

Polysakkarider med biologisk
aktivitet isolert fra to medisinplanter
fra Mali brukt mot malaria

Cassia occidentalis

Lippia chevalieri

Nour Abou Jieb



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Høst 2014

Polysakkarider med biologisk
aktivitet isolert fra to
medisinplanter fra Mali brukt mot
malaria

Cassia occidentalis

Lippia chevalieri

Nour Abou Jieb

Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

September 2014

Veiledere:

Professor: Berit Smestad Paulsen

Post doctor: Yuanfeng Zou

© Nour Abou Jieb

2014

Polysakkarider med biologisk aktivitet isolert fra to medisinplanter fra Mali brukt mot malaria, *Cassia occidentalis* og *Lippia chevalieri*

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

C.occidentalis og *L.chevalieri* vokser hovedsakelig i tropiske områder i og noen deler av Asia. Bladene fra *C.occidentalis* samt bladene og rotbark fra *L.chevalieri* brukes mye i tradisjonell medisin blant annet mot malaria. Flere studier har vist at polysakkarider isolert fra tradisjonelle planter kan ha immunmodulerende egenskaper. Målet med oppgaven var å isolere polysakkarider fra *C.occidentalis* og *L.chevalieri* og for deretter å undersøke struktur og biologisk aktivitet relatert til immunsystemet.

Arbeidet startet med ekstraherte mengder av to fraksjoner fra *C.occidentalis* 50 °C og 100 °C og to fraksjoner *L.chevalieri* ekstrahert også med 50 °C og 100 °C destillert vann. På grunn av feil under prøveopparbeidelse ble prøvene fra *L.chvalieri* blandet sammen og da ble det bestemt å fortsette med denne blandingen av de to fraksjonene og kalle dem vannløslige polysakkarider fra *L.chevalieri*. Ekstraksjon av bladene til de to plantene ble utført av Mei Gi Chaug.

Ekstraktene av polysakkaridene fra *C.occidentalis* og *L.chevalieri* ble opprenset ved ionebytterkromatografi med ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub). Polysakkaridene i disse to plantene ble separert og delt opp i kun sure fraksjoner. Disse fraksjonene som ble isolert ved ionebytterkromatografi ble rensert på en gelfiltreringskolonne. Av *C.occidentalis*-fraksjoner 50 °C og 100 °C etter ionebytter hadde C100 den høyeste aktivitet, og fra fraksjoner til vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* viste blandingen av LA og LC fraksjon den høyest aktivitet på komplementfikseringstesten. Alle fraksjoner fra disse to plantene ble rensert ytterligere på gelfiltreringskolonne. CCI og LAI var de mest potente fraksjoner i komplementfikseringstesten.

Monosakkaridsammensetningen til de fleste fraksjonene etter gelfiltrering ble bestemt. De fleste hadde høyt monosakkaridinnhold, med unntak av fraksjoner som hadde lav molekylvekt. Bindingsforholdene i CBI, C100III, LAI, LBI, LBII, LCI, LCIII og Fraksjon I ble analysert. Disse åtte hadde ulik grad av arabinogalaktaner og galaktose. Man antar at CBI, LAI, LBI, LCI og fraksjon I inneholder varierte mengder av AG-II, RG-I og HM.

På bakgrunn av mengde karbohydrat, mengde stoff og komplementfikserende aktivitet ble det valgt å gå videre med LBI. Fraksjonen ble enzymdegradert, Fraksjon I fikk betydelig økning i komplementfikserende aktivitet. Trolig bidrar RG-II og AG-II til bioaktiviteten i Fraksjon I.

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Først vil jeg takke min veileder Berit Smestad Paulsen for all god oppfølging og den faglige veiledningen under arbeidet med masteroppgaven.

Stipendiaten Zou Yuanfeng fortjener også en særskilt takk for god hjelp på laboratoriet og veiledningen

En stor takk rettes til alle de andre ansatte og studenter ved avdelingen for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, for å være en utrolig trivelig og hjelpsom avdeling.

Til slutt ønsker jeg å rette en stor takk til Shatha Aass og ikke minst til min kjære Mustafa, for støtte, tålmodighet og oppmuntring.

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	10
1 Innledning.....	13
1.1 Polysakkarider.....	13
1.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter	13
1.2 Polysakkarider i plantecelleveggen	14
1.3 Biologisk aktive polysakkarider	19
1.4 Immunmodulerende aktivitet	20
1.4.1 Komplementsystemet	20
1.5 Malaria og den globale utviklingen av sykdommen	22
1.5.1 Malariaparasittens livssyklus	22
1.5.2 Dagensbehandling og Resistensutvikling.....	23
1.6 Botanikk og habitat	25
1.6.1 <i>Cassia occidentalis</i> Linn	25
1.6.2 <i>Lippia chevalieri</i> Mould.....	25
1.6.3 Taksonomisk klassifisering	26
2 Metoder	28
2.1 Generelle metoder	28
2.1.1 Vannkvalitet	28
2.1.2 Filtrering.....	28
2.1.3 Innveing.....	28
2.1.4 De-gassing av løsninger	28
2.1.5 Blanding av løsninger.....	28
2.1.6 Måling av pH.....	29
2.1.7 Volumreduksjon	29
2.1.8 Frysetørking	29
2.1.9 Vask av dialyseslanger	30
2.1.10 Syrevask av glass-utstyr	31
2.1.11 Dialyse.....	32
2.1.12 Jod-jod-kalium testen	34
2.2 Ionebytterkromotografi	34
2.2.1 ANX Sepharose 4 Fast Flow (High Sub).....	36

2.3	Gelfiltrering.....	37
2.4	Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold.....	39
2.4.1	Fenolsvovelsyre testen	39
2.5	Monosakkaridbestemmelse	41
2.5.1	Metanolyse	41
2.5.2	TMS-derivatisering	42
2.5.3	Gasskromatografi	43
2.6	Strukturoppklaring	45
2.6.1	Metylering	45
2.6.2	GC-MS	52
2.7	Immunmodulerende aktivitet	53
2.7.1	Komplementfikseringstest	53
2.8	Enzymatiskdegradering.....	56
3	Resultater og diskusjon	59
3.1	Isolering av polysakkarider	62
3.1.1	Ionebytterkromatografi – ANX Sepharose (Fast Flow).....	62
3.1.2	Gelfiltrering.....	63
3.2	Struktur og aktivitetsforhold- <i>C.occidentalis</i> 50 °C.....	67
3.2.1	Monosakkaridsammensetning etter ionebytter.....	67
3.2.2	Aktivitet i komplementfikseringstesten	69
3.2.3	Monosakkaridsammensetning etter gelfiltrering.....	71
3.2.4	Aktivitet i komplementfikseringstesten	72
3.2.5	Bindingsforhold.....	74
3.3	Struktur og aktivitetsforhold- <i>C.occidentalis</i> 100 °C.....	76
3.3.1	Monosakkaridsammensetning	76
3.3.2	Komplementfikseringstest.....	77
3.3.3	Bindingsforhold.....	79
3.4	Struktur- og aktivitetsforhold - <i>Lippia chevalieri</i>	80
3.4.1	Monosakkaridsammensetning av vannløselige polysakkarider fra <i>L.chevalieri</i> etter ionebytter.....	80
3.4.2	Aktivitet i komplementfikseringstesten	81
3.4.3	Monosakkaridsammensetning etter gelfiltrering.....	83
3.4.4	Aktivitet i komplementfikseringstesten	84

3.4.5	Bindingsforhold.....	85
3.5	Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering	88
3.5.1	Enzymdegradering	88
3.5.2	Monosakkaridsammensetning	89
3.5.3	Aktivitet i komplementfikseringstesten	90
3.5.4	Bindingsforhold.....	91
4	Konklusjon	94
5	Reagensliste.....	96
	Litteraturliste	99

Forkortelser

4-OMe-GlcA: 4-O-metyl-glukuronsyre

α : Alfa-anomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har samme posisjon som OH på C5

AG-I: Arabinogalaktan type I

AG-II: Arabinogalaktan type II

AGIIa: En type arabinogalaktan II

AGIIb-1: En type arabinogalaktan II

ANX: Dietylaminopropyl

Ara: Arabinose

β : Beta-anomere monosakkarider der OH-gruppen ved C1 har motsatt konfigurasjon på C5.

BPII: *Biophytum petersianum*

BSA: Bovint serum albumin

CA, CB, CC: Sure fraksjoner etter eluering av ionebytter fra bladene til *C.occidentalis* 50 °C

CAI: Fraksjoner isolert fra CA etter eluering på gelfiltreringskolonne

CBI: Fraksjoner isolert fra CB etter eluering på gelfiltreringskolonne

CCI, CCII, CCIII: Fraksjoner isolert fra CC etter eluering på gelfiltreringskolonne

C1-C6: Karbonatomene i et monosakkarid

C3: Komplement komponent C3

C3a: Fragment av komplement komponent C3

C3b: Fragment av komplement komponent C3

C5a: Fragment av komplement komponent C5

C100: Sure fraksjonen etter eluering av ionebytter fra bladene til *C.occidentalis* 100 °C

C100I, C100II, C100III: Fraksjoner isolert fra C100 etter eluering på gelfiltreringskolonne

D: D-sukker med hydroksygruppe i kiralt karbon, C5, rettet til høyre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon

DMSO: Diklometan

f: Furanoseform 5 ring

FID: Flammeionisasjonsdetektor

Fraksjon I: Fraksjonen isolert fra LBI etter enzymdegradering

Fuc: Fucose

Gal: Galaktose

GalA: Galakturonsyre

GC: Gasskromatografi

GC-MS: Gasskromatografi -massespektrometri

Glc: Glukose

GlcA: Glukuronsyre

L: L-sukker med hydroksygruppe i kiralt karbon , C5, rettet til venstre når molekylet er tegnet i Fischer-projeksjon

HCL: Saltsyre

HG: Homogalakturonan

ICH 50: Konsentrasjon som gir 50% hemolyse

IR: Infrarød

LA, LB, LC: Sure fraksjoner etter eluering med ionebytter av vannløslige polysakkarider fra *L.chvalieri*

LAI: Fraksjonen isolert fra LA etter eluering på gelfiltreringskolonne

LBI, LBII: Fraksjoner isolert fra LB etter eluering på gelfiltreringskolonne

LCI, LCII, LCIII: Fraksjoner isolert fra LC etter eluering på gelfiltreringskolonne

Man: Mannose

MS: Massespektromerti

Mw: Molekylvekt

N₂: Nitrogen gass

NO: Nitrogenoskid

NO₂: Nitritt

O₂: Oskxygen

OH: Hydroksylgruppe

OMe: Metylgruppe bundet til sukker via oksygen

MeI: metyljodid

NaCl: natriumklorid

MeOH: methanol

P: Plasmodium

PBS: forsfatbuffer

RGI: Rhamnogalakturonan I

RG II: Rhamnogalakturonan II

Rha: Rhamnose

Rpm: Antall rotasjoner per minutt

SRBC: Røde blodceller fra sau

TFA: Trifloureddiksyre

TMS: Trimetylsilyl

V.L.P.S: Vannløslige polysakkarider

Xyl: Xylose

1 Innledning

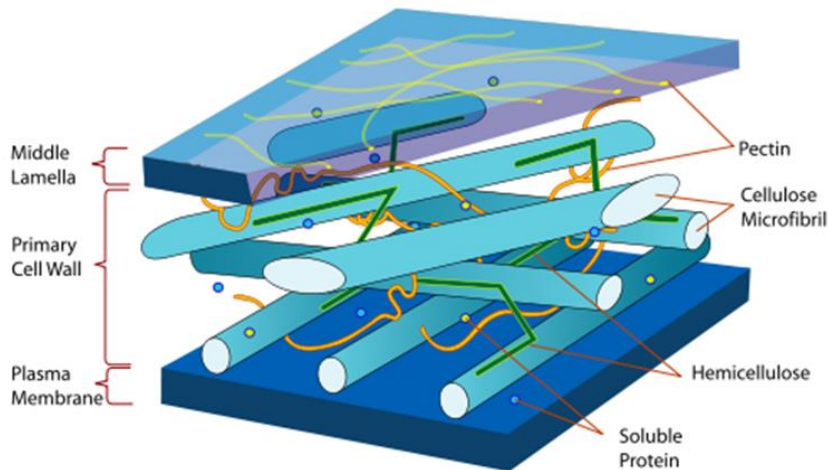
1.1 Polysakkarider

Karbohydrater er samlebetegnelsen på monosakkarider, oligosakkarider, polysakkarider og derivater av disse. Oligosakkarider består av 2-10 monosakkaridenheter, mens polysakkarider består av minst 10 monomerenheter (Paulsen og Barsett, 2005). De kan være sure eller nøytrale, og substituerte med ulike typer organiske eller uorganiske grupper. Videre skiller de seg fra hverandre ved å ha ulike glykosidbindinger i kjeden. Bindingene kan ha α eller β konfigurasjon. Polysakkarider kan være enkle, lineære, eller mer komplekse, forgreinede. Disse kan inndeles i to hovedklasser: Homopolysakkarider består av kun én type monosakkarid mens heteropolysakkarider består av to eller flere ulike monosakkarider. Denne kategorien kan inndeles videre avhengig av monosakkaridmønsteret i polymeren (Cui, 2005). Den mest variable karakteristikken for polysakkarider er molekylvekten (Paulsen og Barsett, 2005).

