon. Totalt volum i prøvene er 100 µl. Positiv kontroll er LPS, med final konsentrasjon 250 ng/ml. Negativ kontroll er komplett RPMI medium alene.
15. Prøvene inkuberes 5 dager ved 37°C i et celleinkubatorskap.
16. Etter endt inkubasjon høstes cellene, og hver prøve tilsettes et 5 ml Falcon rør. 0.5 ml PBS + 2% FCS tilsettes hver prøve.
17. Prøvene analyseres på et FACSCalibur flow cytometer. Intensiteten av CFSE-signalet måles. Hvis cellene har proliferert vil det ses som et tap av CFSE-signal i populasjonen, sammenlignet med negativ kontroll.

6 Resultater og diskusjon

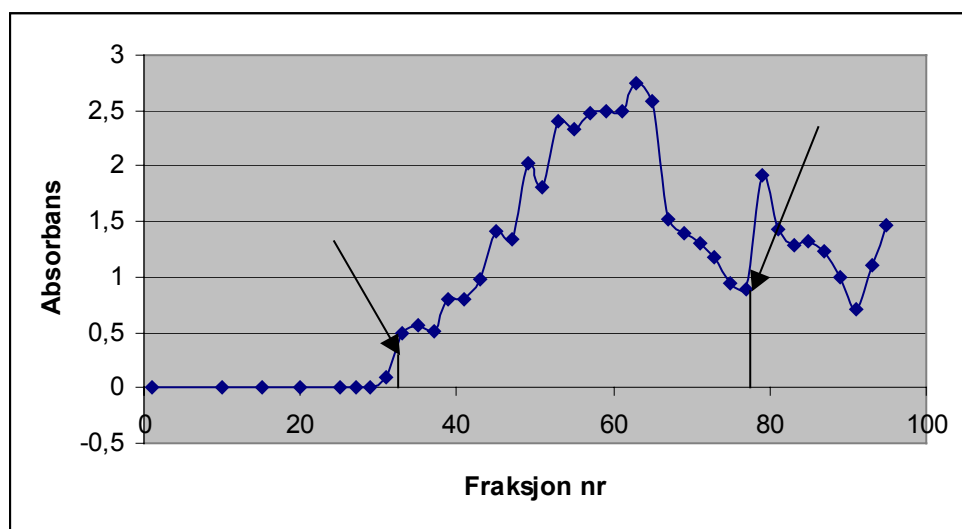
Utgangspunktet for arbeidet var ca 28,25 g 50 °C rækstrakt av *Opilia celtidifolia*. Videre forelå det også to sure fraksjoner av *O. celtidifolia*, 695,2 mg OC50S1 og 609,5 mg OC50S2. Dette materialet var separert ved ionebytterkromatografi i et DEAE Sepharose[®] Fast Flow-medium. Rækstraktet besto av tørkede og pulveriserte blader av *O. celtidifolia*. Materialet ble videre ekstrahert med DCM, MeOH og til slutt med 50 °C destillert vann. Dette arbeidet, samt forarbeidet med fraksjonene OC50S1 og OC50S2, var utført av Adiaratou Togola.

Plantematerialet har sin opprinnelse i Mali, der det ble kjøpt på medisinsplantemarkedet i Bamako i 2004. Identifikasjon av plantematerialet ble gjort på Institutt for Tradisjonell Medisin (DMT), i Bamako, Mali.

6.1 Isolering av polysakkarider

6.1.1 Gelfiltrering - Bio-Gel[®] P-6 DG

Gelfiltrering på Bio-Gel[®] P-6 DG ble benyttet for å separere forbindelsene etter molekylstørrelse og ble brukt som et ledd i prøveopparbeidelsen. Metoden kan brukes til å skille høymolekulære fra lavmolekulære polysakkarider, samt å rense prøven for andre stoffer som er tilstede. Fraksjonene ble slått sammen på bakgrunn av karbohydratinnhold (Se figur 6.1). De sammenslåtte fraksjonene ble tatt med til videre prøveopparbeidelse på ionebytterkolonne.



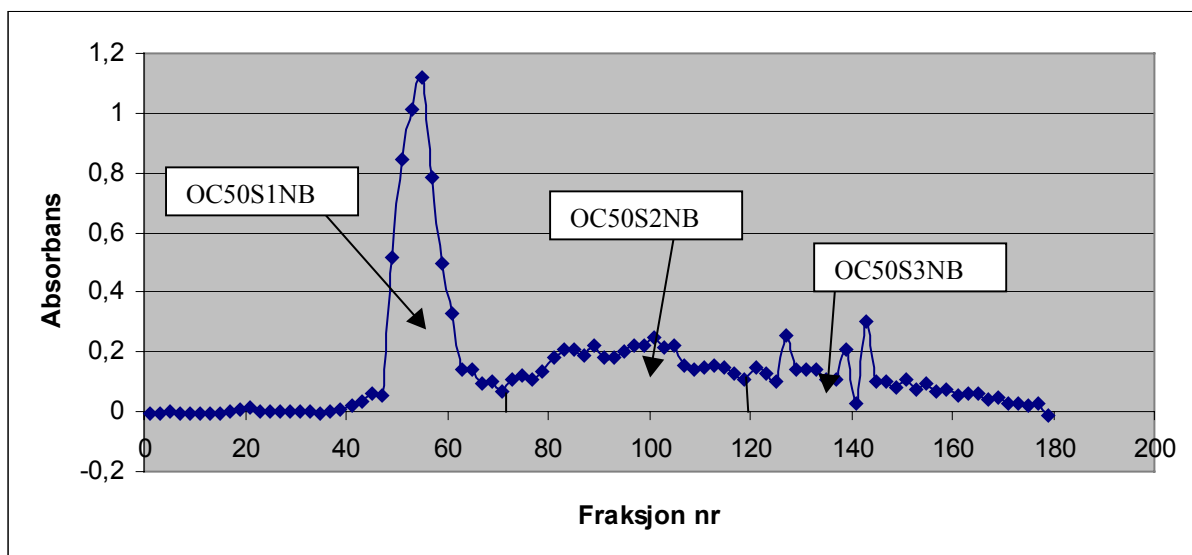
Figur 6.1 Eksempel på karbohydratprofil for *O. celtidifolia* etter separasjon på Biogel[®] P6. Fraksjonene mellom rør 32 og rør 76 ble slått sammen for videre arbeid.

6.1.2 Ionebytterkromatografi – DEAE Sepharose Fast Flow

De sammenslåtte fraksjonene fra separasjonen på Biogel[®] P6, ble separert videre ved ionebyttekromatografi. I denne metoden ble det brukt et DEAE Sepharose Fast Flow medium, som er en anionbytter. Forbindelsene i løsningen ble eluert ut etter økende surhetsgrad. De nøytrale polysakkaridene ble eluert med destillert vann. Adiaratou Togola har før utført arbeid på *Opilia celtidifolia*, der biologisk aktivitet av nøytral fraksjon er blitt undersøkt. Denne har ikke vært tilfredstillende og det ble derfor besluttet å ikke ta disse med til videre arbeid.

Etter eluering med NaCl-gradient (0-1,5 M), ble fraksjonene slått sammen på bakgrunn av karbohydratprofilen som vist i figur 6.2. Det forelå 3 sure fraksjoner som fikk navnet OC50S1NB, OC50S2NB og OC50S3NB. Av samme grunn som over ble det besluttet å bare ta med OC50S1NB og OC50S2NB videre i arbeidet.

Fraksjonene OC50S1NB og OC50S2NB, ble dialysert for å rense løsningene for salter og andre lavmolekylære forbindelser og deretter frysetørket. Etter disse prosessene forelå det 800 mg av OC50S1NB og 600 mg av OC50S2NB. Det ble tatt ut 1 mg av hver av fraksjonene til monosakkaridbestemmelse. Resultatet ble sammenlignet med resultat monosakkaridbestemmelse av OC50S1 og OC50S2.



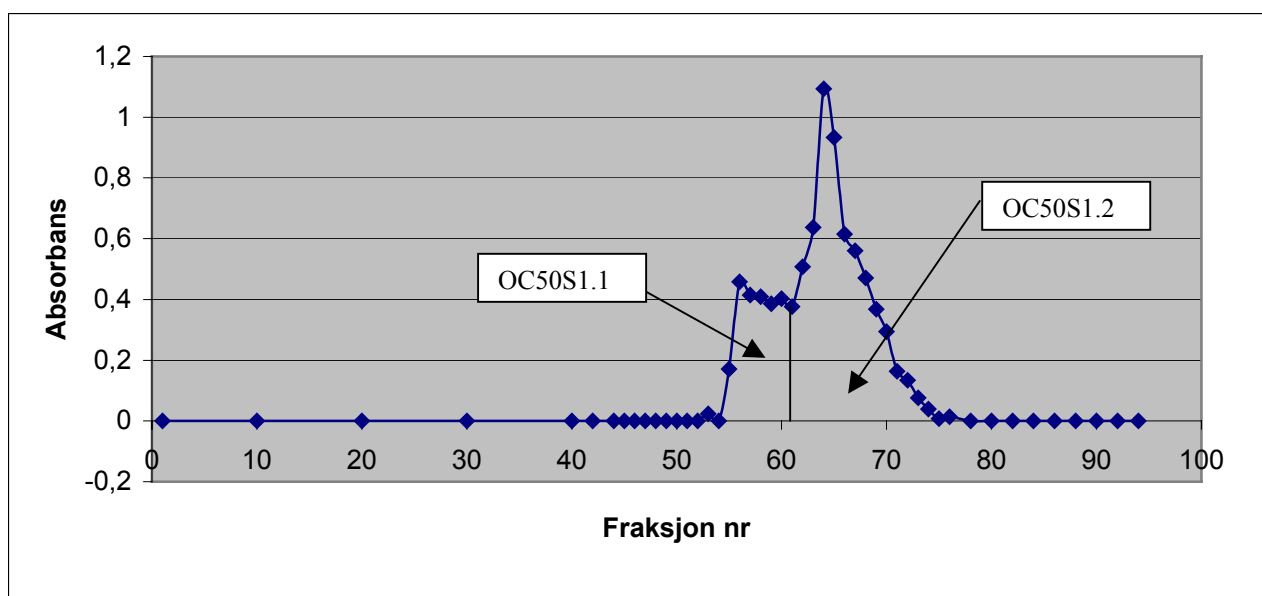
Figur 6.2 Eksempel på karbohydratprofil for *Opilia celtidifolia* etter separasjon på ionebytterkolonne. Det ble brukt en NaCl-gradient (0-1,5M) under elueringen. Fraksjonene OC50S1 og OC50S2 ble slått sammen for videre arbeid.

De sureste polysakkaridene ble eluert med 2M NaCl. Eluatet ble testet for karbohydratinnhold ved hjelp av Fenolsvovelsyretest. Ut fra karbohydratprofilen lot det seg ikke gjøre å samle

innholdet i de resterende rørene i noen klare fraksjoner. I tillegg var karbohydratinnholdet veldig lavt. Dette tyder på at brormengden av polysakkaridene ble eluert med 0-1,5 M NaCl-gradient. Det ble besluttet å utelate de sureste polysakkaridene i det videre arbeidet.

6.1.3 Gelfiltrering – Sephacryl™ S-400 HR

Fraksjonene OC50S1, OC50S2 og OC50S1NB ble separert på gelfiltreringkolonne med Sephacryl S-400 HR-medium. Hensikten med gelfiltreringen var å separere forbindelsene videre etter molekylstørrelse. Etter eluering med destillert vann, ble fraksjonene slått sammen på bakgrunn av karbohydratprofilen som vist i figur 6.3. Denne er representativ for elueringene av både fraksjon OC50S1, OC50S2 og OC50S1NB.



Figur 6.3 Eksempel på karbohydratprofil for OC50S1 etter eluering med destillert vann i et Sephacryl™ S-400-medium. Både OC50S1.1 og OC50S1.2 ble tatt med i det videre arbeidet.

Av den nye batchen ble kun OC50S1NB- fraksjonen separert. Målet med å lage en ny batch, var å skaffe mer materiale til veie for videre arbeid med strukturoppklaring og bioaktivitetstudier.

Før oppstart med dette hadde gelfiltreringskolonnen stått noen måneder uten å bli brukt etter konserveringen med NaN_3 . I tillegg hadde det blitt kjørt mange fraksjoner gjennom kolonnen tidligere. Etter første eluering viste karbohydratprofilen en noe dårlig separasjon mellom de to toppene. Det ble besluttet å vaske kolonnen med 10 mM NaCl-løsning, etterfulgt av destillert vann for å prøve og aktivere gruppene i gelen igjen. Det kan også ha oppstått interaksjoner mellom rester av konserveringsmiddelet 0,05 % NaN_3 og gelen. Ved neste eluering var separasjonen mellom de to fraksjonene bedre. Dette viser at det kan lønne seg å vaske kolonnen med 10 mM NaCl-løsning etter ca 10 elueringer.