1.1.1 Strukturelle polysakkarider i planter

Planters cellevegg

Både Plante-celler og dyr-celler er omringet av plasma membran, men kun plante-celler består av cellevegg som deles inn i primær og sekundær cellevegg. Primærveggen er tynn og dynamisk lag som består av et nettverk av cellulosefibriller som endres gjennom hele plantecellens liv. Den består av polysakkarider og strukturelle glykoproteiner, lignin, enzymer og fenoliske estere. Den bindes ved hjelp av ioniske og kovalente bindinger. Den sekundære celleveggen dannes i noen celler først etter at plantecelle utvidelsen er fullført. Den er som regel tykkere enn primærveggen og er ofte lagdelt og består generelt av mer cellulose, mindre pektin og lignin. Midtlamellen inneholder mye pektiner og er plassert i det ytterste laget som holder cellen sammen (Talmadge og Keegstra et al, 1973), (Taiz og Zeiger, 2002).



Figur 1-1 Plantecelleveggstruktur (Wikipedia 2014).

1.2 Polysakkarider i plantecelleveggen

Cellulose

Cellulose er en naturlig lineær makromolekulær kjede bundet sammen med β -1,4-D glukopyranose som består av 2000 eller flere glukoseenheter. Cellulose er den viktigste bestanddelen hos alle planter. Mellom 40 og 70 av disse kjedene blir holdt sammen av hydrogenbindinger og van der Waals krefter i krystallinske mønstre, slik at de danner mikrofibrille. Den er også mest vanlige av alle naturlig forekommende organiske forbindelser. Den kan derivatiseres og brukes som for eksempel lim og fortykningsmidler i matvarer. Cellulose er et veldig kjemisk stabilt stoff og er uløselig i vann (Taiz og Zeiger, 2002).

Hemicelluloser

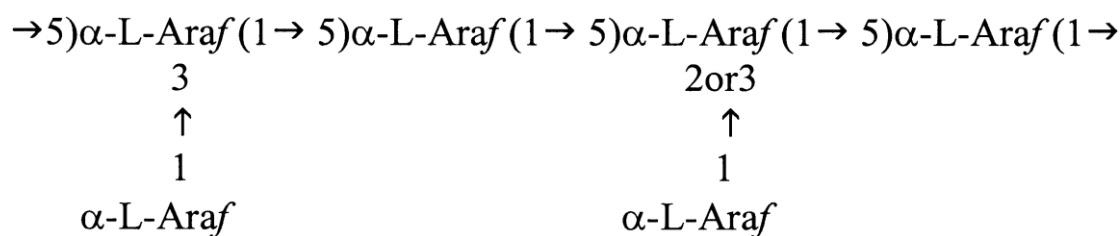
Hemicelluloser er en heterogen gruppe polysakkarider. De forekommer i plantens cellevegger sammen med cellulose. Polymeren deles inn i forskjellige typer som for eksempel xylaner, xyloglukaner, glukomannaner, og β -1,3, β -1,4 glukaner. Disse finnes i celleveggene til planter som vokser på land, bortsett fra β -1,3, β -1,4 glukaner. Sammensetningen av typene kan variere, avhengig av hvilke arter og celletyper man har. Den viktigste rollen til hemicellulose er å styrke celleveggen ved å interagere med cellulose (Scheller og Ulskov, 2010).

Xyloglukaner

Xyloglukan er et polysakkarid som finnes i den primære celleveggen til planter. Den består av 300 til 3 000 (1,4)-bundne β -D-Glykopyranose enheter med sidekjeder av Xyl, Gal, Ara-enheter bundet i henholdsvis til C-3. Det er ca. 30-50 % av Xyloseenheter som er bundet til C-2. Ryggraden av xyloglukan er kjemisk identisk med cellulose (Fry, 1988).

Arabinaner

Arabinaner består av lineære eller forgrenede L-arabinofuranosider, som hovedsakelig er bundet via posisjon C-3 eller C-5. Arabinanstammen er bundet sammen av 1,5 bindinger, mens forgreininger er bundet hovedsakelig til C-3 og mindre vanlig til C-2 som vist i figuren 3-2. Sannsynligvis foreligger ikke arabinaner fritt i naturen, men er bundet sammen med galaktaner i pektinkomplekser. De kan frigjøres ved hjelp av ekstraksjoner som innebærer enzymatiske reaksjoner eller svak syrehydrolyse. I cellevegger hvor man finner arabinaner finnes det også ekso- og endoglykanaser (Paulsen og Barsett, 2005, Schols og Voragen, 2002).



Figur 1-2. Foreslått struktur til en del av et arabinan (Paulsen og Barsett 2005).

Arabinogalaktaner Type I og II

Arabinogalaktaner deles normalt inn i tre grupper: arabino-4-galaktaner (AG-I); arabino-3,6-galaktaner (AG-II); og polysakkarider med sidekjeder av arabinogalaktaner (type III). Sistnevnte kalles ofte ekte pektin (Paulsen og Barsett, 2005). AG-I finnes i variable mengder i celleveggen og er bygget opp av en hovedkjede bestående av β -1,4-bundet galaktan, med sidekjeder av arabinan som er substituert i C-3-posisjon med arabinofuranose og galaktopyranose. AG-II er mer vanlig enn AG I og er et høyt forgrenet polysakkarid.

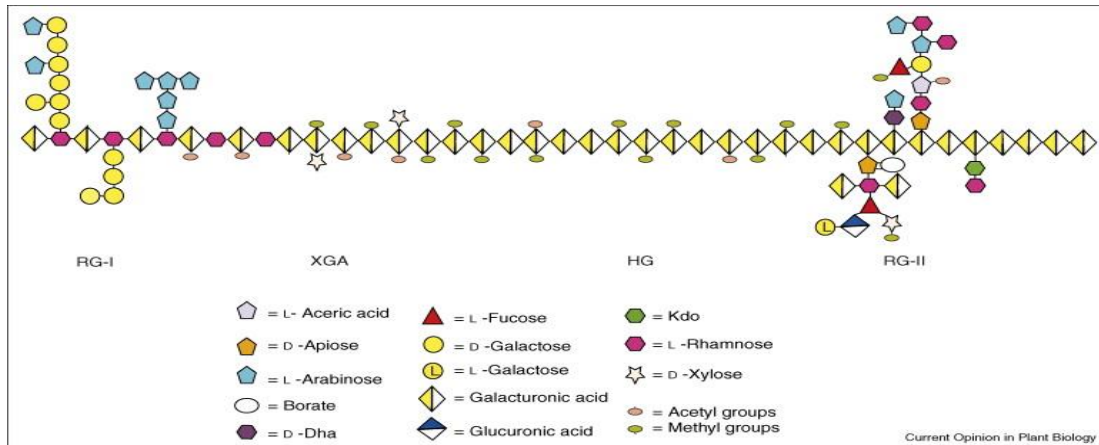
(Yamada og Kiyohara, 1999). Både AG-I og AG-II er funnet som strukturenheter i RG-I, og er bundet til rhamnose i pektinkjeden gjennom posisjon C-4. Man kan enkelt skille disse ved at AG-II feller ut og danner rødt bunnfall ved reaksjon med såkalt Yariv-reagens, mens AG-I holder seg i løsning (Paulsen og Barsett, 2005).

Pektiner

Pektiner er flere polysakkarider som er bundet sammen av α -(1,4) D-galakturonsyrer i form av lineær kjede, koblet med hverandre ved hjelp av glykosidbindinger. Pektin deles inn i to hovedgrupper: glatteområde ”smooth region” som består hovedsakelig av homogalakturonan og forgreinte områder ”hairy regions” som igjen deles i to hoved deler Rhamnogalakturonan I (RG-I) og Rhamnogalakturonan II (RG-II). Sidekjeder kan inneholde arabinaner, galaktaner og arabinogalaktaner som er bundet til 1,4 rhamnogalakturonan. Pektinet kan også inneholde, xylogalakturonan og apiogalakturonan (Schols og Voragen, 2002).

Pektiner har en viktig rolle i plantevekst, utvikling og morfologi. Den fungerer også som alarmsystem ved ytre angrep av patogener. Pektiner er også brukt som en geling og stabiliserende middel i mat og kosmetiske bransjer og har også flere bruksområder i menneskers helse som blant annet å senke kolesterol, redusere glukosenivåer i blodet ved diabetes og begrense størrelsen til kreftsvulst (Mohnen, 2008).

For å kunne endre reologien og fysikalske egenskaper til pektiner som brukes kommersielt, blir de ofte derivatisert til amiderte pektiner der OCH_3 i posisjon 6 substitueres med NH_2 (Schols og Voragen, 2002).



Figur 1-3. Foreslått skjematiske struktur av pektin (Mohnen, 2002).

Pektiner deles i to hovedgrupper:

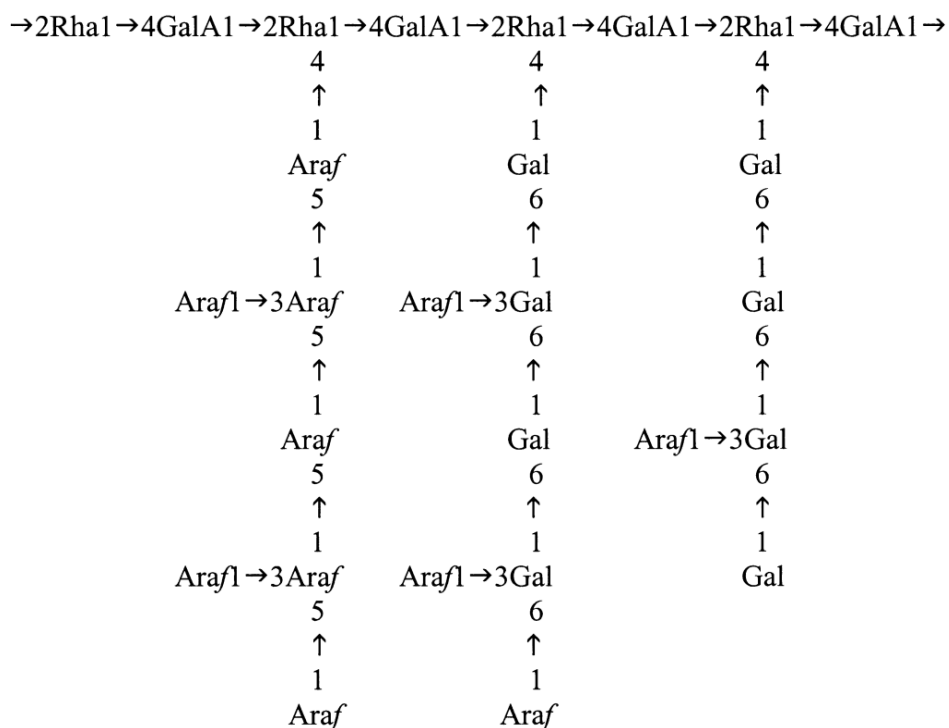
1. Glatte områder "smooth region" som består hovedsakelig av homogalakturonan som utgjør det lineære områder i hovedkjeden. Den består av α -(1,4)-D-galakturonsyre-enheter som kan være metylert ved C6 og/eller O-acetylert. Substitusjon med acetylgrupper kan forekomme mest på O-2 og O-3. Homogalakturonaner med lav metylesterifiserings grad kalles for lav metylert (LM) pektin, mens de med høy grad av metylesterifisering kalles for høy metylert (HM) pektin (Schols og Voragan, 2002).