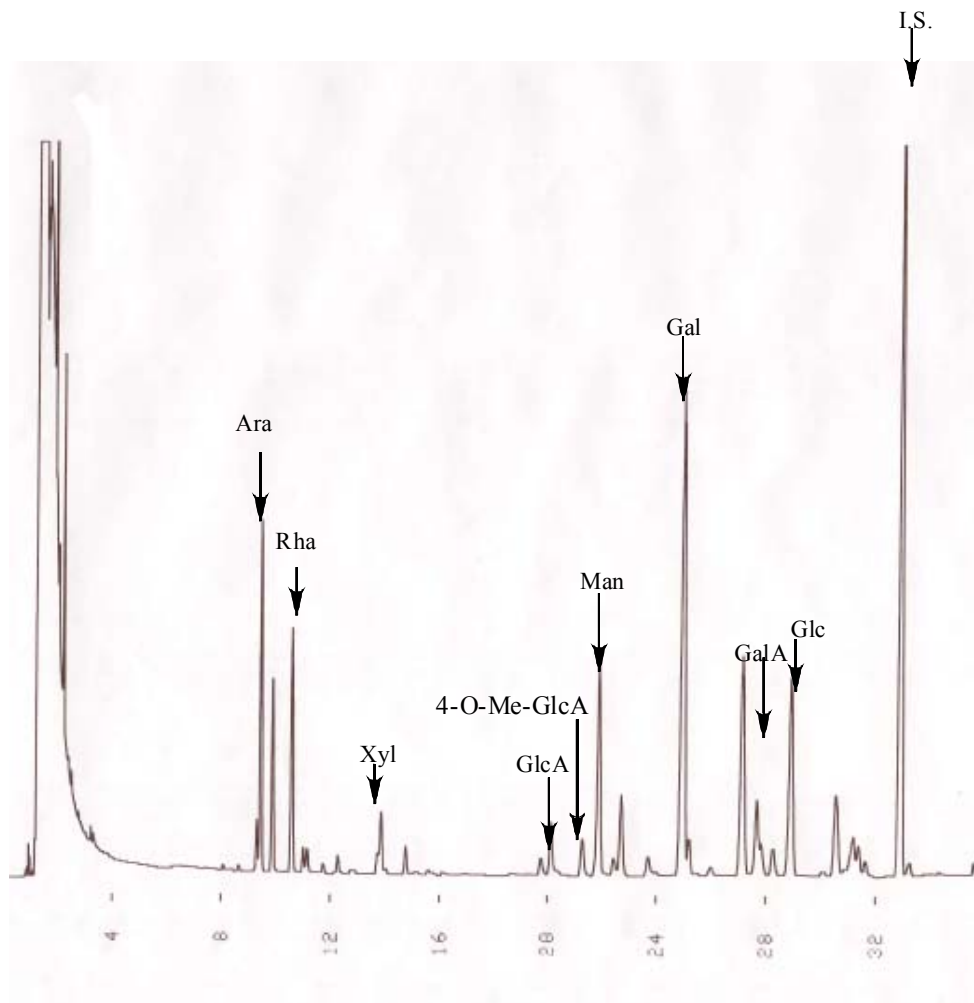
6.2 Karbohydratanalyse

6.2.1 Monosakkaridbestemmelse - metanolyse

Det har blitt utført monosakkaridbestemmelse på alle fraksjoner i flere omganger og et typisk kromatogram for en fraksjon fra *O. celtidifolia* er vist i figur 6.4. Prosentvis monosakkaridsammensetning er vist i tabell 6.1 og 6.2.

Alle fraksjoner har et relativt høyt innhold av arabinose, rhamnose og galaktose. Glukoseinnholdet er noe varierende mellom fraksjonene OC50S1 og OC50S2. Glukose kan ofte forekomme som en forurensning, men med de mengder som er tilstede i disse fraksjonene er det en indikasjon på at de er reelt tilstede.

Det ble besluttet å slå sammen fraksjonene OC50S1.2 og OC50S1.2NB, for det videre arbeidet på bakgrunn av sammenligning av prosentvis monosakkaridsammensetning. Dette var ikke nøyaktig likt. Ulikheter i karbohydratsammensetningen kan komme av at utbyttet er ulikt for de to fraksjonene i % sukker relatert til innveid mengde prøve.



Figur 6.4 Eksempel på monosakkaridsammensetning hos en fraksjon av *O. celtidifolia*.

Tabell 6.1 Gjennomsnittlig prosentvis monosakkaridsammensetningen til fraksjoner av *O. celtidifolia* før og etter gelfiltrering i et Sephacryl S-400-medium. Prosentinnholdet er gjennomsnitt fra alle metanolyseforsøk.

	OC50S1	OC50S1.1	OC50S1.2	OC50S2	OC50S2.1	OC50S2.2
Ara	16,8	19,2	20,4	7,8	12,4	8,3
Rha	4,9	4,7	5,3	8,7	7,8	11,1
Fuc	1,3	1,3	1,0	1,0	1,3	1,8
Xyl	3,0	3,0	2,8	3,0	1,7	4,7
Man	5,5	7,1	5,6	4,8	4,8	3,4
Gal	26,9	31,1	30,3	22,3	25,3	19,1
Glc	11,3	12,2	12,4	17,3	16,1	21,5
GlcA	14,0	9,3	5,9	18,6	11,8	12,0
GalA	4,8	3,6	5,8	9,3	11,6	12,5
4-O-Me-GlcA	11,5	8,3	10,5	7,3	7,1	5,7

Tabell 6.2 Prosentvis monosakkaridsammensetning av nye fraksjoner av *O. celtidifolia* før og etter gelfiltrering i et Sephacryl S-400 HR-medium. Kun fraksjon OC50S1 og OC50S1.2 er tatt med i tabellen, fordi det videre arbeidet er basert på disse.

	OC50S1NB	OC50S1.2NB
Ara	18,9	24,1
Rha	4,7	4,2
Fuc	2,1	1,7
Xyl	3,7	1,8
Man	6,4	5,6
Gal	28,7	30,7
Glc	11,2	8,7
GlcA	5,3	4,6
GalA	7,8	6,6
4-O-Me-GlcA	11,0	11,9

Resultatene fra metanolysen har vært varierende med hensyn til utbytte. Dette har gjennom året variert fra 39 % karbohydratinnhold opptil 130 %. Til tross for dette har det relative forholdet mellom de ulike monosakkaridene i prøvene vært normalt. Resultatene har korrelert med de resultatene som Adiaratou Togola har kommet frem til i sitt arbeid (Togola, Inngjerdingen et al. 2007).

Den interne standarden bestod i utgangspunktet av 1 µg/µl mannitol løst i 4M metanolisk HCl. Korkene på flaskene den blir oppbevart i er laget av hardplast og disse har ikke tålt syren. Resultatet av dette er at en del av metanolen sannsynligvis har fordampet ut. Denne prosessen kan også ha blitt påvirket av at løsningene ble oppbevart i vakuumsikator. Dette kan føre til en oppkonsentrering av intern standard og bidra som en feilkilde i prøveopparbeidelsen og i resultatet forøvrig.

Det ble i løpet av året besluttet å lage en ny intern standard bestående av 1 µg/ml mannitol løst i vannfri metanol, for å se om dette kunne være en mulig løsning på problemet med ulikhetene i utbytte og forhindre fordamping av løsningsmiddelet i intern standard. Vanligvis er mannitol løst i 4 M metanolisk HCl. Utfra mengden intern standard som tilsettes prøveløsningen (1/10 av innveidd mengde prøve), ble det antatt at å fjerne HCl fra løsningen ikke ville påvirke utfallet av analysen i større grad.

Et annet aspekt er at det har blitt tilsatt 100 µl TMS under TMS-derivatiseringen. Dette har tilsvart mengde I.S som er tilsatt prøven. Dette kan ha bidratt til for konsentrerte prøveløsninger og derav unødvendig belastning av kolonnematerialet i gasskromatografen.

Resultatene har etter nylaging av intern standard og økning i tilsatt mengde TMS-reagens blitt mer stabile med et høyere utbytte, rundt 100 %.

6.2.2 Undersøkelse av bindingsforholdene i fraksjonene

Bindingsforholdene i OC50S1.1, OC50S1.2, OC50S2.1, OC50S2.2, OC50S1.2.H og OC50S1.2.H.H ble analysert. De to siste omtales under avsnitt 6.4.3. Fraksjonene ble undersøkt ved karboksylsyrereduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og etterfølgende GC-MS-analyse. Bindingsforholdene i OC50S1 og OC50S2 ble ikke undersøkt i denne oppgaven, fordi dette tidligere er blitt utført på disse fraksjonene av Adiaratou Togola. Resultatet er vist i tabell 6.3. I analysen av resultatet ble kun de toppene som har betydning for strukturen tatt med. De minste toppene er utelatt fra tabellen, fordi det antas at disse ikke er av den største betydning for strukturen i molekylene. Forholdet mellom de ulike toppene er beregnet etter formel 6.1:

$$\text{Korrigert \% innhold for bindingstype X} = \frac{\% \text{ fra integrering} \cdot \% \text{ innhold fra metanolyse}}{100 \%}$$

Formel 6-1: *Formel for beregning av prosentvis innhold av hver enkelt bindingstype.*

Terminal Glc, GlcA og 4-O-Me-GlcA kommer ut ved samme retensjonstid under GC/MS-analysen. Forholdet mellom Glc og 4-O-Me-GlcA/GlcA ble best ut fra forholdet mellom fragmenttoppene 205 og 207 i MS-spekteret. Forholdet mellom 4-O-Me-GlcA og GlcA er det samme som under metanolysen.

Generelt kan man si at de samme bindingstypene går igjen i alle de undersøkte fraksjonene, men de forekommer i større eller mindre grad, som man kan se av tabell 6.3.

Rhamnogalakturonan I (RG-I)

Alle de fire fraksjonene inneholder 1→2-Rha og 1→4-GalA, noe som indikerer tilstedeværelse av RG-I. Disse to strukturelementene utgjør ryggraden i RG-I. Dette er et stort molekyl som er forgrenet med mange sidekjeder, som utgjør såkalte ”hårete” områder i pektinet. Disse områdene fremstår sammen med en relativt høy molekylvekt som viktige for optimal biologisk aktivitet hos et pektin (Lin 2005).

RG-I er forgrenet med ulike sidekjeder, blant annet arabinaner. Disse kan være både lineære, bestående av T-Ara og 1→5-Ara og forgrenede bestående av 1→3 og 1→5-Ara.

Arabinogalaktaner

Alle fraksjonene inneholder 1→3 og 1→6-Gal, som er et viktig strukturelement i AG-II. Fraksjonene OC50S1.1 og OC50S1.2 inneholder spesielt mye av dette strukturelementet (>50%). På grunn av det høye innholdet av terminalt bundet Ara er det rimelig å anta at dette vil sitte som forgrening i 3-posisjon på Gal-enheten. Sammen utgjør disse elementene det sterkt forgrenede molekylet AG-II. Yarivtest for påvisning av AG-II er ikke blitt utført, men tilstedeværelse av dette strukturelementet i fraksjoner av *O. celtidifolia* er tidligere blitt identifisert gjennom positiv Yariv-test (Togola, Inngjerdingen et al. 2007). Fraksjonene OC50S2.1 og OC50S2.2 inneholder mindre T-Ara og 1→3 og 1→6-Gal. Muligens er strukturen til disse fraksjonene noe annerledes. I forhold til fraksjonene OC50S1.1 og OC50S1.2, inneholder de mer av 1→3-Gal og 1→4-Gal. Dette kan indikere et mulig innhold av AG-I i strukturen. Det er også et lite innhold av T-Fuc tilstede. Dette kan ofte sitte terminalt i AG-I.

Innhold av 1→4-GalA indikerer innhold av homogalakturonaner (HGA). Disse finnes ofte som lange kjeder i molekylet og utgjør såkalte ”glatte”-områder av pektinet. Dette innholdet er sannsynligvis størst i OC50S2.1 og OC50S2.2.