2. "Hairy" eller "ramified regions" som igjen deles i to hovedgrupper:

Rhamnogalakturonan (RG-I), som består av alternerende α -(1,4)-GalA og α -(1,2)-Rha.

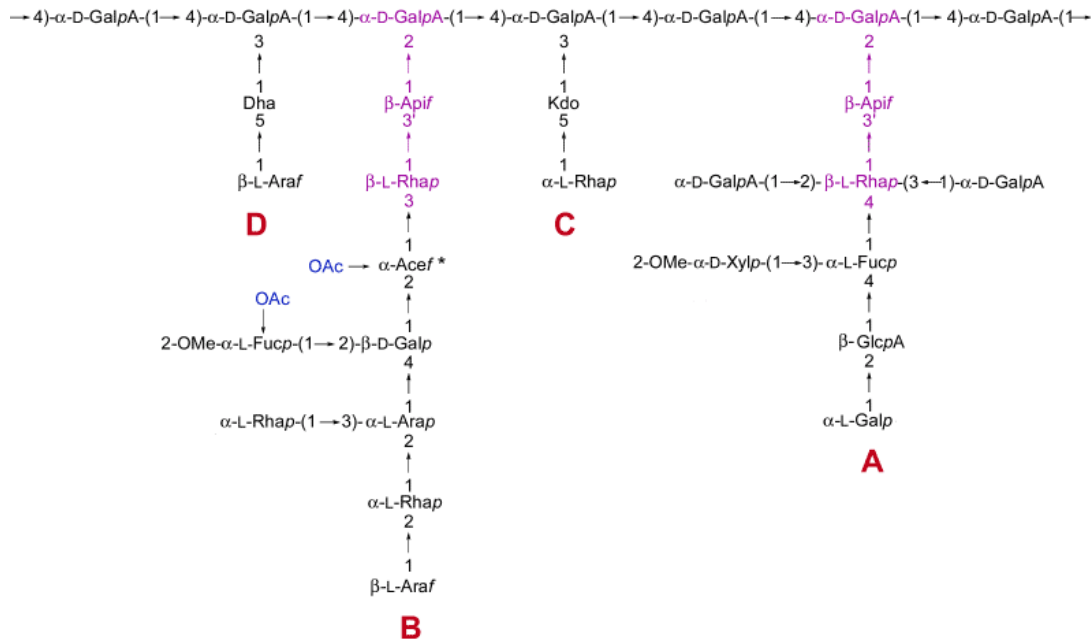
20-80 % av disse Rha-enhetene pleier å være forgrenet med sidekjeder, hovedsakelig ved O-3 og/eller O-4. Lengden på sidekjedene kan variere fra et enkelt monosakkarid til kjeder med 50 eller flere sukkerenheter blant annet galaktose og arabinose (Schols og Voragen, 2002).

Arabinogalaktanene som er funnet å være mest bundet til rhamnose er AG-II, og i noen tilfeller er AG-I også tilstede. Disse sukkerenhetene er bundet ved 1,3 og 1,6 forgreininger som vist i figur 1-4 (Paulsen og Barsett, 2005).



Figur 1-4. Eksempel på en struktur med "hairy regions". Stammen består av RG-I som er substituert i posisjon C-4 på rhamnose-enheten med arabinan og AG-II sidekjeder (Paulsen og Barsett, 2005).

Rhamnogalakturonan II (RG-II) er en relativt liten komponent i pektinpolysakkarider. Hovedkjeden består av 9-10 GalA-enheter som er α -(1,4)-bundet. Hovedforgreininger skjer i C-2 og C-3. Disse sidekjedene inneholder noen sjeldne sukkerarter, blant annet 2-O-metylfukose, 2-O-metylxylose, apiose, asersyre, 2-keto-3-D-manno-oktulosonsyre (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosarsyre (DHA), men de inneholder også vanlig monosakkarider som rhamnose, galaktose, mannose, arabinose, xylose, glukose, fucose og glukuronsyre som vist i figur 1-5 (Paulsen og Barsett, 2005).



Figur 1-5. Foreslått struktur til AG-II (The University of Georgia, 2007).

1.3 Biologisk aktive polysakkarider

Flere studier har blitt utført på ulike polysakkarider fra tradisjonelle planter. Interessen i biologisk aktivitet til pektiner har økt i de siste 20 årene. Flere polysakkarider som er isolert fra planter, brukt i tradisjonell medisin, har vist immunmodulerende aktivitet på komplementsystemet, makrofager, T-lymfocytter og NK-celler. Eksempler på disse er, arabinogalaktaner, arabinaner og rhamnogalakturonaner som alle er en bestanddel i pektiner (Paulsen og Barsett, 2005), (Yamada og Kiyohara, 2007).

Pektiner med antikomplement effekt har blitt isolert fra flere planter blant annet *Glinus oppositifolius*. Pektiner er generelt kjent for å inneholde α 1,4 galaktotnsyre kjede og sidekjeder som inneholder nøytrale sukkerenheter som arabinogalaktaner type II, arabiner og arabino-oligosakkarider. AG-II sidekjeder som er bundet til pektinkjeden er viktige for komplementaktivitet (Paulsen og Barsett, 2005) Anti-komplement effekt har økt når pektiner inneholder blant annet AR 2-IIa, 2-IIc, 2-IId og 2-IIb-1 i hairy regions isolert fra *Angelica acutiloba* (Wagner, 1999). En del studier viser at bindingstype til sukkerenhetene påvirker aktivitet, for eksempel tilstedeværelse av 1,6 Gal bundet til 1,3 Gal i RG-I er nødvendig for aktiviteten. I noen planter vil også AG-I med 1,3, 1,6 og 1,3,6 galaktose kunne øke den antikomplementære aktiviteten. Man kan endre aktiviteten til pektiner ved enzymdegradering (Paulsen og Barsett, 2005).

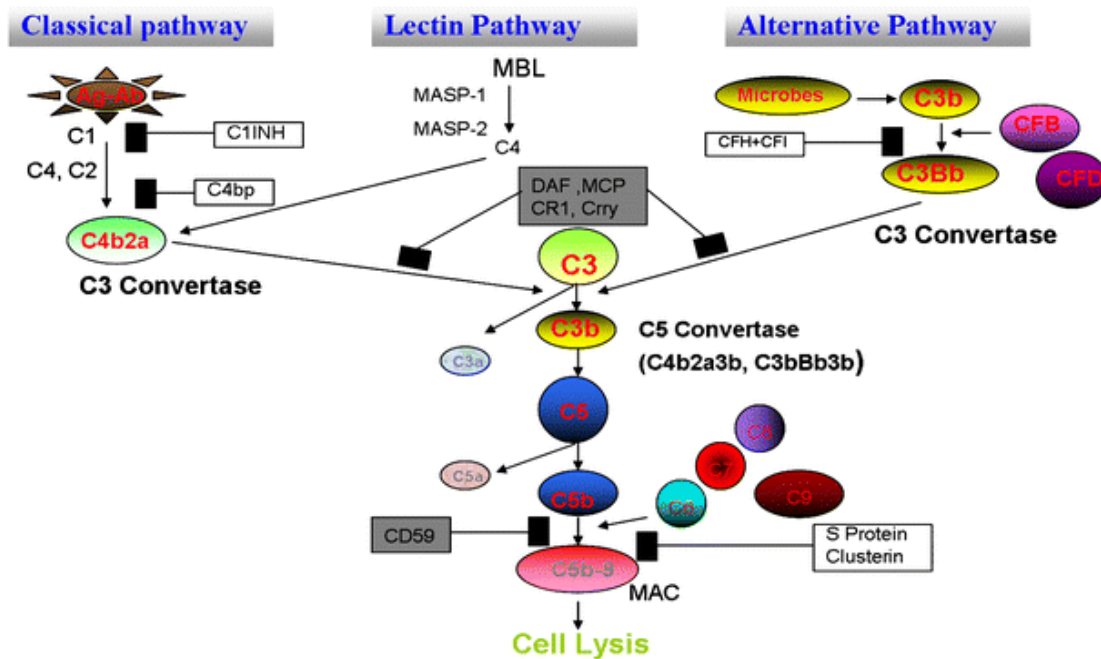
I noen studier ble det diskutert om molekylvekt kan påvirke biologisk aktivitet, men fortsatt er det litt uklart. Det som er påvist at tilstedeværelse av RGI, RGII samt GalA vil kunne øke den biologisk aktivitet til pektiner (Austarheim et al, 2012).

Det er viktig å merke seg at ikke alle pektiner som finnes i planter har en biologisk aktivitet, det er derfor rimelig å anta at spesielle strukturelle aspekter må være tilstede i de bioaktive strukturene (Paulsen og Barslett, 2005).

1.4 Immunmodulerende aktivitet

1.4.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet er et system som består av over 30 blodproteiner. Når dette systemet aktiveres, settes det i gang en kaskade av enzymatiske reaksjoner. Komplementsystemet er en del av det medfødte immunsystemet, og spiller en svært viktig rolle i forsvaret mot infeksjoner. Komplement systemet består av flere koenzymer som sirkulerer i blodplasma i inaktivt form. Dette systemet kan bli aktivert via tre kaskader; klassiske, alternative og lektin veien. Den klassiske aktiveringsveien igangsettes ved at IgM- eller IgG-antistoffer først binder seg til antigener, så aktiverer de det første komplementprotein C1 som vist i figur 1.6. Den alternative og lektin aktiveringsveien kan bli aktivert av hydrolyse av C3 eller ett antigen uten tilstedeværelse av antistoffer (IG- globulin). Dette er en spesifikk immunrespons (Yamada og Kiyohara, 1999), (Hansen et al, 1999).



Figur 1-6. Oversikt over de tre aktiveringsveiene for komplement (Bora et al, 2008).

Komplementaktivering genereres ved dannelse av lavmolekylære forbindelser som diffunderer ut i vevet og i vevsvæsken. Disse forbindelsene fungerer om anafylatoxiner og fører til at den glatte muskulaturen trekker seg sammen, samt en økt gjennomtrengning (permeabilitet) i blodkapillærene, samtidig vil mastceller og basofile granulocytter aktiveres slik at de frigjør en rekke farmakologiske aktive forbindelser som histamin. C3a og C5a har kjemotaksisk aktivitet og vil dermed lede granulocytene til betennelsesstedet. Noen av komplementproduktene som dannes fester seg til mikroorganismens cellemembraner eller celleveggen slik at de markeres og blir synlige for makrofager og granulocytter og cellevegger. Merkingen gjenkjennes av reseptorer på makrofager og vil lettere kunne binde seg til patogenene, fagocytosen blir da mer effektiv. Deretter vil det lages hull i cellemembranen og celleveggen. Dersom det blir mange hull i membranen kan cellen til slutt sprekke og lysere. Komplementfaktor C3b som er bundet på overflaten av mikroorganismer kan binde seg til komplementreseptor-2 på overflaten av B-lymfocytter. Når B-cellen bindes til antigen, vil binding av C3b fungere som et ko-stimulerende signal som stimulerer til økt antistoffproduksjon. Selv om disse tre aktiveringsveiene er utløst av ulike faktorer, er resultatet likevel det samme, nemlig det terminale komplementkomplekset der den komplementaktivering vil generere biologisk, som nevnt tidligere, aktive komplementfragmenter som C3a og C5a. Disse fører til en rekke biologiske aktiviteter som

økt vaskulær permeabilitet, kjemotaksisk tiltrekning av leukocytter, immunadherens og modulering av antistoffproduksjon. Komplementaktivering fører på denne måten også til inflammatoriske responser (Bora et al, 2008, Wang og Liangzhi et al, 2007, Wanger, 1999).