Hemicelluloser

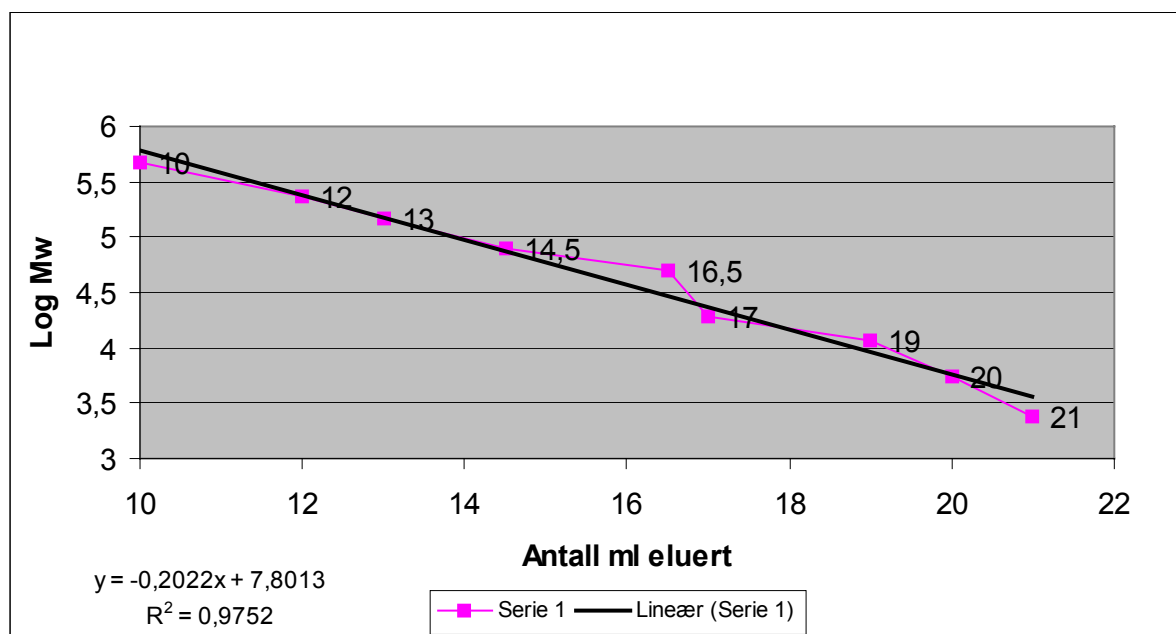
Innhold av 1→4-Glc kan tyde på innhold av hemicelluloser. Dette er lineære kjeder som kan være forgrenet, med av forgrenet med Xyl. Innhold av 1→6-Man er ikke typisk for RG-I, men forekommer i glukomannaner, en type hemicellulose.

Tabell 6.3 Oversikt over fordelingen av bindingstypene i fraksjonene OC50S1.1, OC50S1.2, OC50S2.1 og OC50S2.2.

	Bindingstype	OC50S1.1	OC50S1.2	OC50S2.1	OC50S2.2
Ara					
	Tf	11,3	11,6	7,0	5,7
	1→2	0,4	0,3	0,3	0,8
	1→3	1,5	1,3	1,2	0,2
	1→5	5,7	6,8	3,4	1,6
	1→2,5	0,3	0,4	0,4	i.d.
Xyl					
	1→4	3,0	2,8	1,7	4,7
Rha					
	Tp	3,8	4,2	5,2	i.d.
	1→2	0,6	0,8	1,6	7,4
	1→3	0,3	0,3	1,0	3,7
Fuc					
	Tf	1,3	i.d.	1,3	1,8
Man					
	1→6	7,1	5,6	4,8	3,4
Glc					
	Tp	9,2	9,5	8,2	15,7
	1→4	3,0	2,9	1,4	5,8
	1→6	i.d.	i.d.	4,6	i.d.
	1→4,6	i.d.	i.d.	1,1	i.d.
GlcA/4-O-Me-GlcA					
	Tp	11,5	8,7	4,4	9,6
	1→4	6,1	7,7	14,9	8,1
Gal					
	Tf	0,5	0,3	0,8	0,9
	Tp	2,5	2,4	3,9	3,8
	1→3	4,2	4,4	6,3	6,2
	1→4	0,8	0,8	1,2	1,9
	1→6	4,2	3,5	0,3	1,9
	1→6f	0,5	i.d.	0,4	i.d.
	1→3,4	i.d.	1,4	3,1	i.d.
	1→3,6	18,4	17,2	9,3	4,3
	1→2,6	i.d.	0,3	i.d.	i.d.
GalA					
	1→4	3,6	5,8	11,6	12,5

6.2.3 Molekylvektfordeling

Molekylvektfordelingen ble bestemt for alle fraksjoner av *O. celtidifolia* ved hjelp av gelfiltrering på FPLC Superose 6. En rekke dekstraner med kjent molekylvekt ble brukt som standarder, se figur 6.5 og tabell 5.1. Resultatet for de ulike fraksjonene for øvrig er vist i tabell 6.5. De enzymdegraderte fraksjonene er omtalt under avsnitt 6.4.4.



Figur 6.5 Standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt.

Ut fra elueringsprofilen til hver av de ulike standardene ble det bestemt den best tilpassede linjen mellom punktene ved lineær regresjon. Linjen er rimelig godt tilpasset med en R^2 -verdi på 0,9752. En verdi på 1 ville vært en perfekt tilpasset linje.

Tabell 6.4 Oversikt over molekylvektintervall for respektive fraksjoner av *O. celtidifolia*. Fra Mw til Mw er intervallet for toppen. Mw topp 1 og Mw topp 2 er henholdsvis toppunkt for 1. og 2. topp i elueringsprofilen.

Fraksjon	Fra Mw (Da)	Til Mw (Da)	Mw topp 1 (Da)	Mw topp 2 (Da)
OC50S1	602.000	5.700	149.000	15.000
OC50S1NB	602.000	5.700	149.000	15.000
OC50S1.1	378.000	3.600	93.000	15.000
OC50S1.2	378.000	9.100	59.000	-
OC50S1.2NB	378.000	9.100	237.000	15.000
OC50S2	602.000	3.600	149.000	5.800
OC50S2.1	378.000	9.100	93.000	15.000
OC50S2.2	237.000	9.100	149.000	37.000

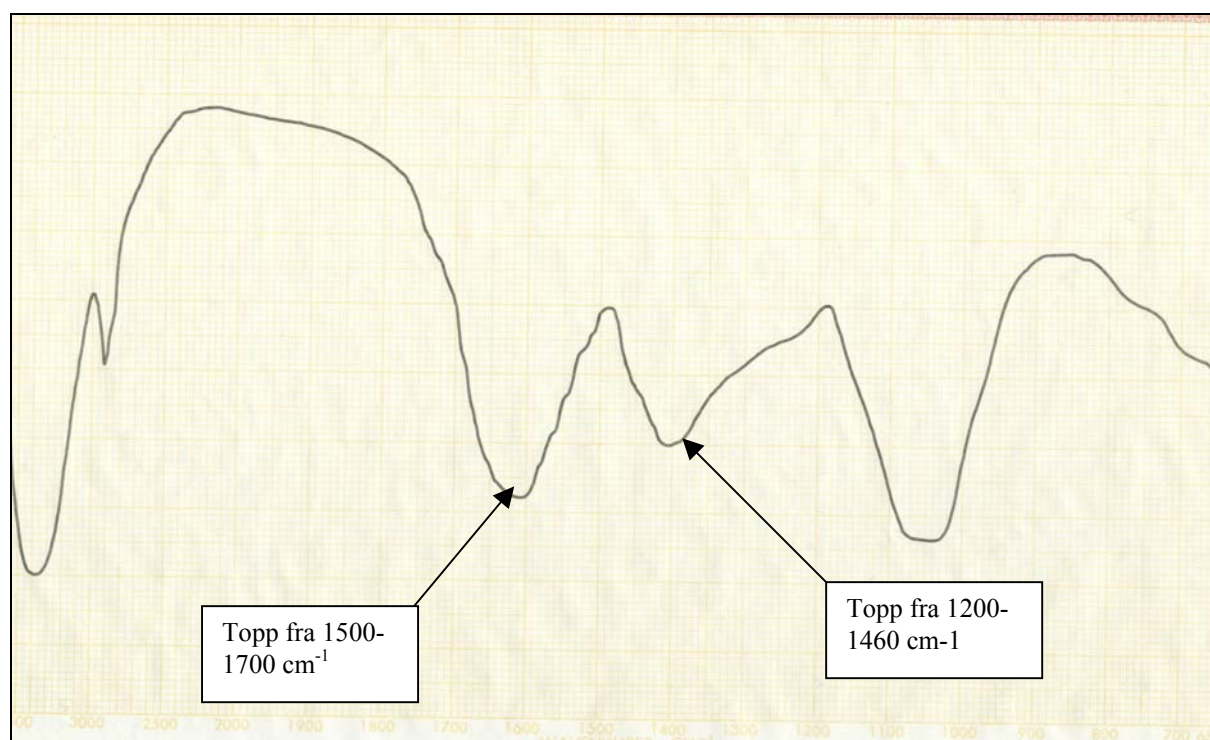
Tabell 6.4 viser molekylvektfordeling hos fraksjoner fra *O. celtidifolia* før og etter gelfiltrering. Molekylvekten strekker seg over et område fra 5.700 til 602.000 Da. Dette er et

rimelig stort molekylvektintervall og gir en indikasjon om at det kan foreligge mer enn bare en forbindelse i hver fraksjon. Elueringsprofilen til alle fraksjonene, så nær som OC50S1.2, var bimodale. Det er før blitt utført molekylvektbestemmelse av OC50S1 og OC50S2, fra samme plantemateriale. Dette arbeidet er utført ved hjelp av SEC/MALLS-metode. Elueringsprofilen viste også i dette forsøket en bimodal elueringsprofil (Togola, Inngjerdingen et al. 2007).

Bruk FPLC for bestemmelse av molekylvekt har en viss usikkerhet med hensyn til nøyaktighet. Den vil ikke gi noe eksakt svar på spørsmålet om molekylvekt, men snarere en indikasjon på hvilket molekylvektsområde fraksjonen befinner seg i. De beregnede verdiene for molekylvektene går utenfor området for standardkurven, men ligningen som ligger til grunn for beregningene er basert på lineære forhold.

6.2.4 Bestemmelse av funksjonelle grupper i molekylene – IR-spektroskopi

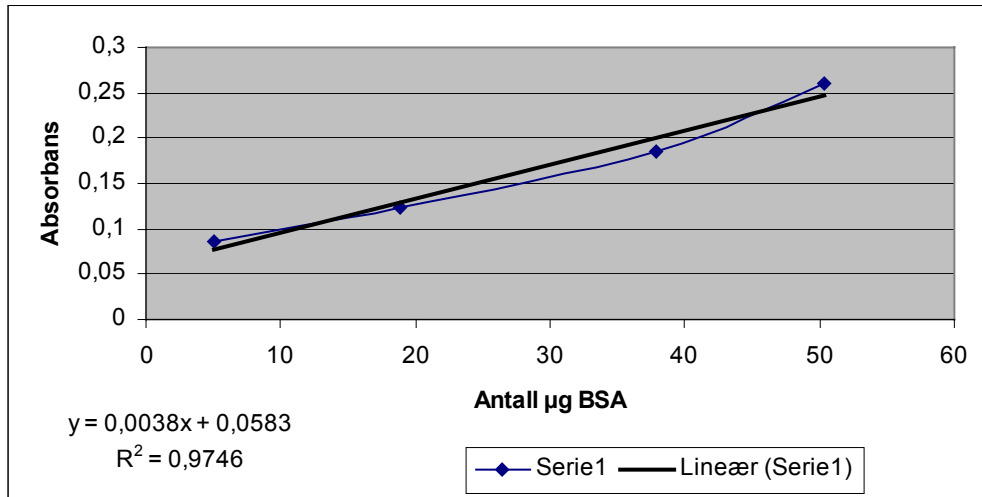
Fraksjonene OC50S1.1, OC50S1.2, OC50S2.1 og OC50S2.2 ble undersøkt for innhold av forestrede molekylar ved IR-spektroskopi. Polysakkaridene fra *Opilia celtidifolia* inneholder relativt lite uronsyrer. I følge resultatene fra metanolyseundersøkelsen, vet vi at OC50S1.1 og OC50S1.2 inneholder rundt 20 %, mens fra OC50S2.1 og OC50S2.2 inneholder rundt 30 %. IR-spekteret for OC50S1.1 er vist i figur 6.6. Dette er også representativt for de andre fraksjonene. Man ser et bredt absorpsjonsbånd fra 1200-1400 cm^{-1} og et fra 1500-1700 cm^{-1} . Topper i disse områdene tyder på innhold av forestrede molekylar i forbindelsene. Alle fraksjonene viste toppe i angitte områdene i figur 6.6.



Figur 6.6 IR-spektrofotometer av fraksjonen OC50S1.1.

6.2.5 Bestemmelse av proteininnhold

Proteininnholdet i fraksjonene OC50S1, OC50S1.2, OC50S1.2.H og OC50S1.2.H.H ble undersøkt ved hjelp av modifisert Lowry proteinbestemmelse. For å finne konsentrasjonen av protein i de 4 fraksjonene ble BSA brukt som standard. Standardkurven er vist i figur 6.7.



Figur 6.7 Standardkurve for bestemmelse av proteininnhold i fraksjonene OC50S1, OC50S1.2, OC50S1.2.H og OC50S1.2.H.H. Bovint Serum Albumin (BSA) ble benyttet som standard.

Mengden protein ble beregnet ved hjelp av lineær regresjon. Linjen er rimelig godt tilpasset med en R^2 -verdi på 0,9746.

Tabell 6.5 Oversikt over absorbans og mengde protein i hver av fraksjon og % protein relatert til innveidd mengde prøve (500µg/prøve).