1.5 Malaria og den globale utviklingen av sykdommen

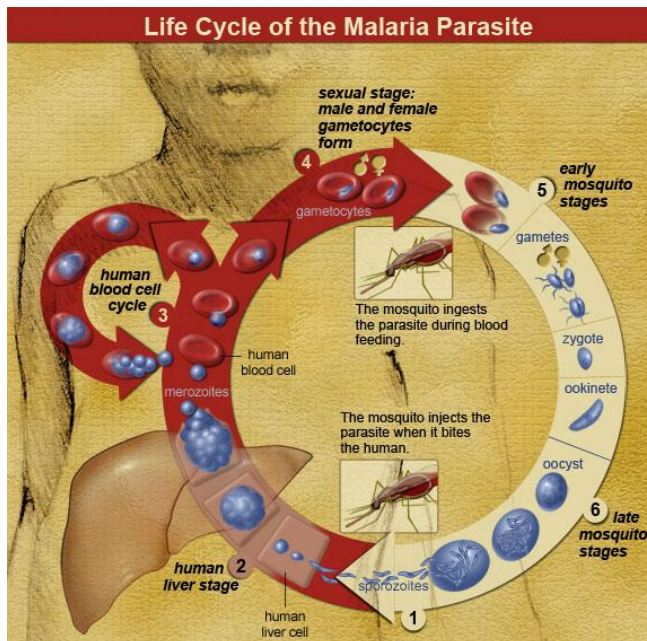
Malaria er en smittsom sykdom som truer livet til 3,3 milliarder mennesker over hele verden (Malaria Consortium, 2012). Ca. 80 % av malariatilfellene i verden forekommer i tropisk Afrika. Malaria er en av verdens mest utbredte infeksjoner. Verdens helseorganisasjon har anslått at det globalt i 2012 var ca. 207 millioner tilfeller av malaria som forårsaket ca. 627 000 dødsfall. Omtrent 90 % av dødsfallene var i Afrika og 77 % av dødsfallene var blant barn under fem år. Høy dødelighet blant mødre, lav fødselsvekt og anemi hos mødre er også konsekvenser av denne sykdommen (Folkehelseinstitutt, 2014).

Fem arter av slekten *Plasmodium* fører til malariainfeksjoner hos mennesker. De fleste tilfellene er forårsaket av *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* eller *P. malariae*. *P. falciparum* er den dominerende arten i Afrika, og er ansvarlig for nesten en million dødsfall hvert år, hovedsakelig barn under 3 år (Ohr et al, 2002). De siste årene er også *P. knowlesi* blitt anerkjent som en malaria-art og har i Sørøst-Asia rammet flere mennesker (Folkehelseinstitutt, 2014).

1.5.1 Malariaparasittens livssyklus

Man får smitten gjennom myggstikk av smittebærende mygg. Hun-myggen injiserer sporozoitter fra spytt over i blodet. Disse fraktes til leveren og blir raskt tatt opp der, deretter passerer de gjennom Kupffer celler, der vil de utvikle seg ved å multiplisere kraftig de neste 5-16 dagene. Sporozoittene vil vokse og produsere titusenvis av haploider, kalt merozoitter. Noen malaria parasittarter forblir sovende i lengre perioder i leveren og forårsaker tilbakefall uker eller måneder senere. Merozoitter frigjøres fra infiserte leverceller og invasjonen av røde blodceller vil finne sted. Aseksuell replikasjon, og utgivelsen av nydannede merozoitter fra de røde blodcellene vil skje i løpet av 1-3 dager. Denne multiplikasjon fører til tusenvis av parasitt-infiserte rødeblodceller i blodet. I fravær av immunitet eller behandling kan død inntreffe innen timer etter symptomutvikling. Dersom ikke død og infeksjonen fortsetter kan livssyklusen til parasittene fortsette i kroppen. Malaria tar liv ved å infisere og ødelegge

blodceller (anemi), og ved å tette igjen kapillærene som fører blod til hjernen, dette kalles cerebral malaria (NIAID, 2012).



Figur 1-7. Livssyklus av malaria parasitten (NIAID, 2012).

1.5.2 Dagens behandling og resistensutvikling

Flere legemidler brukes mot malariasykdommen. De viktigste medikamentene er atovaquon som hemmer elektrontransportkjeden i parasittens-mitokondrier, proguanil virker ved å oppheve membranpotensialet i parasittens mitokondrier, pyrimetamin og sulfadoxin reduserer dannelsen av folatmetabolitter som brukes i DNA-syntese, artemisininer, endoperoxider, som antas å hemme malariaparasittens ATPase6 og klorokin og meflokin som vil hemme parasittens evne til å detoksifisere hemoglobin (Petersen et al, 2014, White og Med, 1996).

Klorokin behandling er nå ineffektiv i de fleste områdene av verden. Den vanligste erstatning for klorokin er pyrimetamin-sulfadoksine. Ulempen med erstatningen er at den mister sin effekt raskt i behandlingsprosess. Samme gjelder behandlingen med Kinin, spesielt i 7-10 dagers behandlingsregimer som vanligvis brukes for gravide kvinner og barn i Sørøst-Asia. Meflokin er effektiv i de fleste områder av verden, men er assosiert med dødfødsel i svangerskapet og bekymringer om nevropsykiatriske reaksjoner kan begrense bruken av Kinin. Artemisininer krever 5-7 dagers behandlingsregimer for å oppnå akseptable kur resultater, det er derfor som regel kombinert med meflokin. Toksisitet hos dyr er observert i noen studier. Kombinasjonsbehandling av to antimalaria midler har vist å forsinke utviklingen

av medikamentresistens. Det er viktig med riktig valg av legemidlet slik at resistensproblematikken reduseres (Ohrt et al, 2012, Wells, 2011).

Dagens medisiner mot malaria er relativt trygge. De er ofte uten alvorlige bivirkninger sett i fase III- studier med flere tusen pasienter, samtidig er de relativt billige. Men på lang sikt vil det alltid være behov for nye behandlingsformer uansett hvor nøye de aktuelle legemidlene brukes. Det er alltid nye trusler om motstand. Den første tegn på motstand mot artemisinin har allerede dukket opp i enkelte deler av Kambodsja (Wells, 2011). Problemet oppleves mest av *P. falciparum* som ser ut å være et økende folkehelseproblem i tropiske land (Ohrt et al, 2012). Dette er et tydelig varsel på at nye klasser av antimalariamidler er nødvendig. Det tar minst 10 år for å oppdage et molekyl mot malaria til gjennomføring av kliniske studier. Naturlige planter som anvendes i tradisjonell medisin kan være den hemmelige nøkkelen til å åpne nye porter for forskning på mulige potente midler mot malaria. Farmakologiske studier har også vist at mange tradisjonelle planter som anvendes ved behandling mot malaria er effektive og at noen av dem er enda mer effektive enn de nåværende midlene (Wells, 2011).

1.6 Botanikk og habitat

1.6.1 *Cassia occidentalis* L.

Cassia occidentalis L. tilhører familien Caesalpinaceae. *C.occidentalis* er en relativt liten busk vanligvis 0,5-2 m høy. Bladene er ca. 30-100 mm lange og er 20-40 mm brede. Blomstene har gul farge med fem kronblader og blir båret i små klyster. Frukten til planten er flat og svakt buet (BioNET, 2011).

Den vokser mest i Sør Amerika, Bengal, Sør- India, Burma og Sri Lanka. *C.occidentalis* har blitt brukt som tradisjonell medisin i flere år i de siste nevnte land. Den anvendes som avføringsmiddel, slimløsende, vanddrivende, antiinflammatorisk og antibakteriell middel.

Den er kjent også som kur til såre øyne, revmatisme, tyfus, astma og forstyrrelser av hemoglobin i blodet (Verma et al, 2010). Den er også anvendt som antimalarisk og antipyretisk i tropiske land (Taylor, 2005). *C.occidentalis* inneholder hovedsakelig flavonoider, glykosider, antraquinoner, apigenin, steroler, tanniner og xantoner.

Toksisitetsstudier på blader og røtter av *C.occidentalis* er rapportert i en studie der ulike blad og rot ekstrakter ble gitt til mus (administrert oralt, og injisert på opptil 500 mg/kg). Dette førte til død (Sadiq et al, 2012, Aragao et al, 2009).

1.6.2 *Lippia chevalieri* Mould

L.chevalieri Mould som tilhører Verbenaceae familie er et aromatisk urt som kan bli opptil 2,5 m høy. Bladene er kranstilte og er i en elliptisk form med taggete kanter. Planten har hvite blomster som har en umbel eller sylindrelignende form (Willcox et al, 2004).

L.chevalieri er en tradisjonelt brukt plante i folkemedisin i Afrika. Den brukes hovedsakelig som antimalarisk middel. Den brukes også som behandling mot luftveisinfeksjoner som bronkitt, astma, hoste og influensa. Bladene er brukt mot diaré og høyt blodtrykk. *L.chevalieri* brukes også mot reumatisme, leverinfeksjoner, menstruasjonssmerter, feber og psykiske forstyrrelser. *Lippia chevalieri* inneholder hovedsakelig saponiner, tanniner, flavonoider og polyuronider (Bangou, 2012).

1.6.3 Taksonomisk klassifisering

Cassia occidentalis L.

Rike: *Plantae*

Superdivisjon: *Spermatophyta*

Subrike: *Tracheobionta*

Divisjon: *Magnoliophyta*

Klasse: *Magnoliopsida*

Subklasse: *Rosidae*

Orden: *Fabales*

Familie: *Caesalpinaceae*

Slekt: *Senna* Mill.

Art: *Senna occidentalis* Link

Tabell 1-1. Taksonomisk klassifisering for *Senna occidentalis* (USDA, 2013).

***Lippia chevalieri* Mould**

Rike: *Plantae* – planteriket

Divisjon: *Magnoliophyta*

Klasse: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familie: *Verbenaceae*

Art: *Lippia chevalieri* Mould

Tabell 1-2. Taksonomisk klassifisering for *Lippia chevalieri* Mould (The Global Biodiversity Information Facility, 2013).

Målet med oppgaven

Målet med oppgaven er å isolere ulike polysakkarider fra *C.occidentalis* og *L.chevalieri* for å studere struktur-og aktivitetsforhold for polysakkaridene isolert fra disse to plantene.

2 Metoder

2.1 Generelle metoder

2.1.1 Vannkvalitet

Destillert vann ble brukt til alle forsøkene.

2.1.2 Filtrering

For å fjerne forurensninger eller uønskede partikler fra en prøve brukes filtreringsmetoden der valget av filterstørrelsen er avhengig av metodens krav.

Acro® 50A, 5 µm, Pall Corporation

Water-filter, 0,22 µm, Durapore® membrane filter, Millipore

Acrodisc syringe filter, 5 µm/0,2 µm Versapor® membrane

2.1.3 Innveiting

Det ble brukt finvekt til alle innveitinger under 1 gram.