	Absorbans	Mengde protein (µg)	% protein
OC50S1	0,1595	41,9	8,4
OC50S1.2	0,1195	31,4	6,3
OC50S1.2.H	0,1155	30,3	6,1
OC50S1.2.H.H	0,1285	33,8	6,8

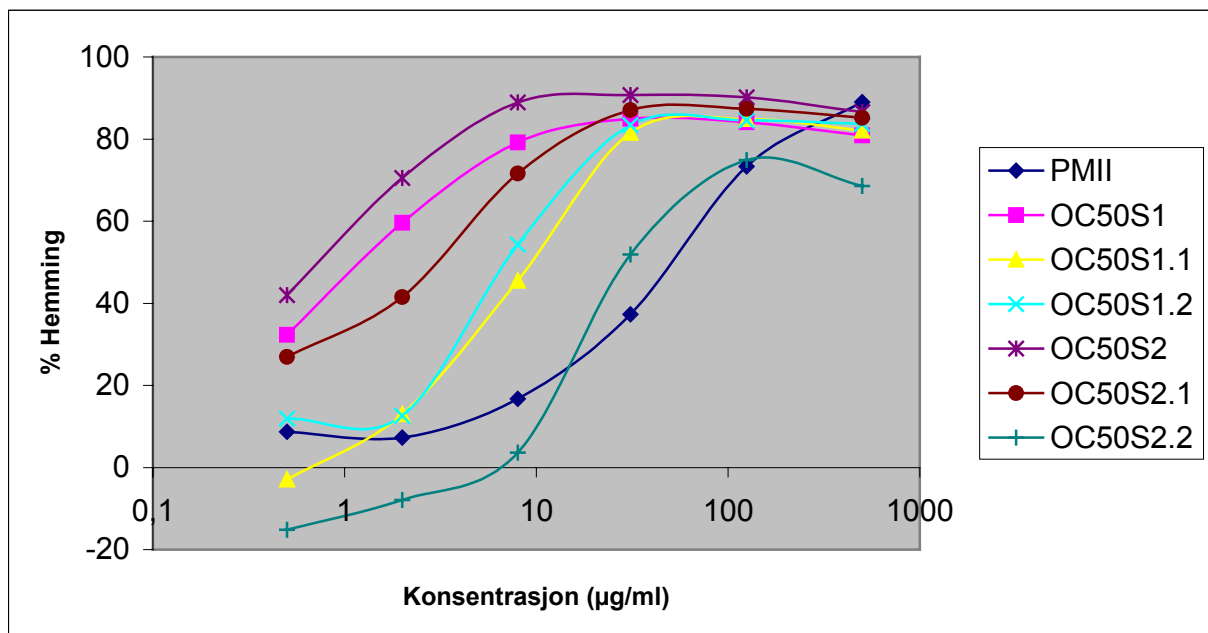
I tillegg til proteiner kan også fenoliske forbindelser i plantematerialet felle ut i dette forsøket. Fraksjonen fra ionebytterkromatografien er den som inneholder mest proteiner. Videre opparbeidelse av prøven med gelfiltreringen og enzymatisk degradering fører til at andelen protein reduseres. (Togola, Inngjerdingen et al. 2007) har undersøkt fraksjonene

6.3 Biologisk aktivitet

Et vanlig kjennetegn ved bioaktive pektiner er at de inneholder en ryggrad med mange forgreningspunkter, som til sammen utgjør en tredimensjonal struktur (Paulsen 2002). Størrelsen på polymeren synes også å ha betydning (Inngjerdingen 2007).

6.3.1 Komplementfiksering

Alle fraksjoner ble undersøkt med hensyn til om de kunne aktivere komplementsystemet. PM-II ble benyttet som positiv kontroll i forsøket (Samuelsen, Paulsen et al. 1996). Testen ble utført både med 2-folds og 4-folds fortynningsrekker av prøven. Det viste seg at med 2-folds fortynningsrekke med laveste konsentrasjon 15,6 µg/ml, er det ikke mulig å oppnå 50% hemming av hemolyse. Dette tyder på at konsentrasjonsområdet til *O. celtidifolia* for 50% hemming av hemolyse og derav en IC_{50} -verdi, ligger lavere enn 15,6 µg/ml (Se figur 6.8). Dette er forventet utfra det man vet fra tidligere forskning på *O. celtidifolia*. Pektinene fra planten er en potent aktivator av komplementsystemet (Togola, Inngjerdingen et al. 2007). For polysakkarider fra planter som evner å modulere komplementsystemet, synes flertallet å inneholde strukturelementer fra AG-II (Inngjerdingen 2007).



Figur 6.8 Komplementfikserende aktivitet *in vitro* av PM II og fraksjoner av *O. celtidifolia*. Tallmaterialet er vist med logaritmisk skala på x-aksen.

Som man kan se av figur 6.8, har fraksjonene OC50S1 og OC50S2 størst evne til komplementfiksering og aktiviteten er større en hos PM II ved alle konsentrasjoner, så nær som ved 500 µg/ml. Man kan se en reduksjon hos de gelfiltrerte fraksjonene i evnen til å aktivere komplementsystemet, men den er fremdeles høyere enn hos PM II.

Tabell 6.6 Oversikt over ICH_{50} -verdier for fraksjoner av *O. celtifolia*. ICH_{50} -verdien representerer den laveste konsentrasjonen som gir 50 % hemming av hemolyse.

Fraksjon	ICH_{50} (µg/ml)
PM II	58,9
OC50S1	1,2
OC50S1.1	9,4
OC50S1.2	7,6
OC50S2	1,1
OC50S2.1	2,3
OC50S2.2	37,0

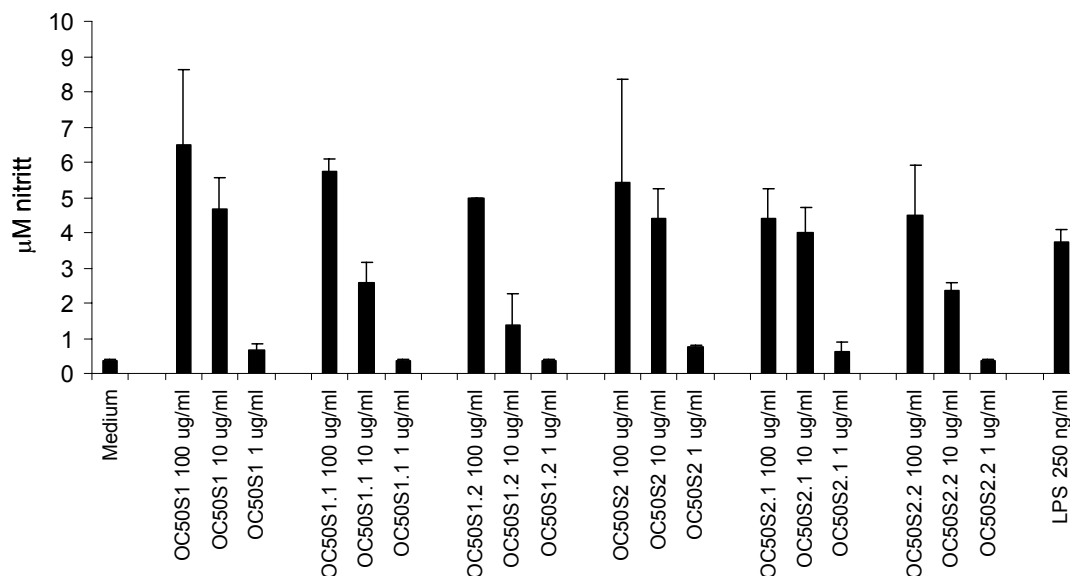
De beregnede ICH_{50} -verdiene for alle fraksjonene så nær som OC50S2.2 er, $\sim 10^1$ lavere enn PM-II's ICH_{50} -verdi. OC50S2.2 har en relativt mye større ICH_{50} -verdi enn de andre fraksjonene. De fleste pektin polysakkarider som har vist komplementmodulerende effekt har inneholdt strukturelementet AG-II (Inngjerdingen 2007). OC50S2.2 skiller seg ut fra de andre fraksjonene i bindingselementene. Den inneholder relativt mye mindre 1→3,6-Gal, sammenlignet med de andre fraksjonene. 1→3,6- Gal er byggesteinen i AG-II og dette kan være noe av forklaringen på den store forskjellen mellom fraksjonene i evne til å modulere komplementsystemet.

6.3.2 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Dette forsøket ble i sin helhet utført av Dr. Marit Inngjerdingen ved Avdeling for Anatomi på Medisinsk Fakultet.

Når makrofager aktiveres, skiller de ut en rekke signalstoffer. Et av disse er nitrogenoksid NO. Vi kan detektere utskillelse av NO fra makrofager ved å måle tilstedeværelse av nitritt, som er et nedbrytningsprodukt av NO. Nitritt detekteres med en fargereaksjon ved hjelp av Griess-reagenset. Man bruker en standardkurve med kjent nitrittkonsentrasjon for å bestemme konsentrasjonen av nitritt i prøvene.

Alle fraksjonene av *O. celtidifolia* ble undersøkt med hensyn til om de kunne aktivere makrofager. Som vist i figur 6.9, er det en doseavhengig stimulering av NO-frigjøring fra makrofager, med en økende evne til å aktivere NO-frigjøring, med økende konsentrasjon på prøveløsningen. Ved 100 µg/ml konsentrasjon på prøveløsningen, var stimuleringsgraden sammenlignbar med den positive kontrollen Lipopolysakkarid (LPS). Det skal nevnes at LPS er en særdeles kraftig stimulator og at derfor trengs en mye svakere konsentrasjon (250 ng/ml) for å oppnå lik effekt.

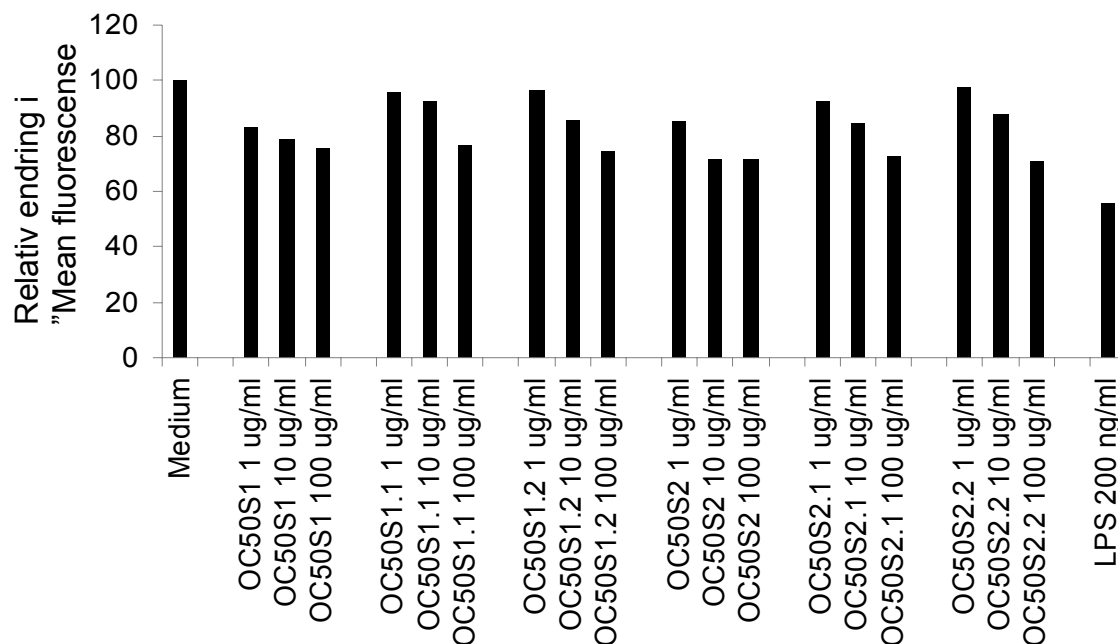


Figur 6.9 Figuren viser makrofagaktivering, gjennom utskillelse av NO. Fraksjonene av *O. celtidifolia* fra DEAE Sepharose® FF og Sephacryl™ S-400 HR ble undersøkt i forsøket.

6.3.3 B-celleproliferasjon

Dette forsøket ble i sin helhet utført av Dr. Marit Inngjerdingen ved Avdeling for Anatomi på Medisinsk Fakultet.

Fraksjonene OC50S1, OC50S1.1, OC50S1.2, OC50S2, OC50S2.1 og OC50S2.2 ble testet for evne til å aktivere B-celleproliferasjon. Resultatet ble sammenlignet med medium alene som negativ kontroll og lipopolysakkarid (LPS) som positiv kontroll (200 ng/ml). Cellene ble innmerket med det fluorescerende kjemikaliet CFSE. Celledeling vil føre til et gradvis tap av intensiteten til CFSE per celle, siden dattercellene vil ha halvparten av CFSE i forhold til morcellen. Dette ble detektert ved hjelp av flow cytometri.



Figur 6.10 Figuren viser B-celleproliferativ aktivitet av fraksjoner isolert fra *O. celtidifolia* etter DEAE Sepharose® Fast Flow og Sephacryl™ S-400 HR.