Finvekt: Sartorius Extend ED224S

Grov-vekt: Ohaus Portable Advanced

Vekt 1-10 g: Sartorius Analytic A200S

2.1.4 De-gassing av løsninger

Oppløst luft i løsninger ble fjernet gjennom bobling med helium-gass i 15 minutter.

2.1.5 Blanding av løsninger

Instrument som ble anvendt til å blande løsninger:

Whirlimixer, Fison

Whirlimixer, Heidolph REAX TOP

Minishaker, MS2 Minishaker, KIKA

2.1.6 Måling av pH

Instrument som ble anvendt til pH-måling er pH-papir

Fisherbrand pH-Fix 0-14, Fisherbrand pH-Fix 0-7

2.1.7 Volumreduksjon

Prinsipp

Løsninger med stort volum ble redusert og oppkonsentrert ved å dampe inn på en rotavapor under trykk og varme.

Utstyr

IKA® RV 10 Basic V Rotavapor med vakuumpumpe og kjøling

Pærekolbe og rundkolbe

Prosedyre

Løsninger ble dampet inn på rotavapor ved ca. 40 °C under vacuum

2.1.8 Frysetørking

(Oetjen, 1999)

Prinsipp

Ved frysetørking vil man fjerne vann fra nedfrost prøvemateriale ved sublimasjon. Prosessen krever lave temperaturer og lavt trykk. Frysetørkede produkter er fordelaktig fordi de bevarer sin opprinnelige form og struktur fra den frosne løsningen og lettere reløses i vann.

Utstyr

Metanolbad: HETOFRIG (Heto Birkerød, Danmark)

Frysetørker: Christ® Alpha I-4

Rundkolber

Prosedyre

1. Prøveløsningen ble dampet inn til ønsket volum ved hjelp av rotavapor ca. 10 ml.
2. Prøveløsningene ble frosset ned på metanolbad ved $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. Rundkolben med prøveløsningen ble festet utenpå frysetørkeren med glassull i åpningen.
4. Prøven ble tatt av frysetørkeren når kolbene nådde romtemperatur. Normal tørketid var 24-48 timer.
5. Tørkede stoffet ble veid ut og brukt videre.

2.1.9 Vask av dialyseslanger

Prinsipp

Slangene ble vasket før bruk for å fjerne eventuelle rester av cellulose.

Reagenser

0,5 M NaOH-løsning (Bruk hansker og briller)

0,05 % natriumazidløsning (NaN_3)

Destillert vann

Utstyr

Dialyseslanger: Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm

Begerglass (5 L)

Stålkjele

Kokeplate (Wilfa)

Glass-stav

Prosedyre

1. Dialyseslangene ble klippet til en ønsket lengde på ca. 40-60 cm avhengig av prøvevolum og deretter skylt godt i springvann.
2. 0,5 M NaOH-løsning ble kokt opp i en kjele under lokk.
3. Slangene ble lagt i kokende 0,5 M NaOH-løsning i 10 minutter under lokk.

4. En glass-stav ble anvendt for å presse ned slangene, slik at de ikke fikk flyte over løsningen.
5. Slangene ble så skylt godt ut- og innvendig, både med springvann og destillert vann.
6. Videre ble slangene kokt i destillert vann i 10 minutter. Og deretter ble de rensset grundig med destillert vann.
7. Slangene ble oppbevart i 0,05 % NaN_3 -løsning ved 4 °C i kjøleskap, for å forhindre bakterievekst.

2.1.10 Syrevask av glassutstyr

Prinsipp

Glassutstyr som har blitt oppbevart i papp og papiremballasje kan inneholde spor av cellulose og glukose. Ved å rense glass-utstyre før bruk med konsentrert saltsyre, reduseres faren for kontaminering fra karbohydrater som kan ha en påvirkning på resultater fra andre karbohydratbaserte analysemetoder.

Reagenser

Konsentrert saltsyre 37 % (HCl) Springvann

Destillert vann Utstyr

pH-papir: Strips, pH 0-14,

MERCK Varmeskap: Heraeus Instruments

Function line SMI-rør

Supelcorør

Glasspipette

Diverse glass-utstyr

Utstyr

Hansker og vernebriller

Begerglass (5 L)

Aluminiumsfolie

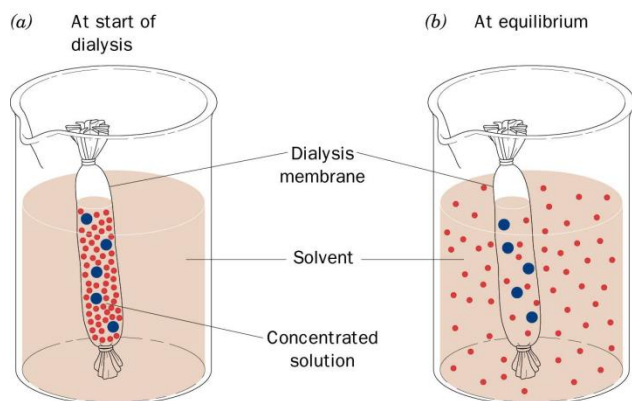
Prosedyre

1. Glass-utstyret ble overført til et stort begerglass, og dekket med konsentrert saltsyre.
2. Glass-utstyret ble satt til henstand i 30 minutter under avtrekk.
3. Saltsyren ble tilbakeført til original beholderen for fremtidig syrevask.
4. Glass-utstyret ble vasket grundig med springvann til pH-en var på omtrent 7.
5. Deretter ble utstyret vasket med destillert vann, og tørket i varmeskap ved 85 °C.
6. Utstyret ble pakket i aluminiumsfolie.

2.1.11 Dialyse

Prinsipp

Ved dialyse kan salter og andre lavmolekylære forbindelser fjernes. Dialyseslanger består av små porer som tillater molekyler med molekylstørrelse under slangenes cut-off verdi å diffundere over membranen på grunn av osmotiske krefter. For å opprettholde den osmotiske gradienten er det viktig å skifte vann ofte.



Figur 2-1. Dialysering av prøveløsning fra høy konsentrasjonsgradient (venstre) til likevekt oppnås (høyre). Kraftene bak denne prosessen er osmotiske krefter (Wikispaces, 2013).

Utstyr

Plastbøtte

Dialyseslanger: Spectra/Por® Dialysis Membrane, MWCO 3,500, d: 29 mm

Glasstaver

Klemmer

Magnet og magnetrører

Reagenser

Destillert vann

Toluen

AgNO₃-løsning

Prosedyre

1. Slangene ble skylt godt med destillert vann før bruk.
2. Dialyseslangen ble klemt med en dialyseklemme i den ene enden.
3. Litt destillert vann ble fylt i slangen for å sjekke at den er tett.
4. Deretter ble slangen fylt med prøveløsning, ca. 2/3 full.
5. 3-4 dråper toluen ble tilsatt for å hindre bakterievekst.
6. Luft ble fjernet fra slangen, den andre enden ble klemt godt og testet for å hindre lekkasje.
7. Slangen ble overført til en ren bøtte fylt med destillert vann.
8. Bøtten ble satt på røring med magnet samt glasstaver for å beskytte slangen mot å komme i kontakt med magneten.
9. Dialysevannet ble skiftet ca. hver 4. time.
10. Dialyse ble avsluttet når ca. 2 ml ikke lenger ble blakket av 1 dråpe AgNO₃-løsning.

2.1.12 Jod-jod-kalium testen

Prinsipp

Jod-jod-kalium er en oppløsning som brukes til å påvise stivelse. Oppløsningen danner sammen med amylase i stivelse en mørkeblå farge. Hvis prøven ikke inneholder stivelse vil løsningen være gul.

Reagenser

Jod-jod-kalium (3,3 % jod og 6,7 % Kaliumjodid løst i deionisert vann)

Utstyr

Porselensplate med flere små brønner

Rørespatel

Prosedyre

1. En liten mengde jod-jod-kalium ble dryppet i hver brønn og blandet med en liten mengde prøve.
2. Eventuell fargeendring ble notert.

2.2 Ionebytterkromotografi

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010)

Prinsipp

Ionebytte ekstraksjon er en kromatografisk metode som benyttes for å isolere ioniske stoffer fra vandige prøveløsninger. Ladede partikler i analytten vil kunne bindes til stasjonærfasen i kolonne, men nøytrale partikler vil elueres ut. Pka verdien til stoffet og ionebytteren vil kunne styre ladning på analytten og bindingsevne til kolonne. Forutsetningen at man får retensjon ved påsetting av prøve løsning og vasking av kolonne er at både stoffet og ionebytteren er ladet. Separasjon av ioner og ioniserbare forbindelser skjer i ulik grad grunnet affiniteten til stasjonærfasens ioniske funksjon.

Utstyr:

Pumpe: SPETEC Perimax

Kolonne: GE Healthcare Bio-Sciences AB, XK 50, høyde 24 cm, radius 2,5 cm

Kolonnematriks: ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

Fraksjonssamler: SuperFrac Fraction Collector, GE Healthcare

Oppsamlingsrør: Sentrifugerør RB 15 ml

BD Plastipak™ Sprøyte 10 ml

PALL®, Acrodisc® Syringe Filter med 5 µm Supor® Membrane

Sentrifuge: Heraeus multifuge 4KR

Begerglass

Aluminiumsfolie

Slanger til pumpen og kolonnen

Glass-stav

Erlenmeyerkolbe

Magnetrører

Magnet

Hansker

Briller

Prosedyre

1. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum degasset, destillert vann og luft ble fjernet fra kolonnen.
2. Ekstraktene ble løst opp i destillert vann, sentrifugert i 10 minutter og sterilfiltrert gjennom et filter på 5 µm ved hjelp av en sprøyte før applisering i kolonnen.
3. Ca. 20-100 ml prøve ble eluert med hastighet på 2 ml/min.
4. Nøytrale polysakkarider ble eluert ut med 2 kolonnevolum med degasset destillert vann. Eluering med vann ble avsluttet når fenol- svovelsyretesten viste at det ikke kom mer karbohydrater ut av kolonne.
5. Negativt ladde polysakkaridene ble deretter eluert ut med en saltgradient 0-1,5 mol NaCl 180 fraksjoner ble samlet opp i 10 ml rør.
6. Karbohydratinnhold ble bestemt av fenol-svovelsyretesten

7. 100 µl av hvert rør ble fylt i brønnene på microplater og absorbansen ble lest av i marc mikroplate reader. Resultatene ble plottet inn i Excel programmet og fraksjonene ble slått inn sammen etter polysakkaridinnhold.
8. Kolonne ble vasket med degasset destillert vann.

2.2.1 ANX Sepharose 4 Fast Flow (High Sub)

(GE Healthcare, 2011)

ANX Sepharose er en svak anionbytter basert på kryssbundet agarose, noe som gir høy kjemisk og fysisk stabilitet. Den anionbyttende egenskapen skyldes dietylaminopropylgruppen som er bundet til matriksen via en eterbinding. Gruppen har Cl-ionet som motion. Ved å eluere med vann vil salter og nøytrale sukkere forlate kolonnen uten retardasjon. Eluerer man så med økende ionestyrke av NaCl vil de negative polysakkaridene byttes ut mot Cl-ionene, og det er dermed mulig å separere polysakkaridene etter deres affinitet på kolonnen

Beregning av saltgradienten for å lage gradienteluering

Mengde av destillert vann i blandekaret ved tiden 0, ble beregnet med følgende formel:

$$C/T = (C_0 \times R)/V_0$$

C = konsentrasjon til NaCl ved tiden t

t = tiden til eluering av saltgradient

C₀ = Startkonsentrasjon til NaCl

R = flowhastighet fra saltløsning til blandekammeret

V₀ = volum av destillert vann ved tiden 0

Vasking av ANX kolonnen

1. Hvis kolonnen hadde en sterk farge på toppen, ble denne delen fjernet med en pasteur-pipette.
2. Kolonnen ble snudd 180 °C.
3. 1 kolonnevolum 1 M natriumacetat pH 3 ble eluert.
4. 1,5 kolonnevolum 1M NaOH ble eluert.
5. 1,5 kolonnevolum 1 M natriumacetat pH 3 ble eluert.
6. 2 kolonnevolum 2 M NaCl. Dette trinnet regenererer kolonnen med klorid-ioner.
7. Det ble vasket med destillert vann helt til 2 ml eluat ikke ble blakket av 1 dråpe AgNO₃-løsning, ca. 5 kolonnevolum.

Prosedyren ble utført med en flowhastighet på 2 ml/ min

2.3 Gelfiltrering

(GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2006)

Prinsipp

Gelfiltrering er en separasjonsmetode som separerer stoffer utelukkende etter deres molekylstørrelse. I denne kromatografiske metoden benyttes en stasjonærfase som består av et porøst pakkemateriale med en gitt porestørrelse. Når prøven transporteres med mobilfasen gjennom kolonnen, vil stoffmolekyler som er for store til å vandre inn i porene, bli ekskludert fra porene. De blir ført med mobilfasen mellom partiklene og elueres ut med void-volumet. Void-volum er elueringsvolum av molekylene som er ekskludert fra pakkematerialet. De resterende stoffmolekyler i mobilfasen vil kunne diffundere gjennom porene og vil avhengig av diffusjonsegenskaper elueres i ulike grad etter avtagende molekylstørrelse. Molekylene som er så små at de uten restriksjon kunne trenge gjennom alle porene i pakkematerialet vil bli eluert tilslutt. De elueres ut ved det teoretisk største elueringsvolumet som er det totale kolonnevolumet.

Reagenser

Destillert vann

0,05 % natriumazidløsning (NaN_3)

Utstyr

Kolonne: XK 25 (Pharmacia)

Kolonnematrix: Sephacryl™ S-200 HR

Kolonnevolum: ca. 467 ml (H: 100 cm, D: 2,6 cm)

Pumpe: Perimax (Spetec)

Fraksjonssamler: LKB-Super Frac (Pharmacia)

Oppsamlingsrør: Sentrifugesrør RB, 5 ml (Heger AS)

Acrodis® Syring Filter 0,45 μm Supor® Membrane (PALL Life Sciences)

Sprøyte: BD plastikk, 10 ml

Prosedyre

1. Kolonnen ble vasket med 2 kolonnevolum destillert vann med en hastighet på 1 ml/min.
2. Prøvematerialet ble løst opp i destillert, degasset vann og etterfølgende sterilfiltrert med 0,45 μm
3. Prøven ble applisert på kolonnen med hastighet på 1 ml/min.
4. Prøven ble eluert med ca. 2 kolonnevolum destillert, degasset vann ved hastighet 1 ml/min.
5. 180 rør á 10 ml fraksjoner ble samlet opp.
6. Fraksjonene ble testet for karbohydratinnhold ved å benytte fenol-svovelsyretesten (metode 2.4.1) og en karbohydratelueringprofilen ble laget.
7. Fraksjonene ble slått sammen på grunnlag av denne profilen.
8. Fraksjonene ble dampet inn etter metode 2.1.7 og frysetørket etter metode 2.1.8
9. Kolonnen tilslutt ble vasket med 1 kolonnevolum destillert vann med hastighet på 1 ml/min og deretter ble det konservert med 0,05 % NaN_3 -løsning
10. Kolonnen ble oppbevart ved 4 °C

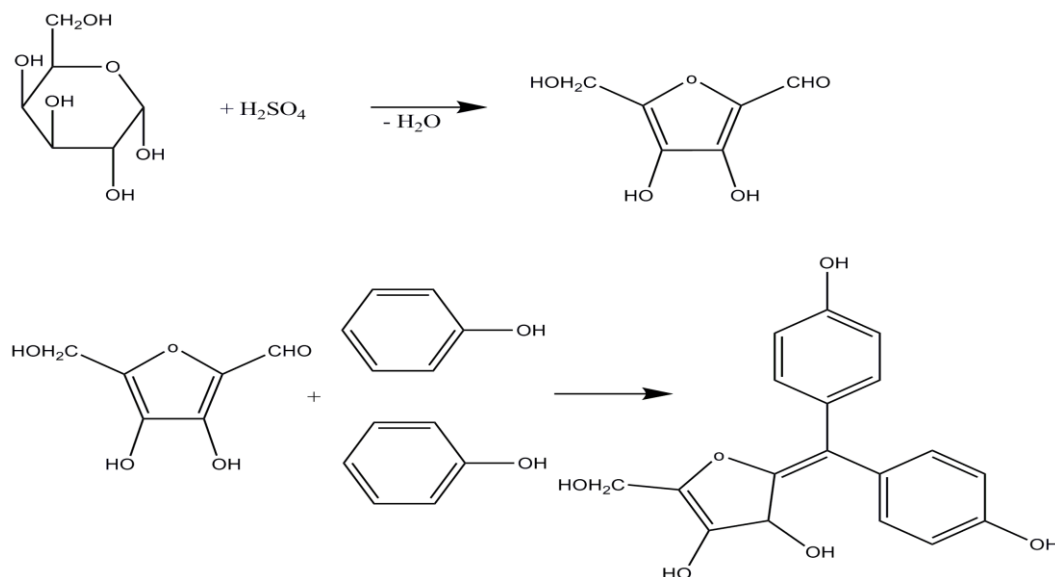
2.4 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

2.4.1 Fenolsvovelsyre testen

(Dubois et al, 1956)

Prinsipp

For å bestemme karbohydratinnhold ble svovelsyretesten benyttet. Dersom en løsning inneholder monosakkarider, oligosakkarider, polysakkarider eller derivater av disse, vil løsningen få en gul-oransje farge når det blir tilsatt fenol og konsentrert svovelsyre. Dette skyldes spaltning av komplekser som blir omdannet til furfural aldehyder på grunn av varmeutveksling. Komplekser dannes sammen med fenol og løsningen farges. Den gule fargen vil kunne absorbere lys ved 490 nm. Karbohydratinnholdet kan dermed måles spektrofotometrisk. Metoden er stabil og gir en stabil farge. Den brukes både kvantitativt og kvalitativt for å se om løsningen inneholder polysakkarider. Resultater fra testen viser hvilke fraksjoner skal slås sammen.



Figur 2-2. Reaksjonslikningen som oppstår når et monosakkarid reagerer med svovelsyre ved tilstedeværelse av fenol, og dannelsen av furanderivater (Glæserud 2008).

Reagenser

Fenol 4 %

Konsentrert svovelsyre

Utstyr

Hansker

Lab frakk

Vernebriller

Glass reagensrør

Finnpipette® 40-200

Pistons og spisser

Whirlmixer, Fisons

iMark Microplate Reader, BIO-RAD

Whirlmixer Fisons, Scientific Equipment

Mikroplater med flate og runde bunner

Prosedyre

1. 100 µl prøveløsning fra hver fraksjon ble overført til hvert sitt markert glassrør og tilsatt 200 µl 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre.
2. Destillert vann blir brukt som referanseløsning.
3. Blandingen ble mikset kort på Whirlmixer.
4. Blandingen fikk stå ved romtemperatur i 30 minutter.
5. Blandingen ble mikset godt og kort på whirlmixer.
6. 100 µl fra hvert rør ble overført til bønner på mikroplater.
7. Absorbansen ble målt spektrofotometrisk ved 490 nm ved hjelp av microplate reader, og plottet inn i Excel mot elueringsvolum.

2.5 Monosakkaridbestemmelse

2.5.1 Metanolyse

(Chambers og Clamp, 1971).

Prinsipp

(Cui, 2005)

For å analysere monosakkaridsammensetningen i polysakkaridene må glykosidbindingene mellom polysakkaridenes monomere brytes. Dette utføres ved hjelp av metanolyse. Det er en nukleofil substitusjonsreaksjon, der nukleofilen er del av løsningsmiddelet, i dette tilfellet metanol i HCl. Når polysakkaridskjeden brytes ned i surt, vannfritt miljø vil det dannes metylglykosider av de enkelte monosakkaridene. OH-gruppene ved C-1 metyleres, og COOH-gruppene i C6-posisjon på uronsyrene vil metylforestres. Reaksjonen foregår i vannfritt miljø for å forhindre hydrolyse.

Utstyr:

Gasskromatograf: Thermo Scientific, Focus GC

Detektor: Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H₂ og luft til flammen.

Styrings software: Chromeleon

Kolonne: Restek-Rxi 5MS."Fused silica" kapillærkolonne.

Lengde: 30 m. Indre diameter: 0,32 mm.

Bæregass: Helium

Flow mode: Konstant trykk (0,70 bar)

Injeksjon mode: Splitt

Splittforhold 1:10

Injeksjonsvolum: 1,0 μ l

Injektortemperatur: 260 °C

Detektortemperatur: 310 °C

Prosedyre

1. 1 mg frysetørket plantemateriale ble innveid i syrevasket supelco-rør.
2. Prøvematerialet ble dekket med parafilm samtidig ble det laget hull i filmen ved hjelp av nål.
3. Prøve materialet ble tørket under vakuum i P₂O₅ vakuumeksikator i 24 timer.
4. 1 ml 3 M HCl i metanol og 100 µl mannitolløsning (1 mg/ml) ble tilsatt som intern standard i prøven ved hjelp av målepipette.
5. Prøvene ble overført til et varmeskap på 80 °C i 20-24 timer. Etter 15 minutter ble korkene skrudd godt igjen for å hindre fordampning.
6. Prøven ble dampet tørr med N₂-gass ved 37 °C.
7. 100-200 µl vannfri metanol ble tilsatt og prøven ble igjen tørket med N₂-gass. Dette ble gjentatt 3 ganger.
8. Deretter ble prøven dekket med perforert parafilm og satt til tørk i vakuumeksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering.

2.5.2 TMS-derivatisering

(Sweeley et al, 1963, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010).

Prinsipp

(Cui, 2005)

Funksjonelle grupper som hydroksylgrupper, fenolgrupper, aminogruupper og karboksylsyregrupper som er en del av polysakkarids-struktur, nedsetter stoffers flyktighet. Videre forårsaker de adsorpsjon til overflater og dermed elueres stoffene som brede topper med haledannelse. Dette kan elimineres med derivatisering. Hensikten med derivatisering er å lage flyktige termisk stabile derivater av metylglykosidene og metylesterene slik at de kan separeres på en gasskromatografikolonne siden de frie hydroksylgruppene vil reagere med trimetylklorasilan og heksametyldisilazan, og da blir det dannet flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter (TMS-derivater) som er egnet for GC. Under derivatiseringen omdannes polare grupper til upolare grupper.

Reagenser

TMS-reagens: Trimetylklorosilan (TMCS)

Heksametyldisilazan (HMDS)

Pyridin (vannfri)

Utstyr

SMI-pipette (200 µl)

Whirlimixer, Fisons

Prosedyre

1. Den metanoliserte prøven fra metanolysen ble tilsatt 200 µl TMS-reagens og mikset godt.
2. Prøven ble hensatt i minst 30 minutter i romtemperatur før gasskromatografisk analyse.

2.5.3 Gasskromatografi

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010, Cui, 2005).

Prinsipp

Gasskromatografisk metode (GC) omfatter både separasjon og måling av gass og flyktige stoffer i løsning. I GC er den mobile fasen en bæregass. Når prøven injiseres vil stoffer raskt bringes i gassform og bæregassen vil bringe stoffene gjennom en kolonne. I kolonnen vil stoffene fordele seg mellom bæregassen og den stasjonære fasen. Stasjonærfasen er en temperaturstabil ikke flyktig væske som ligger som en tynn film på innsiden av kolonnen. Alle stoffer som skal analyseres ved GC må være flyktige og termisk stabile ved de temperaturene som benyttes, temperatur blir derfor den viktigste parameter i GC.