Ut fra resultatet i figur 6.10 viser fraksjonene av *O. celtidifolia* en økende evne til å aktivere B-celleproliferasjon, etter hvert som dosen økes. Y-aksen representerer gjennomsnittlig fluorescens, som er normalisert til 100 i prøven med medium alene. Alle fraksjonene har noe evne til å stimulere B-celleproliferasjon ved de høyeste dosene, men ikke så mye som LPS.

Tidligere forskning har pekt på at det antas å være en sammenheng mellom høy komplementfikserende aktivitet og mitogen B-celleaktivitet (Inngjerdingen, Patel et al. 2007),

(Nergaard, Kiyohara et al. 2006). Resultatet fra våre forsøk er i samsvar med dette. Man mener at de ”hårete” delene av pektinet, spesielt de som inneholder AG-II, er viktig i så henseende (Inngjerdingen 2007). Ved undersøkelse av bindingsstrukturen til polysakkaridene i *O. celtidifolia*, ble det funnet tilstedeværelse av AG-II. Under den enzymatiske degraderingen ble henholdsvis arabinose og galaktose delvis fjernet fra polysakkaridene. Det kunne vært interessant å se om dette hadde skapt endringer i evnen til å indusere B-celleproliferasjon.

6.4 Struktur og biologisk aktivitet etter enzymatisk degradering

6.4.1 Enzymatisk degradering

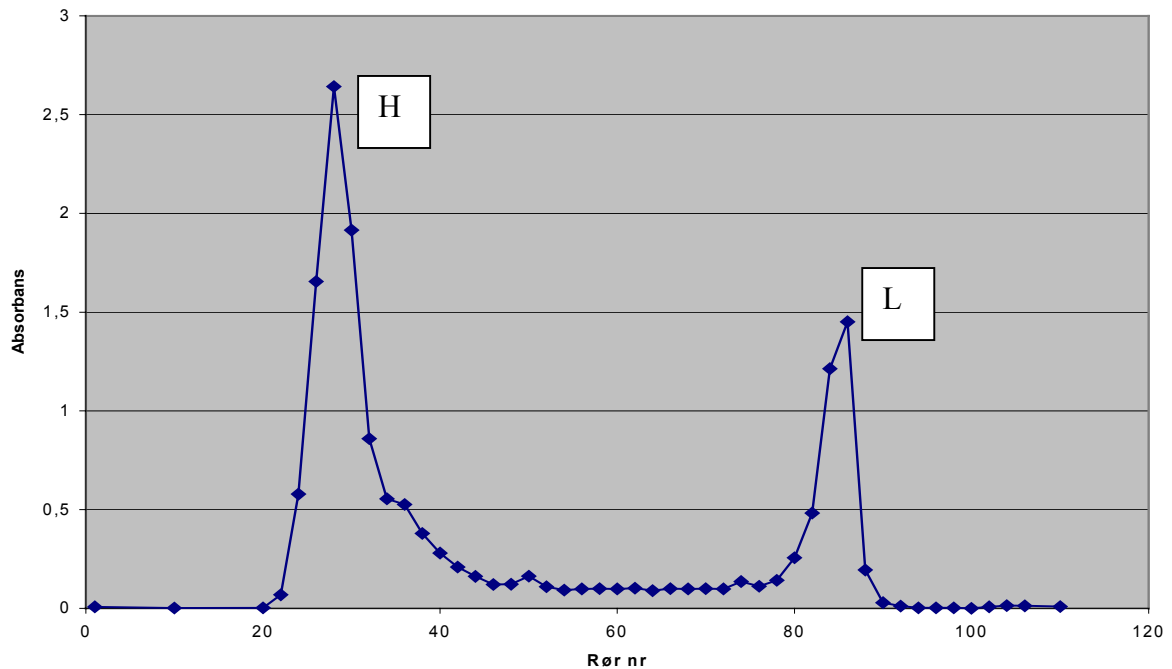
På bakgrunn av aktivitetsstudier og metanolyseresultat ble det besluttet å arbeide videre med fraksjon OC50S1.2. Resultatene fra metanolysen viste at OC50S1.2 inneholder 24-26 % arabinose. I undersøkelsen av bindingsforholdene i fraksjonene ble det slått fast at en stor del av disse sitter terminalt i molekylet. Det ble derfor besluttet å benytte enzymet arabinofuranosidase, for å prøve å få brutt ned noe av strukturen i ”hårete” områder av pektinet.

Det forelå fire ulike typer av dette enzymet i laboratoriet og det ble utført en forundersøkelse for å se hvilket av disse fire som hadde størst evne til å kutte av arabinose-enheter i forbindelsene. Resultatet ble bekreftet ved hjelp av metanolyse. Enzymet ara ”B” 4002, fra et laboratorium i Waageningen i Nederland ble valgt ut på bakgrunn av resultatet fra metanolyseresultatet. Ingen av de fire enzymene evnet å kutte spesifikt arabinoseenheter, uten å kutte noe av andre monosakkaridenhetene i forbindelsen. Grunnen til at enzymer ikke kutter kun det man skulle forvente, kan være forurensninger av andre enzymer. Ara ”B” 4002, var det enzymet som hadde største evne til å kutte av arabinose. Dette kan man se av den lavmolekylære fraksjonen der andelen arabinose er høyest (28,3%), mens nedgangen i den høymolekylære fraksjonen også er høy, fra 18,5% i OC50S1.2 til 5,8 i enzymdegradert fraksjon. Resultatet er vist i tabell 6.8.

Tabell 6.7 Oversikt innhold av arabinose i etter enzymatisk behandling med fire ulike typer arabinofuranosidaser. Der 1. arabinofuranosidase, 2. Novo Arabinofuranosidase, 3. Endo arabinofuranosidase og 4. Ara ”B” 4002.

	HMW	LMW
1.	7,3	20,4
2.	19,0	9,3
3.	17,7	8,1
4.	5,8	28,3

Det ble benyttet Biogel® P-30 til å separere fraksjonene. Dette gav en god separasjon av den høymolekylære og den lavmolekylære fraksjonen som vist i figur 6.11.



Figur 6.11 Karbohydratprofil for fraksjon OC50S1.2.H og OC50S1.2.L etter separasjon på Biogel® P-30. H = høymolekylær fraksjon, L = lavmolekylær fraksjon etter enzymatisk degradering med Ara "B" 4002 (en arabinofuranosidase).

OC50S1.2 inneholder en stor mengde galaktose og enzymet β -galaktosidase ble derfor benyttet for å kutte av galaktose enheter fra pektinet. Den høymolekylære og lavmolekylære fraksjonen ble separert ved hjelp av Biogel® P-30.

6.4.2 Monosakkaridbestemmelse – metanolyse

Monosakkaridinnholdet i de enzymdegraderte fraksjonene ble undersøkt ved hjelp metanolyse. Resultatet er vist i tabell 6.8.

Tabell 6.8 Oversikt over gjennomsnittlig prosentvis monosakkaridinnhold for enzymdegraderte fraksjoner av *O. celtidifolia*. Kun de høymolekylære fraksjonene er tatt med i tabellen.

	OC50S1.2.H	OC50S1.2.H.H
Ara	7,9	9,0
Rha	5,9	4,5
Fuc	1,0	0,6
Xyl	2,5	2,0
Man	9,5	10,6
Gal	34,9	27,2
Glc	11,3	11,2
GlcA	6,8	15,4
GalA	11,5	7,8
4-O-Me-GlcA	8,7	11,7

Man ser en økning i noen av monosakkaridenes prosentvise innhold sammenlignet med innhold i utgangsfraksjonen OC50S1.2. Dette kommer sannsynligvis av at arealene til toppene i GC-kromatogrammet skal bli 100 % til sammen. Når prosentandelen til for eksempel arabinose blir redusert, må prosentandelen til et annet av de detekterte monosakkaridene nødvendigvis øke for at summen skal bli 100 %.

Om man ser på det man ønsket å få spaltet av under den enzymatiske degradingen, arabinose og galaktose, kan man se forskjell i andelen avspaltet materiale mellom de to enzymene. I arabinosefuranosidaseforsøket var nedgangen fra 20,4 %-innhold til 7,9 %-innhold. Relativt sett er dette en nedgang på mer en 50 %. Galaktoseinnholdet økt fra 30,3 % i OC50S1.2 til 34,9 % i OC50S1.2.H. I OC50S1.2.H.H er andelen galaktose redusert fra 34,9 %-innhold til 27,2 %-innhold.

Relativt sett er nedgangen i arabinoseforsøket mye større enn i galaktoseforsøkene. Mengde avspaltet monosakkarid koresponderer ikke tilsvarende. Noe av grunnen til at det er enklere å spalte av arabinose enn galaktose, ligger sannsynligvis i selve strukturen til pektinet.

Arabinofuranosidase er ett enzym som spalter av arabinoseenheter fra ytterst og innover. Vi vet fra undersøkelsene av bindingsstrukturen at pektinene i *O. celtidifolia* inneholder en

betydelig mengde av både 1→5-bundet arabinose (7,9 %) og terminalt bundet arabinose (13,7 %). Disse monosakkaridene sitter ytterst i pektinstrukturen og er derfor lett tilgjengelig for et enzym som arabinofuranosidase.

6.4.3 Undersøkelse av bindingsforholdene i de enzymdegraderte fraksjonene

Ut fra tabell 6.10, ser man at bindingsforholdene for de enzymdegraderte fraksjonene samsvarer godt med resultat fra avsnitt 6.2. OC50S1.2.H ble enzymdegradert med arabinofuranosidase. I tabell 5.10 ser man at innholdet av både terminal-Ara^f og 1→2- Ara er blitt redusert, mens 1→3, 1→5 og 1→2,5-Ara som var tilstede i OC50S1.2 ikke ble detektert i OC50S1.2.H.

For fraksjon OC50S1.2.H.H, ser man en relativt stor nedgang i alle bindinger der galaktose er involvert. Den største reduksjonen ser man for 1→3,6-bundet galaktose.

Tabell 6.9 Oversikt over bindingstyper som ble funnet i de enzymdegraderte fraksjonene av *O. celtidifolia*.

	Bindingstype	OC50S1.2.H	OC50S1.2.H.H
Ara			
	Tf	3,8	2,4
	1→2	4,1	1,1
	1→3	i.d.	4,3
	1→5	i.d.	1,3
Xyl			
	1→4	2,5	i.d.
Rha			
	1→2	4,5	4,5
	1→3	1,4	i.d.
Fuc			
	Tf	1,0	i.d.
Man			
	1→6	9,5	10,6
Glc			
	Tp	4,9	10,0
	1→4	0,4	1,2
	1→4,6	6,0	i.d.
GlcA/4-O-Me-GlcA			
	Tp	i.d.	i.d.
	1→4	15,5	27,1
Gal			
	Tp	12,8	8,6
	1→3	7,1	6,1
	1→4	5,8	0,5
	1→6	i.d.	4,6
	1→3,6	9,2	5,8
	1→2,6	i.d.	0,7
	1→4,6	i.d.	0,7
GalA			
	1→4	11,5	7,8

6.4.4 Molekylvektfordeling

Det er benyttet samme standardkurve under dette forsøket som i avsnitt 6.2.3. Molekylvekten til både de høymolekylære og de lavmolekylære fraksjonene ble bestemt. Resultatet er vist i tabell 6.10. De høymolekylære fraksjonene har fått redusert sin molekylvekt sammenlignet med før enzymatisk degradering. De lavmolekylære fraksjonene har som forventet en lav molekylvekt, fordi det sannsynligvis befinner seg mest av henholdsvis arabinose eller galaktose i disse fraksjonene.

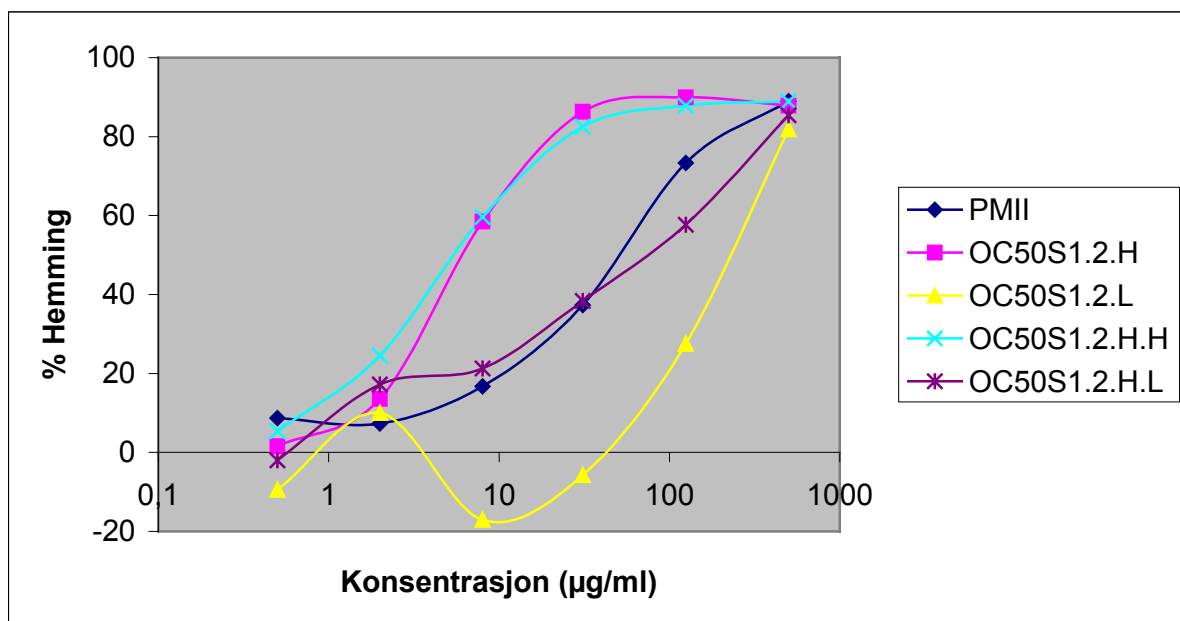
Tabell 6.10 Oversikt over molekylvektintervall for enzymdegraderte fraksjoner av *O. celtidifolia*, samt gjennomsnittlig *M_w*. *M_w topp* er toppunkt for toppen.