På utgangen av kolonnen er det en flammeionisasjonsdetektor (FID) som detekterer hvert stoff som kommer ut. Detektoren måler strøm fra ladete partikler som oppstår når organiske stoffer brenner i en flamme. Retensjonen til molekylene er styrt av stoffenes løselighet i den

stasjonære fasen, samt av sterisk konfigurasjon. Hvert stoff kommer ut med en eller flere topper i kromatogrammet avhengig av retensjonen og konfigurasjonen til molekylene.

Arealet under hver topp kan beregnes for kvantitativ bestemmelse. Internstandard benyttes for å kunne foreta kvantitativ analyse. I gasskromatografi er det meget viktig å benytte intern standard ved kvantifisering fordi man lett kan miste stoff når prøven fordamper seg under injesering av prøven i GC- kromatogrammet. Monosakkarider i en prøve vil gi et karakteristisk mønster i GC- kromatogrammet, dette skyldes at det vil innstilles en likevekt mellom monosakkaridenes furanose og pyranose form, α og β konfigurasjon, lineær struktur og ring form Hvert monosakkarid vil ha en relativ retensjonstid i forhold til en intern standard med kjent retensjonstid, og dette brukes til identifikasjon av monosakkaridene.

Reagenser

Heksan

Metanol

Utstyr

Gasskromatograf: THERMO SCIENTIFIC FOCUS GC

Injektor: Splitt: splittless

Autosampler: Fison AS-800

Detektor: Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H₂ og luft til flammen

Bæregass: Helium

Kolonne: Restek-Rxi 5MS. Fused silica kapillærkolonne

Injektor temperatur: 250 °C

Detektor temperatur: 300 °C

Splitt forhold: 1:10

Injiseringvolum: 1 μ l

Flow mode: Konstant trykk (0,70 bar)

Prosedyre

1. 1 µl klar prøveløsning ble injisert på GC-kolonnen.
2. Sprøyten ble vasket grundig med heksan både før og etter bruk.
3. Programmet ble startet og resultatet ble analysert i etterkant.

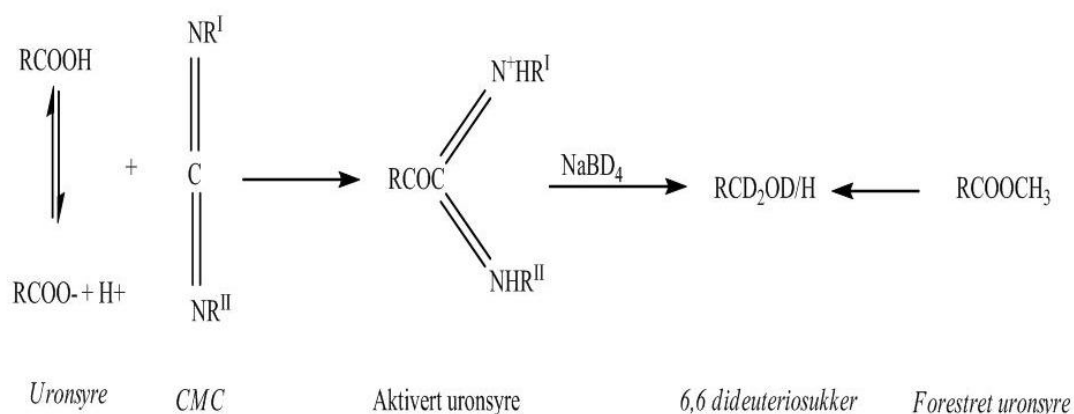
2.6 Strukturoppklaring

2.6.1 Metylering

Karboksylyrereduksjon

Prinsipp

For å kunne metylere prøvene, må frie uronsyrer og forestrede uronsyrer reduseres siden polysakkarider som inneholder syregrupper ikke vil kunne metyleres kvantitativt. Forestrede uronsyrer kan reduseres direkte til primære alkoholer ved hjelp av NaBD₄, mens frie uronsyrer må aktiveres først med carbodiimide. Karbohydrokylgrupper som reduseres vil danne 6,6- dideuteriosukker og dermed kan det skilles fra nøytrale sukker via GC-MS.



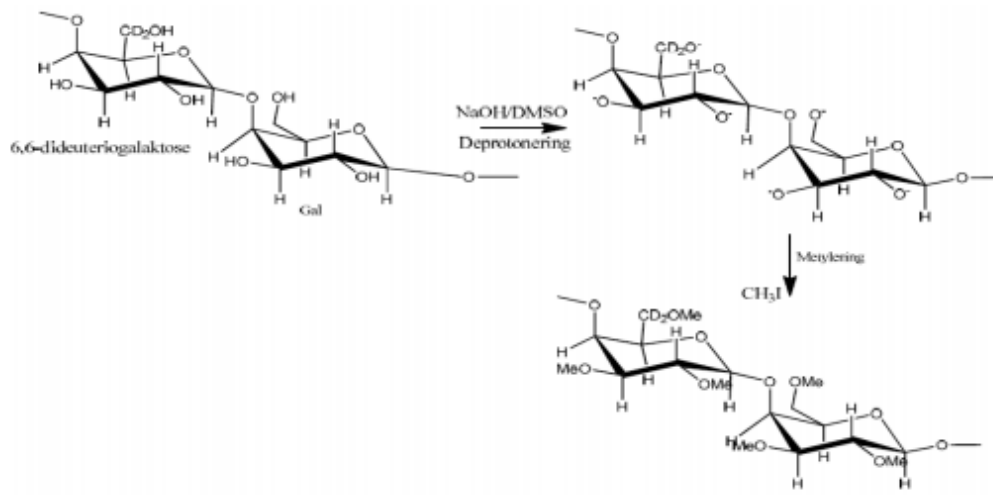
Figur 2-3. Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe i uronsyre, og reduksjon av forestret uronsyre (Glæserud, 2008).

Metylering

(Ciucanu og Kerek, 1984)

Prinsipp:

Metylering brukes til karbohydrat analyse. I denne prosessen vil frie hydroksylgrupper i polysakkarider deprotoneres vha dimetylsulfoksid (DMSO) og metyleres deretter ved hjelp av metyljodid i sterkt basisk miljø.



Figur 2-4. OH-grupper i polysakkaridet metyleres (Meskini, 2011).

Utstyr

Nitrogen-tørker

Pasteurpipetter

Kapillær rør

Glasspipetter med korte og lange spisser

Vortex-mikser

Sentrifuge Multifuge 4 KR heraeus

Risteapparat: IKA-Vibrax-VXR

Morter og pistil

Syrevaskede metyleringsrør

Reagenser

MeOH

DMSO – dimetylsulfoksid (Sigma)

NaOH – pellets

CH₃I - metyl-jodid (Fluka)

Natriumtiosulfat

Diklormetan

Prosedyre

Prosedyre:

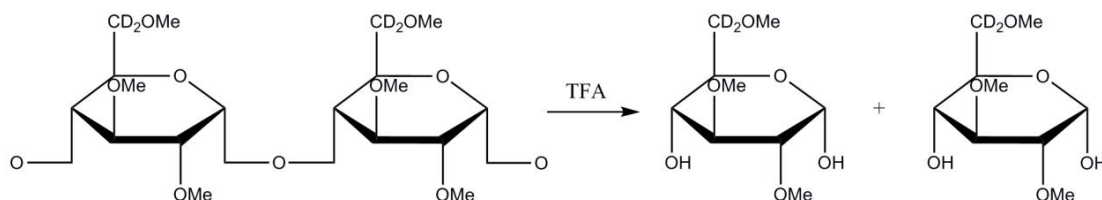
1. Den frysetørkede prøven fra karboksylsyre-reduksjonen (metode 4.1.8) ble tilsatt 500 µl DMSO og ristet i 20 minutter. Prøver som ikke løste seg ble sonikert på ultralydbad.
2. Prøven ble overført til et syrevaskede metyleringsrør med glasspipette.
3. En 120 mg/ml NaOH /DMSO-suspensjon ble laget ved å rive NaOH-pellets med DMSO i morter. Forbruket var 2 pellets/ml DMSO.
4. 500 µl av suspensjonen ble tilsatt til prøven uten å berøre glassveggene ved hjelp av SMI-pipette.
5. Røret ble blåst med nitrogen gass og korken skrudd godt til. Deretter ble prøven ristet i 40 minutter.
6. Prøven ble tilsatt 100 µl metyljodid og ristet ved 200 rpm i 10 minutter.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. 200 µl metyljodid ble tilsatt prøven etterfulgt av risting ved 200 rpm i 10 minutter.
9. 10 ml nylaget 100 mg/ml natriumtiosulfat i vann og 2 ml kloroform ble tilsatt til prøven før miksing og sentrifugering.
10. Vannfasen (øverst) ble fjernet med pasteurpipette.
11. Kloroformfasen ble deretter vasket med 5*5 ml destillert vann. Det ble blandet godt og sentrifugert mellom hver vasking. Mellomfasen ble kastet.
12. Kloroformfasen ble dampet inn til tørrhet med N₂-gass.

Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

De metylerte polysakkaridene må hydrolyseres før analyse på GC. Ved hydrolyse blir glykosid bindingene brutt, mens metyl-eter bindinger forblir uforandret. Dette skjer i surt miljø med TFA som reagens. TFA er både flyktig og effektiv og er derfor velegnet til bruk i metoden.



Figur 2-5. Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (Glæserud, 2008).

Utstyr

Nitrogen gassoppsett med varmeenhet: Reacti Therm III, Pierce

Varmeskap, Function line, Heraeus Instruments

Pipetter Speed-vacuum

Reagenser

2,5 M Triflouredikksyre (TFA)

Prosedyre

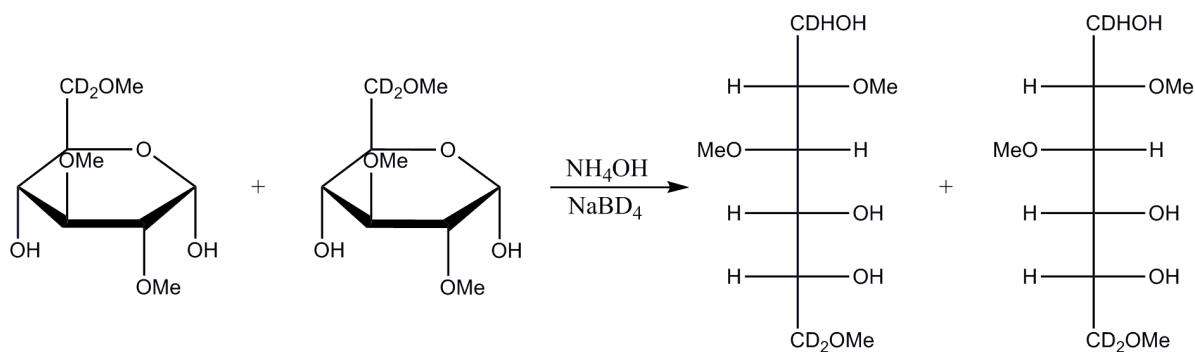
1. 500 μ l 2,5 M TFA ble tilsatt metylert prøve og boblet gjennom med nitrogen gass.
2. Metyleringsrøret ble flushet med nitrogengass og korken skrudd til.
3. Prøvene ble inkubert i varmeskap ved 100 i 2 timer,
4. Prøvene ble avkjølt og dampet inn til tørrhet i speedvacuum med nitrogen gass.

Reduksjon

(Kim og Carpita, 1992)

Prinsipp

Ringstrukturen i monosakkarider brytes ved at det sykliske hemiacetat ved C1 reduseres til alditol ved hjelp av NaBD₄ og NH₄OH. Se figur 2-6.



Figur 2-6. Reduksjon av hydroksylgrupper ved C1 (Glæserud, 2008).