Fraksjon	Fra <i>M_w</i> (Da)	Til <i>M_w</i> (Da)	<i>M_w topp</i> (Da)
OC50S1.2.H	378000	9100	76000
OC50S1.2.L	3600	1400	2300
OC50S1.2.H.H	244000	14900	60000
OC50S1.2.H.L	2300	350	900

6.4.5 Biologisk aktivitet

6.4.5.1 Komplementfiksering

Komplementfikseringstesten ble utført to ganger for de enzymdegraderte fraksjonene. På grunn av tendensene fra resultatene på de ikke enzymdegraderte fraksjonene (se avsnitt 6.3.1) og undersøkelser utført tidligere (Togola, Inngjerdingen et al. 2007), var det også forventet å finne aktivitet også hos de høymolekylære enzymdegraderte fraksjonene. Hos de lavmolekylære fraksjonene er ikke forventet å finne aktivitet. Som man ser av IC_{50} -verdien til fraksjonen OC50S1.2.L i tabell 6.11, er den omtrent 10^2 faktor høyere enn hos fraksjonene OC50S1.2.H og OC50S1.2.H.H.



Figur 6.12 Komplementfikserende aktivitet *in vitro* av PM II og fraksjoner av *O. celtidifolia*. Tallmaterialet er vist med logaritmisk skala på x-aksen.

Den lavmolekylære fraksjonen OC50S1.2.H.L viser derimot en tilnærmet like høy aktivitet som de høymolekylære fraksjonene. Dette skiller seg fra det man skulle kunne forvente av resultatene. I prinsippet skal det under den enzymatiske degradering av pektinet klippes av monosakkarider med de enzymene som ble brukt og disse forventes ikke å ha biologisk aktivitet. Resultatet kan tyde på at det er andre forbindelser tilstede i den lavmolekylære fraksjonen som kan ha en komplementfikserende aktivitet. Dette bør naturligvis undersøkes videre med flere repeterende forsøk.

Tabell 6.11 IC_{50} -verdier for enzymdegraderte fraksjoner av *O.celtidifolia*.

Fraksjon	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
PM II	46,3
OC50S1.2.H	6,2
OC50S1.2.L	216,7
OC50S1.2.H.H	6,1
OC50S1.2.H.L	5,3

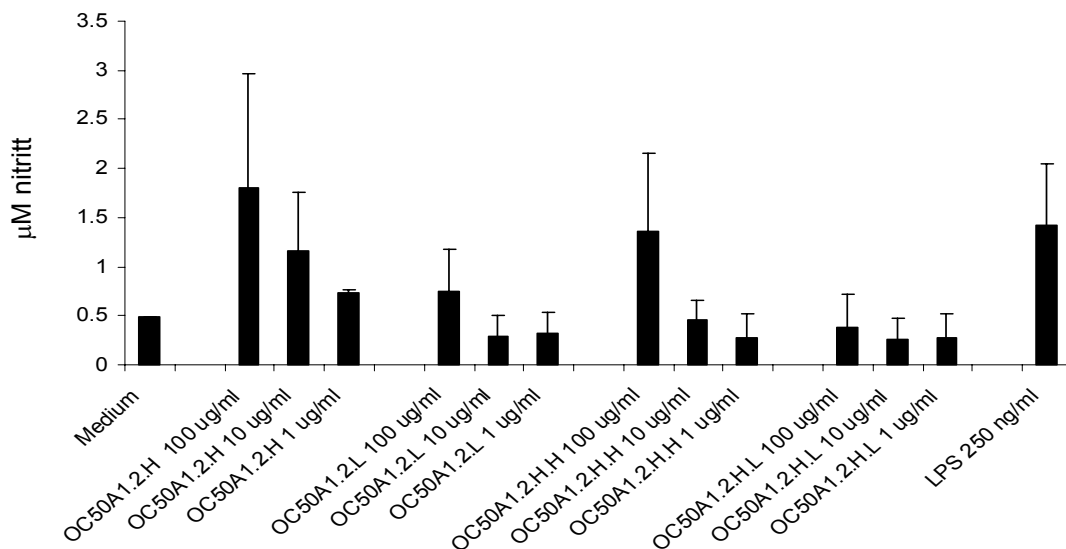
IC_{50} -verdiene til fraksjonene OC50S1.2.H, OC50S1.2.H.H er fremdeles lave sammenlignet med PM II. Det ser derfor ikke ut til at enzymatisk degradering har gått særlig utover den komplementfikserende evnen.

6.4.5.2 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Dette forsøket ble i sin helhet utført av Dr. Marit Inngjerdingen ved Avdeling for Anatomi på Medisinsk Fakultet.

Fraksjonene OC50S1.2.H, OC50S1.2.L, OC50S1.2.H.H og OC50S1.2.H.L, ble undersøkt med hensyn til om de kunne aktivere NO-frigjøring fra makrofager. Betingelsene i forsøket var de samme som under avsnitt 6.3.2. Som man kan se i figur 6.13, induserer de høymolekylære fraksjonene NO-frigjøring med økende konsentrasjon på prøveløsningen. De lavmolekylære fraksjonene, OC50S1.2.L og OC50S1.2.H.L har liten evne til å aktivere NO-frigjøring.

Sammenlignet med resultatet i figur 5.9, er nivået av frigjort NO mindre. Dett skyldes sannsynligvis at forsøket er gjort på en ny batch av celler, og demonstrerer hvor viktig det er å inkludere en standard positiv kontroll. Som man kan se av figuren, induserer de høymolekylære forbindelsene like mye NO-frigjøring som LPS ved den høyeste prøvekonsentrasjonen. Det ville vært veldig interessant å direkte sammenligne de enzymdegraderte forbindelsene med forbindelsene testet i figur 5.9, for å kunne si noe om betydningen av arabinaner og galaktaner for den biologiske aktiviteten.



Figur 6.13 Figuren viser makrofagaktivering, gjennom utskillelse av NO for enzymdegraderte fraksjoner fra *O. celtidifolia*

7 Etnofarmakologisk arbeid i Mali

7.1 Mali – et overblikk



Figur 7.1 Kart over Mali (French Ministry of Foreign Affairs 2007).

Mali ligger i Vest-Afrika, figur 7.1. Det er et stort land, som strekker seg over 1.240.190 km². Områdene nord i landet består av ørken eller semiørken - sahel. Sahelen fungerer som en grense mellom Sahara og de mindre tørre områdene sør i landet. De sørlige områdene består av subtropisk savanne og gressletter. Flere store elver (Niger, Bani og Senegal) gjør at det i det ellers så tørre landskapet er mulig å dyrke både frukt, grønnsaker og ris langs elvebankene (Velton 2004).

Folketallet er ca 14 millioner fordelt på tjuetre ulike folkegrupper, hvorav Malinke og Bambara utgjør de største. Fransk er det offisielle språket i landet, men det lokale språket Bambara er det som flest av landets innbyggere snakker (~80%) (Velton 2004).

7.2 Tradisjonell medisin i Mali

Som i mange andre U-land, har tradisjonell medisin en sterk posisjon blant befolkningen i Mali. Den er et signifikant element i hele kulturen i landet. Bruken har bare økt i takt med økte priser på konvensjonell vestlig medisin. Man antar at omtrent 80% av landets befolkning benytter seg av tradisjonell medisin som eneste behandlingsform ved sykdom. Offisiell medisinsk tilgang er som oftest basert på kommersielle legemidler som må kjøpes med penger. En konsultasjon hos en healer koster for det første mye mindre, samtidig med at det man trenger av medisinplanten til en behandling med i prisen. (Togola, Diallo et al. 2005)

Institutt for Tradisjonell Medisin (DMT), er institusjonen som driver forskning på medisinplanter i Mali. De har som formål å registrere tradisjonelle healere, tradisjonell kunnskap og medisinplanter. Dette arbeidet gjøres gjennom feltarbeider rundt omkring i landet. De driver i tillegg forskning på medisinplantene på DMT. Dette har så langt bidratt til utvikling av tolv standardiserte formuleringer med forbedrede tradisjonelle medisiner (ITMs). Syv av disse står i dag på listen over essensielle medisiner i Mali (Togola, Diallo et al. 2005). Tabell 7.1 viser en oversikt over disse.

Tabell 7.1 Oversikt over ITMs som står på listen over essensielle medisiner i Mali per dato.

ITM	Bruksområde
<i>Balembo</i>	Hoste
<i>Dysenterial</i>	Dysenteri
<i>Gastroседal</i>	Magesår og gastritt
<i>Hepatisane</i>	Hepatitt
<i>Laxia-cassia</i>	Forstoppelse
<i>Malarial</i>	Malaria
<i>Psorospermine</i>	Dermatitt

7.3 Etnofarmakologiske studier i Mali

Det ble utført to feltarbeider under oppholdet i Mali. Begge to fant sted i Sikasso-regionen sør i landet. Det første mellom 16. til 20. mars 2007, fant sted i landsbyer i Diolia-distriktet. Det andre feltarbeidet fra 3. til 6. april 2007 i landsbyer i Koutiala-distriktet. I alt ble 54 healere intervjuet i løpet av de to feltarbeidene.

Healerne fikk spørsmål vedrørende plantene *Opilia celtidifolia*, *Erythrina senegalensis*, *Biophytum persentianum*, *Combretum glutinosum* og *Syzygium guineense*.

Hver healer ble spurt om navn, alder og hvilken landsby de bodde i. Deretter fikk de spørsmål direkte om planten.

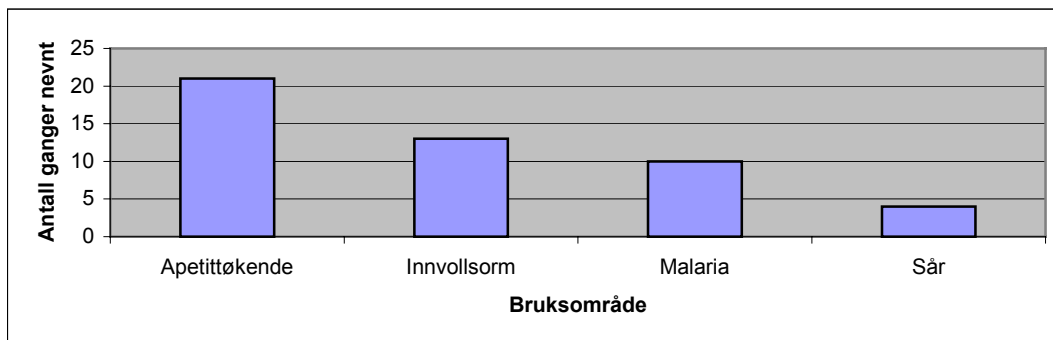
1. Kjenner du til planten og dens navn på lokalspråket?
2. Bruker du planten, og i tilfelle til hvilke(n) indikasjon(er)?
3. Hvilken del av planten blir brukt og hvordan blir den tilberedt?
4. Hvilken administrasjonsvei og dosering har planten?

For resten av oppgaven har jeg valgt å konsentrere meg om resultater fra intervjuene vedrørende *Opilia celtidifolia*, fordi dette er mest relevant for min oppgave.

7.4 Healerintervjuer

7.4.1 Dioliaregionen

Under det første feltarbeidet ble intervjuene foretatt i landsbyene N'dia dougoutigulia, Beleco og N'golobougou i Dioliadistriktet. I alt trettiseks healere ble intervjuet under dette feltarbeidet og alle brukte *O. celtidifolia* i sin praksis. Planten vokser i områdene rundt de aktuelle landsbyene og er derfor lett tilgjengelig for healerne. Så mange som trettito bruksområder ble nevnt og de mest siterte er vist i figur 7.2. Den tilberedningsmåten som er mest brukt er å lage et dekokt av bladene, som drikkes. Resultatet er vist i tabell 7.2.



Figur 7.2 Oversikt over de mest siterte bruksområdene under feltarbeidet i Dioliaregionen.



Bilde 7-1 Intervju med healer under det første feltarbeidet i landsbyen Beleco i Diolia regionen.

Tabell 7.2 Resultat fra healerintervjuer i Dioliaregionen i Mali fra feltarbeid 16. – 20. mars 2007.

HEALERENS NAVN, alder og bosted	Lokalt navn på <i>Opilia celtidifolia</i>	Indikasjon(er)	Tilberedelse og bruk av planten	Kommentar
1. Fanto Yaya Diabate, (39), N'dia dougoutigulia	koronguê	-sunnhetsmiddel -malaria -styrkende for musklene -stopper oppkast	Dekokt av blader . Drikk 1 teglass morgen, middag og kveld. Drikk dekoktet.	Avkjøles etter koking.
2. Paul Diabate, (62), N'dia dougoutigulia	koronguê	-teniasis. (Stor innvollsorm) -apetittøkende -dysmenoré	Dekokt av blader . Drikk 1 teglass før frokost i 3 dager. Dekokt av blader . En kylling drepes og flås. Suppe med vannet fra dekoktet.	Bivirkning: Diaré
3. Michel Diabate, (55), N'dia dougoutigulia	koronguê	-innvollsorm	Dekokt av blader . Drikk og vask kroppen. 1 gang daglig i 1 uke.	Kan brukes på samme måte til dyr.
4. Bakari Fomba, (78), N'dia dougoutigulia	koronguê	-innvollsorm -småår	Dekokt av blader . Drikk og ta et bad.	
5. Sidiki Diarra, (50++), N'dia dougoutigulia	koronguê	-magesmerter -apetittøkende	Dekokt av blader/ rot . Drikk 1 gang daglig i høyst 1 uke eller til symptomene forsvinner.	
6. Sinali Dambere, (57) Koloko	koronguê	-teniasis (stor innvollsorm) -apetittøkende	Dekokt av blader og stilker . 1 te- glass drikkes 1 gang daglig i noen dager, deretter 1 teglass	

			2 ganger daglig.	
7. Somana Sangare, (45), Blendio Bogola	koronguê	-innvollsorm -svakhet	Dekokt av noen få blader i en tekopp. Tilsettes 1 teglass vann og kokes opp. 1 tekopp drikkes 1 gang daglig i 7 dager. Pulver av blader blandes i grøt og drikkes daglig.	Kan brukes som erstatning for kaffe/te.
8. Clement Kolibali, (49), Dianasoba	koronguê	-apetittøkende -innvollsorm	Dekokt av en liten stilk i en tekopp. Kokes med 3 te-glass vann. Drikk 1 teglass.	
9. Victor Dameli, (67), Guguina Bamana	koronguê	-apetittøkende -magesår -innvollsorm	Dekokt drikkes inntil 5 ganger daglig. Gjentas hver dag. Dekokt. Filtreres før det drikkes. Kur på 5 dager. Dekokt drikkes. Vil drepe parasitten.	Kokes om igjen til fargen forsvinner. Hoved-indikasjon. Hadde med seg <i>O. celtidifolia</i> .
10 Sangare Biangare, (57), Flalla Damene	koronguê	-innvollsorm -apetittøkende	Dekokt av en bunt blader og stilker i 1 liter vann. Filtreres etter oppkok. Drikk 1 teglass daglig i 15 dager.	
11. Ibrahim Sangare, (60), Fogoudougou-dialla	koronguê	-malaria	Roten kuttes i små biter. Tørkes og pulveriseres. Blandes med vann og drikkes.	
12. D'ate Sangare, (43), Flalla	koronguê	-Apetittøkende -Innvollsorm	Dekokt av blader i en tekopp. Drikk 1 teglass 3 ganger daglig.	

		-Mørkreddhet hos barn -Alvorlig (protein) feilernæring hos barn.	Dekokt av blader som barnet vaskes med. Dekokt. Kroppen vaskes og 1 håndfull drikkes.	
13. Aluz Sangare, (56), Blendio Bogola	koronguê	-Infeksjon -Profylaktisk mot meningitt -Malaria -Ikterus	Dekokt av blader . Filtreres etter oppkok. Hele familien drikker litt i november. Pulver av roten . 3 fingrer i 1 tekopp. Drikk 1/3 tekopp.	Fungerer som vaksine. Bivirkning: Oppkast
14. Jokoba Kani, (70), N'golokona	koronguê	-psykose fra infeksjon -oncosercus volvulus -uklart syn	Dekokt av blader blandet med blader fra <i>Aloe buettneri</i> og blader fra <i>Landolfia echinata</i> . Drikk og vask kroppen. Dekokt av blader . Brukes til å vaske øynene.	
15. Sambile Dambele, (80), Niangiola	koronguê	-feber -forebyggende mot sykdom	Dekokt av blader . Litt drikkes, vask kroppen og ta dampbad.	
16. Korotomba Fomba, (53), Bogokovala	koronguê	-ikterus -apetittøkende -ryggsmerter -hodepine -tretthet	Dekokt av blader . 1 teglass drikkes. En liten mengde – 1 teglass drikkes	Bivirkning: Diaré (1 tekopp er for mye). Kvinne
17. Lassima	koronguê	-innvollsorm -apetittøkende	Dekokt av blader og	

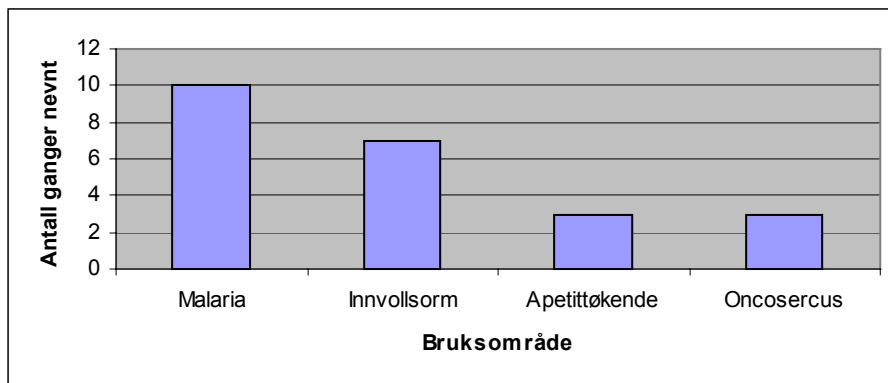
Bereukulalo			stilker. 1 teglass drikkes 1 gang daglig i 7 dager.	
18. Salefo Bomba, (42), Selasouba	koronguê	-malaria	Dekokt av blader. ½ tekopp drikkes før frokost.	Bivirkning: mer enn ½ tekopp gir diaré/ oppkast.
19. Halo Fomba, (59), Fallani	koronguê	-innvollsorm -apetittøkende -magesmerter	1 teglass drikkes 1 gang daglig i 4 dager.	
20. Arona Fané, (53), N'golocona	koronguê	-ikterus -innvollsorm -apetittøkende	En 15 cm lang stilk med blader i en tekopp. 1 teglass drikkes.	Bivirkninger ved mer enn 1 teglass.
21. Yousouf Colibali, (58), Komobougou	koronguê	-ødem -epilepsi	Dekokt av blader. Drikk og vask kroppen. Dekokt av blader og rot. Drikk og ta dampbad 1 gang daglig.	Ikke spis geitekjøtt under behandlingen
22. Seido Traore, (53), Kaya	koronguê	-apetittøkende	Dekokt av 1-3 baller av blader. Drikk 1 teglass 3 ganger daglig og vask kroppen i 3 dager.	
23. Daman Diarra, (65), Kaya	koronguê	-gass i abdomen -brystsmerter	Dekokt av blader. 1 teglass drikkes 1 gang daglig i 7 dager. Dekokt av blader. Ta dampbad og drikk 1 gang daglig i 3/4 dager.	3 for menn, 4 for kvinner.
24. Diakaria Mariko, (57), Mourila	koronguê	-forhindrer infeksjoner/ epidemi -innvollsorm -apetittøkende	Dekokt av blader. Kroppsvask. Dekokt av	

			blader . Drikk ~100 ml 1 gang daglig.	
25. Madra Diallo, (45), Sankoro	koronguê	-tretthet -apetittøkende -feber	Dekokt av blader . Drikk 1-2 teglass (i starten) 3 ganger daglig og ta et bad.	Drikk høyst ½ liter om dagen.
26. Pie Mariko, (48), Korosokorala	koronguê	-Feber -apetittøkende	Dekokt av blader og stilker . 2 bunter i 10 liter vann. Drikk 1-2 teglass 1 gang daglig i 7 dager og vask kroppen. 3-4 baller av blader og stilker i en 10 litersbøtte. Kok opp. Ta et bad og drikk.	3 for menn, 4 for kvinner.
27. Sida Tigi, (90), N'golobougou	koronguê	-smerter i kroppen og muskler	Dekokt av blader og stilker . Drikk så mye man kan, vask kroppen og ta dampbad.	
28. Alou Traore, (47), Schion Diorola	koronguê	-tonic -malaria -apetittøkende	Dekokt av blader og stilker . Kroppen vaskes 1 gang daglig. Dekokt av blader og stilker . Drikk 1 teglass.	
29. Vamare Sangare, (75), N'golobougou	koronguê	-malaria	Dekokt av blader . Drikk ~200 ml 1 gang daglig i 7 dager.	
30. Drissa Sangare, (63), N'golobougou	koronguê	-apetittøkende	Dekokt av blader . 1 teglass drikkes 1 gang daglig i 3 dager.	

34. Bintou Diarasoba, (45), N'golobougou	koronguê	-Malaria -Apetittøkende	Blader. Kokes til vannet ikke lenger farger av. Drikk 2-4 håndfuller daglig.	Kvinne
35. Minata Sangare, (55), N'golobougou	koronguê	-Forebyggende mot malaria -Apetittøkende	Dekokt av blader og stilker. Drikk 200 ml og vask kroppen.	Kvinne
36. Kayato Sidibe, (45), N'golobougou	koronguê	-Apetittøkende -Infeksjon, spesielt vulvovaginitt	Dekokt av blader. Kroppen vaskes og 1 teglass drikkes 3 ganger daglig. Dekokt. Drikk 2 håndfuller. Når løsningen er litt varm, settes ungen i. Rist til det skummer og vask ungen.	Kvinne

7.4.2 Sikassoregionen

Under feltarbeidet i Sikassoregionene ble de fleste intervjuene foretatt i Koutiala og de 4 siste i landsbyen Signe. Det ble intervjuet i alt 18 healere under dette feltarbeidet. 15 av disse brukte *O. celtidifolia*. Resultatet er vist i tabell 6.3. Det ble nevnt 11 ulike bruksområder og de flest siterte er vist i figur 7.3. Dekokt av blader og stilker som drikkes, er mest brukte tilberedningsmåte og denne drikkes. Planten vokser i områdene rundt de aktuelle landsbyene og er derfor lett tilgjengelig for healerne.



Figur 7.3 Oversikt over de mest siterte bruksområdene under feltarbeidet i Sikassoregionen.



Bilde 7-2 Healere og intervjuere samlet etter siste intervju på feltarbeidet i Sikassoregionen i landsbyen Signe.

			1 gang daglig i 1 uke	Bivirkning: diaré
6. Jammadou Traore, (53), Koutiala	koronguê	-mara; oncosercus -innvollsorm	Pulver av blader blandes med pulver av chili og salt og legges på tungen. Dekokt av 3/4 baller av blader . Dampbad av hodet, kroppsvask, drikk høyst 1 teglass 2 ganger daglig i 15 dager. ½ teskje pulver fra blader blandes med melk. Drikk før frokost. Behandling til ormen er borte.	3 for menn, 4 for kvinner.
7. Abdoulaye Bouare, (57), Koutiala, oppvokst i Foum Bamana Housabougou	koronguê	-malaria -sterilitet	Dekokt av rot blandet med sitron. En gresskarøse drikkes 1 gang daglig. Pulver av rotbark . 2 · 2 fingre blandes i grøt og drikkes 1 gang daglig i 24 dager.	Bland i sitron.
8. Salia Koné, (?) Koutiala	Koronguê	-malaria -apetittøkende	Dekokt av rot og blader . Drikk 1 teglass før frokost 3 ganger daglig. Kroppsvask.	
9. Mama Tangare, (54), Koutiala, oppvokst i Bella	koronguê	-malaria -urinveisinfeksjon -innvollsorm	Dekokt av blader blandet med blader fra <i>Heria iselis</i> . Drikk 1 teglass 3 ganger daglig og vask kroppen. Pulver av roten blandes med sitronskall 1:1. 1 ts blandes i grøt og drikkes.	
10. Kaly Bagayoko, (58), Koutiala, oppvokst i Kita	koronguê	-malaria	Dekokt av blader . 2 kaffekopper drikkes 1 gang daglig.	
11. Samba	waraka	-malaria	Dekokt av rot/blader .	

Diarra, (50), Koroka	munko		Drikk 1 håndfull og vask kroppen.	
12. Salia Diabate, (81), Signe	sula minkon	-malaria	Dekokt av blader . Drikk 2 teglass/ 3 håndfuller 1 gang daglig i 7 dager	
13. Drama Diabate, (65), Signe	koronguê	-forgiftning	1. Dekokt av blader drikkes. 2. litt dekokt blandes med egg og olje og drikkes. 3. Kroppsvask med vann fra dekokt.	Må drikke nok. Bivirkning: Oppkast og diaré.
14. Yousouf Diabate, (55), Signe	koronguê	-malaria -brystsmerter -forstoppelse -magesmerter	Dekokt av blader og stilker . Drikk ½ teglass.	Bivirkning: Diaré. Fare for forgiftning
15. Mammadou Sannogou, (44), N'tiesso	koronguê	-malaria -innvollsorm -astenia -onkosercus	Dekokt av blader og stilker . Blandes med NaCl, <i>Afromumum digita</i> , og frukt fra <i>Xylophia aetiopika</i> . u/ 6 år: 1 ss 6-15 år: 1 teglass voksne: 3 teglass	Bivirkning: Diaré.

8 Konklusjon

Struktur –og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra *Opilia celtidifolia*.

Opgavens første mål var å utføre struktur -og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra *Opilia celtidifolia*. Adiaratou Togola har før arbeidet med denne planten og arbeidet hennes er blitt videreført i denne oppgaven.

Isolering av polysakkarider

Det er blitt utført videre separering av polysakkaridene etter molekylstørrelse ved gelfiltrering. Disse fraksjonene ble deretter degradert ved hjelp av enzymene arabinofuranosidase og β -galaktosidase.

Stuktur

Det ble utført bestemmelse av bindingsforholdene i fraksjonene fra gelfiltrering og høymolekylære enzymdegraderte fraksjoner. Samme type strukturelementer ble funnet i alle fraksjonene, men mengdeinnholdet varierte. Alle fraksjonene viste innhold av 1 \rightarrow 2-Rha og 1 \rightarrow 4-GalA, som utgjør ryggraden til RG-I.

OC50S1.1 og OC50S1.2 viste størst innhold av 1 \rightarrow 3,6-Gal og T-Araf. Dette indikerer tilstedeværelse av arabinogalaktan type II i polysakkaridene. I tillegg sees innhold av 1 \rightarrow 3-Gal og 1 \rightarrow 4-Gal i disse fraksjonene. Dette indikerer tilstedeværelse av AG-I. Disse strukturelementene er nok også tilstede i OC50S2.1 og OC50S2.2, men i mindre grad.

Fraksjonene OC50S2.1 og OC50S2.2 har et større innhold av 1 \rightarrow 4-Xyl og 1 \rightarrow 4-Glc, enn fraksjonene OC50S1.1 og OC50S1.2 og dette kan indikere tilstedeværelse av xyloglukaner. Innholdet av 1 \rightarrow 6-Man kan tyde på innhold av glukomannaner.

I OC50S1.2.H sees en nedgang i bindinger inneholdene arabinose etter degradering med arabinofuranosidase. I OC50S1.2.H.H.1 og OC50S1.2.H.H.2 sees en nedgang i bindinger som inneholder galaktose etter degradering med β -galaktosidase. Dette er som forventet og indikerer at enzymene har virket slik de skulle.

Innholdet av proteiner ble bestemt å være mellom 6 og 8 % i de undersøkte fraksjonene. Dette kan være strukturelle proteiner, eller arabinogalaktaner-bundne proteiner (AGP).

Gjennom IR-spektroskopi, ble tilstedeværelse av forestrede grupper i forbindelsene bestemt. Alle de undersøkte fraksjonene viste innhold av dette.

Biologisk aktivitet

Alle fraksjoner er blitt testet for evne til komplementfiksering. Videre separering etter molekylstørrelse og etterfølgende degradering ved hjelp av enzymene arabinofuranosidase og β -galaktosidase ser ikke ut til å ha senket denne aktivitet slik man vanligvis forventer.

Fraksjonene *O. celtidifolia* har meget høy komplementfikserende evne, selv etter enzymatisk degradering og dette kan tyde på at andre forbindelser man ennå ikke vet om også bidrar til aktiviteten.

Alle fraksjoner er blitt test med hensyn til om de kan aktivere makrofager. Denne evnen er doseavhengig og ved konsentrasjonen 100 μ g/ml på prøveløsningen, er stimuleringsgraden sammenlignbar med LPS.

Fraksjonene fra ionebytter og gelfiltreringen ble undersøkt med hensyn til om de kunne indusere B-celleproliferasjon. Alle fraksjonene viste noe evne til å stimulere B-celleproliferasjon. Denne var så ut til å være doseavhengig. Det ville vært interessant å gjøre dette forsøket med de enzymdegraderte fraksjonene. Dette ble det imidlertid ikke tid til

Etnofarmakologiske studier i Mali

Oppgavens andre mål omhandlet etnofarmakologiske studier av tradisjonell bruk av *Opilia celtidifolia* i Mali. Det ble utført 2 feltarbeider under oppholdet i Mali, et i Dioliaregionen og et i Sikassoregionen. Av de 54 healerne som ble intervjuet var det bare 3 som ikke benyttet *O. celtidifolia* i sin praksis.

Bruksområdene appetittøkende, mot innvollsorm og malaria er de mest siterte i begge områder. Korrelasjonen mellom de to distriktene med hensyn til bruksområder synes å være god.

9 Referanser

Bio-Rad Laboratories (2000). "Bio-Gel P Polyacrylamide Gel. Instruction Manual."

Burkill, H. M. (1997). The useful plants of West Tropical Africa. Kew, Royal Botanic Gardens.

Supplement til: The Flora of West Tropical Africa, 2. utg. (1954-1972)

Chambers, R. E. and J. R. Clamp (1971). "An Assessment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of Carbohydrate-Containing Materials." Biochemical Journal **125**: 1009-1018.

Ciucanu, I. (2006). "Per-*O*-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **576**: 147-155.

Crespin, F., E. Olliver, et al. (1993). "Triterpenoid Saponins from *Opilia celtidifolia*." Phytochemistry **33**(3): 657-661.

Diallo, D., B. S. Paulsen, et al. (2003). "The malian plant *Trichilia emetica*; studies on polysaccharides with complement fixing ability." Journal of Ethnopharmacology **84**: 279-287.

Diallo, D., C. Sogn, et al. (2002). "Wound Healing Plants in Mali, the Bamako Region. An Ethnobotanical Survey and Complement Fixation of Water Extracts from Selected Plants." Pharmaceutical Biology **40**(2): 117-128.

Dubois, M. (1956). "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." **28**(3): 350-356.

Evjenth, R. K. (2007). *Opilia celtidifolia*. **1,35 MB**.

French Ministry of Foreign Affairs (2007). Kart over Mali.

GE Healthcare (2007). "Sephacryl S-100, S-200, S-300, S-400, S-500 High Resolution Instruction Manual."

GE Healthcare Bio-Sciences AB (2006). "DEAE Sepharose Fast Flow. I Instruction Manual."

GE Healthcare Bio-Sciences AB (2006). "Superose 6 prep grade, Superose 12 prep grade, Instruction Manual."

GE Healthcare Biosciences AB (2007). "PD-10 Desalting Columns Instruction Manual."

Greibrokk, T. (1994). Eksklusjonskromatografi (gelkromatografi). Kromatografi. G. T., E. Lundanes and K. E. Rasmussen. Oslo, Universitetsforlaget: 300.

Greibrokk, T. (1994). Ionebytterkromatografi. Kromatografi: separasjon og deteksjon. G. T., E. Lundanes and K. E. Rasmussen. Oslo, Universitetsforlaget: 300 s.

1. utg. Oslo : Universitetsforl., 1984

1.-3. utg. ved Tyge Greibrokk, Jan Karlsen, Knut E. Rasmussen

Inngjerdingen, K. (2007). Bioactive pectic polymers from Malian medicinal plants. Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Oslo, Oslo. **Ph.D.**

Inngjerdingen, K., A. Coulibaly, et al. (2006). "A complement Fixing Polysaccharide from *Biophytum petersianum* Klotsch, a Medicinal Plant from Mali." Biomacromolecules **7**: 48-53.

Inngjerdingen, K., C. S. Nergaard, et al. (2004). "An ethnopharmacological survey of plants used for wound healing in Dogonland, Mali, West Africa." Journal of Ethnopharmacology **92**: 233-244.

Inngjerdingen, K., T. Patel, et al. (2007). "Immunological and structural properties of a pectic polymer - GOA2 - from *Glinus oppositifolius*." Glycobiology doi:10.1093/glycob/cwm088.

Judd, W. S., C. S. Campbell, et al. (1999). Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.

Khan, M. N., O. Ngassapa, et al. (2000). "Antimicrobial activity of tanzanian chewing sticks against oral pathogenic microbes." Pharmaceutical Biology **38**(3): 235-240.

Kim, J.-B. and N. C. Carpita (1992). "Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles." Plant Physiology **98**: 646-653.

Lea, T. (2000). Basal og klinisk immunologi - prinsipper og molekylære mekanismer. Bergen, Fagbokforlaget.

Lin, Z.-B. (2005). "Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-modulation

by *Ganoderma lucidum*." Journal of Pharmacological Sciences **99**: 144-153.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein Measurement with the folin phenol reagent." The Journal of Biochemical Chemistry **193**(1): 265-275.

Lundanes, E. (1994). Koblinger med MS. Kromatografi. G. T., E. Lundanes and K. E. Rasmussen. Oslo, Universitetsforlaget: 255-274.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, et al. (2003). Brock biology of microorganisms. Upper Saddle River, N.J., Prentice Hall.

Maiga, A., D. Diallo, et al. (2005). "A survey of toxic plants on the market in the district of Bamako, Mali: traditional knowledge compared with a literaturesearch of modern pharmacology and toxicology." Journal of Ethnopharmacology **96**: 183-193.

Michaelsen, T. E., A. Gilje, et al. (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.

Nergaard, C. S., H. Kiyohara, et al. (2006). "Structures and Strucutre-Activity Relationships of Three Mitogenic and Complement Fixing Pectic Arabinogalactans from the Malian Antiulcer Plants *Cochlospermum tinctorum* A. Rich and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp." Biomacromolecules **7**: 71-79.

Nergaard, C. S., T. Matsumoto, et al. (2004). "Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp (Asteraceae)." Carbohydrate Reasearch: 115-130.

Parham, P. (2005). The immune system. New York, Garland.

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

Paulsen, B. S. and H. Barsett (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. Polysaccharides I. Berlin, Springer-Verlag. **186**: 69-101.

Pedersen-Bjergaard, S. (1999). Spektroskopiske metoder for legemiddelanalyse Bind 1. Oslo, Universitetsforlaget.

Pérez, S., M. A. Rodríguez-Carvajala, et al. (2003). "A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function." Biochimie **85**(1-2): 109-121.

Promega Corporation (2005). Griess Reagent System. I Technical Bulletin. INSTRUCTION FOR USE OF PRODUCT G2930. Madison, WI, Promega Corporation.

Rangjord, R. V. (2003). Sårhelende planter i Mali - feltarbeid i Dioila og Bandiagara og studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra *Opilia celtidifolia*. Avdeling for Farmasøytisk Kjemi. Oslo, Oslo. **Cand. Pharm.**

Rasmussen, K. E. (1994). Gasskromatografi. Kromatografi. G. T., E. Lundanes and K. E. Rasmussen. Oslo, Universitetsforlaget: 109-153.

Samuelsen, A. B., B. S. Paulsen, et al. (1996). "Characterization of a biologically active pectin from *Plantago major* L." Carbohydrate Polymers **30**: 37-44.

Schepetkin, I. A. and M. T. Quinn (2005). "Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential." International Immunopharmacology **6**: 317-333.

Sturgeon, R. J. (1990). Monosaccharides. Methods in plant biochemistry. P. M. Dey and J. B. Harborne. London, Academic Press. **2**: 10 b.

Sweeley, C. C., R. Bentley, et al. (1963). "Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivates of Sugars and related Substances." Journal of the American Chemical Society **85**: 2497-2507.

Taiz, L. and E. Zeiger (2006). Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. Plant physiology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates: 313-.

Togola, A., D. Diallo, et al. (2005). "Ethnopharmacological survey of different uses of seven medicinal plants from Mali (West Africa) in the regions Diolia, Kolokani and Siby." Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine **1**(1): 1-9.

Togola, A., M. Inngjerdingen, et al. (2007). "Polysaccharides with Complement Fixing and Macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, Isolation and Partial Characterisation." Journal of Ethnopharmacology doi:10.1016/j.jep.2007.10.017.

Velton, R. (2004). Mali - THE BRADT TRAVEL GUIDE. Trento, Bradt Travel Guides Ltd.

Voragen, A. G. J., P. J. H. Daas, et al. (2000). Enzymes as tools for structural studies of pectins. Bioactive Carbohydrate Polymers. B. S. Paulsen. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 129-145.

Willats, W. G. T., L. McCartney, et al. (2001). "Pectin: cell biology and prospects for functional analysis." Plant Molecular Biology **47**: 9-27.

Yamada, H. and H. Kiyohara (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. Immunomodulatory Agents from Plants. H. Wagner. Basel, Birkhäuser Verlag: 161-202.