Utstyr

Ultralydbad

Varmeskap

Nitrogengassoppsett for inndamping

Reagenser

2 M NH₃

1 M NaBD₄, nylaget

Iseddik

5 % eddiksyre i metanol

Metanol

Prosedyre

1. De tørre prøvene ble tilsatt 500 µl 2 M NH₃ og 500 µl nylaget NaBD₄ i 2 M NH₃
2. Løsningene ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før inkubering i varmeskap ved 60 °C i 1 time

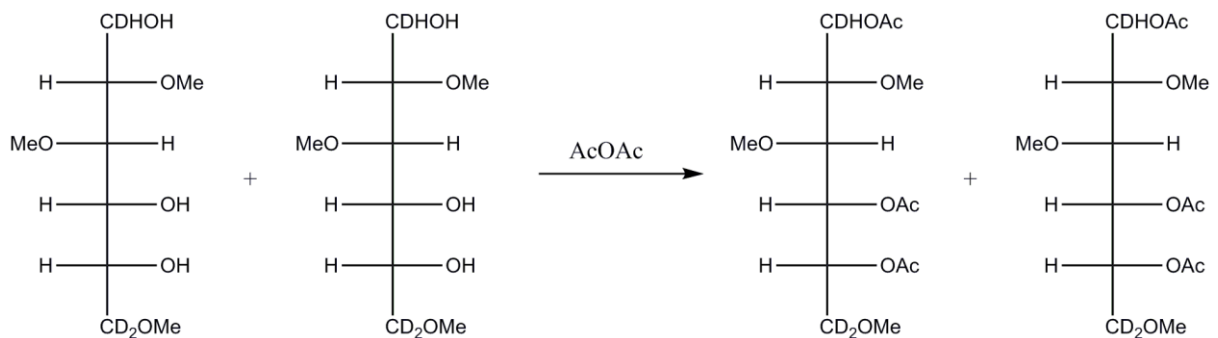
3. Overskudd av reaktant ble ødelagt ved tilsetning av 3*50 µl iseddik.
4. Rørene ble ristet godt mellom hver gang og tørket inn i speed-vacuum-maskinen.
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i metanol ble tilsatt 2 ganger
6. Punkt 4. ble gjentatt
7. 2*2,5 ml vannfri metanol ble tilsatt for å fjerne borsyre.
8. Punkt 4. ble gjentatt

Acetylering

(Kim og Carpita 1992)

Prinsipp

Hydroksylgruppene som ble dannet etter hydrolyse og reduksjon acetyleres med eddiksyreanhydrid, dette gjøres for å få komponentene mer lipofile og bedre egnet for GC-MS analyse.



Figur 2-7. Acetylering med eddiksyreanhydrid (Glæserud, 2008).

Reagenser

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Vannfri metanol

Destillert vann

Utstyr

Minishaker: MS2 IKA

Sentrifuge – MSE

N₂-gassoppsett med varmeeenhet: Reacti Therm III, Pierce

Syrevaskede supelcorør med kork

Finnpipetter med spisser SMI-pipetter (50µl og 100 µl) med kapillærer

Prosedyre

1. 200 µl 1-metylimidazol ble tilsatt residuet fra reduksjonen, etterfulgt av 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Prøven ble mikset godt på Whirlimiker og satt til henstand i 10 minutter.
3. 10 ml destillert vann ble tilsatt for å ødelegge overskuddet av eddiksyreanhydrid. Løsningene ble mikset godt og satt til henstand i 10 minutter
4. Prøvene ble så ekstrahert porsjonsvis med 2*1 ml diklormetan (i avtrekk), mikset i 30 sekunder og sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm. Den nederste fasen ble samlet hver gang.
5. Ekstraktene ble samlet og tilbakevasket med 2*5 ml deionisert vann. DCM-fasen ble overført til et supelcorør og tørket med strøm av nitrogengass. Det ble passet på å ikke tørke for mye da flyktige derivater kan gå tapt, samtidig som det er viktig å fjerne alt vann for at ikke polare stoffer forurenses GC-MS apparatet.
6. Residuet ble løst i 200-300 DCM.
7. Prøven ble analysert ved GC-MS.

2.6.2 GC-MS

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010)

Prinsipp

Gasskromatografi (GC) kombinert med massespektrometer (MS) som detektor kan gi strukturinformasjon om karbohydratene som ble dannet under metyleringsmetoden. De ferdig metylerte prøvene fra metode 2.6.1 ble analysert ved hjelp av GC-MS. Prøvene blir først separert på en GC-kolonne. Etter at stoffene separerer seg, blir de ledet inn i massespektrometret. I MS- detektoren vil organiske forbindelser bombarderes med elektroner i vakuum. De ioniserte molekylene blir brutt ned til mindre deler som kalles fragmenter. De ioniserte molekylene og eventuelle fragmenter separeres etter deres masse/ladningsforhold (m/z), deretter vil de detekteres av en detektor.

Man får et massespektrum som er et plot av relativ intensitet av ionene som funksjon av deres m/z -verdi, slik kan man bestemme massen deres. Massespekteret er svært karakteristisk og kan sies å være stoffets fingeravtrykk.

GC-MS av prøvene ble utført av Hoai Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Reagenser

Pyridin

Utstyr

GC-MS: GC 8000 series

Detektor: Fisons Instruments, MD 800

Injektor: Splitt (1:10)

Kolonne: Factor FOURTM, VF-1ms Filmtykkelse: 0,25 μm Indre diameter: 0,25 mm

Lengde: 30 m

Temperaturområdet: 80-280 °C

Injektortemperatur: 250 °C

Dataprogram: Masslab

Viktige primærfragmenter: 45, 47, 117, 118, 131, 161, 162, 163, 175, 189, 190, 203, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 305, 307

Prosedyre

1. Det ble åpnet for gass-strømmene, GC og integrator ble programmert.
2. Sprøyten ble først skylt med pyridin, deretter ble prøven injisert.

Temperaturprogram: 80 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 170 °C $\xrightarrow{0,5\text{ °C/min}}$ 200 °C $\xrightarrow{30\text{ °C/min}}$ 280 °C

2.7 Immunmodulerende aktivitet

2.7.1 Komplementfikseringstest

(Michaelsen et al, 2000)

Prinsipp

Komplementsystemet er en viktig del av det medfødte immunsystemet. Som nevnt i innledningen kan polysakkarider stimulere aktiviteten til immunforsvaret.

Komplementfikseringstesten brukes til å undersøke om polysakkaridet har en immunmodulerende effekt. Det blir brukt røde blodceller fra sau (SRBC). Disse blir sensibilisert og dekket med antistoff fra kanin. Dersom komplementet er intakt vil det via en kaskade resultere i hemolyse av erytrocyttene. Polysakkaridene i prøven blir først inkubert med komplement før blodceller blir tilsatt. I denne testen vil graden av lysing indikere gjenværende komplement-aktivitet, og positiv aktivitet av prøven i testen vil resultere i hemming av lyse.

Utstyr

Mikrotiterplate, 96 brønner med runde og flate bunn.

Sentrifuge, MSE

Varmeskap Labnet 211DS Shaking Incubator (37 °C)

Mikroplateleser (BioRad)

Teip

Glassrør

Whirlimixer, Heidolph REAX top

Eppendorf rør

Pipetter

Reagenser

NaCl (0,9 %) Veronalbuffer (med en pH på 7,2), 2 mg/ml BSA (Bovine Serum Albumin 30 %), og 0,02 % natriumazid.

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor, fortynt 1:10 i veronalbuffer/BSA-bufferen

Erytrocytter fra sau

Komplementkilde: Serum fra ECG (humant)

Destillert vann

Standard (BPII)

Fosfatbuffer (PBS)

Prosedyre

1. Vasking av saueblodceller før sensibilisering

1. 500 µl mengde blod ble tatt ut etter plasmafjerning
2. Blodcellene ble vasket tre ganger med 0,9 % NaCl og en gang med veronal/BSA buffer. Det ble sentrifugert mellom hver vask og vaskevannet ble fjernet.

2. Sensibilisering av saueblodceller

1. 15µl Virion 9020 Amboceptor, 60 µl pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA buffer ble inkubert med risting ved 37 °C.
2. Løsningen ble vasket 2 ganger med NaCl (0,9 %) og 1 gang med veronal/BSA buffer, det ble sentrifugert mellom hver vask.
3. Vaskevannet ble fjernet og blodet ble fortynnet med 5,940 ml veronal/BSA buffer, en 1 % løsning av blodceller ble laget og satt i kjøleskapet til det skulle brukes.

3. Fortynning av prøvene

Innveid prøve (1 mg) ble løst i veronal/BSA buffer slik at utgangskonsentrasjonen blir 500 mg /ml.

En 4-folds og 2-folds fortynningsrekke blir laget.

Rør #	Konsentrasjon (µg/ml)	Innhold
1	500	300 µl veronal/BSA-buffer + 300 µl stamløsning
2	125	300 µl veronal/BSA-buffer + 100 µl fra rør 1
3	31,3	300 µl veronal/BSA-buffer + 100 µl fra rør 2
4	7,8	300 µl veronal/BSA-buffer + 100 µl fra rør 3
5	2	300 µl veronal/BSA-buffer + 100 µl fra rør 4
6	0,5	300 µl veronal/BSA-buffer + 100 µl fra rør 5

Tabell 2-1 viser 4-folds fortynning.

4. Titreringskurve for komplementkilden

1. 4 brønner på en rundbunnet mikrotiterplate ble fylt med 100 µl destillert vann.
2. 4 brønner med 150 µl veronal/BSA buffer.
3. 4 brønner med 100 µl veronal/BSA buffer (blank).
4. 24 brønner med 50 µl veronal/BSA buffer (4 brønner per fortynning av komplement/buffer).
5. Fortynningsrekken av komplement og buffer ble laget etter prosedyren.
6. 50 µl komplement/buffer ble tilsatt brønnene med 50 µl veronal/BSA buffer.
7. Platen ble dekket med teip og satt på risting i 30 minutter ved 37 °C.
8. 50 µl 1 % SRBC ble tilsatt hver brønn og inkubert ved risting i 30 minutter ved 37 °C.

9. Platen ble sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm.
10. 100 μ l fra hver brønn ble overført til en flatbunnet mikrotiterplate, og sentrifugert for å bli kvitt luft som kan dannes ved overføring.
11. Absorbansen ble avlest ved 405 nm på en mikroplateleser.
12. Den fortynningen som ga 50 % lyse av SRBC ble anvendt videre i utførselen av komplementfikseringstesten.

Forhold komplement:buffer	Komplement (μ l)	Veronal/BSA-buffer (μ l)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890

Tabell 1-2 viser fortynningsrekken av komplement.

2.8 Enzymatiskdegradering

(Miller, 1959 og Knutsen, 1991, Grønhaug et al, 2011).

Prinsipp

Målet med enzymdegradering er å undersøke strukturen til hårete områder nærmere. Endo- α -D-(1–4)-polygalakturonase, pectinase fra *Aspergillus aculeatus* er et enzym som spalter glykosidbindinger i områder med ikke-esterifisert homogalakturonan. Forgreinede områdene av pektinet blir isolert siden Endo-polygalakturonidase degraderer 1,4-GalA ved å katalysere hydrolyse av glykosidbindinger som binder sammen galakturonsyre enheter.

Prøven ble delvis enzymatisk degradert. For å forbedre effekten av enzymet ble uronsyrene i prøven først deesterifisert med NaOH. Etter enzymdegraderingen ble de forgrenede områdene separert på en Biogel P30-kolonne med destillert vann som elueringsmiddel. Karbohydrat elueringsprofilen ble bestemt med fenol-svovelsyre-metoden. De aktuelle sure fraksjoner ble slått sammen og frysetørket.

Reagenser

5M acetatbuffer

Destillert vann

37 % HCl (Merck)

Pectinase 3800 U/ml

Isedikk

Dinitrosalicylic syre

Destillert vann

5M NaOH

Utstyr

pH-måler

Dramglass

Vannbad

Metyleringsrør med skrukork Varmeskap

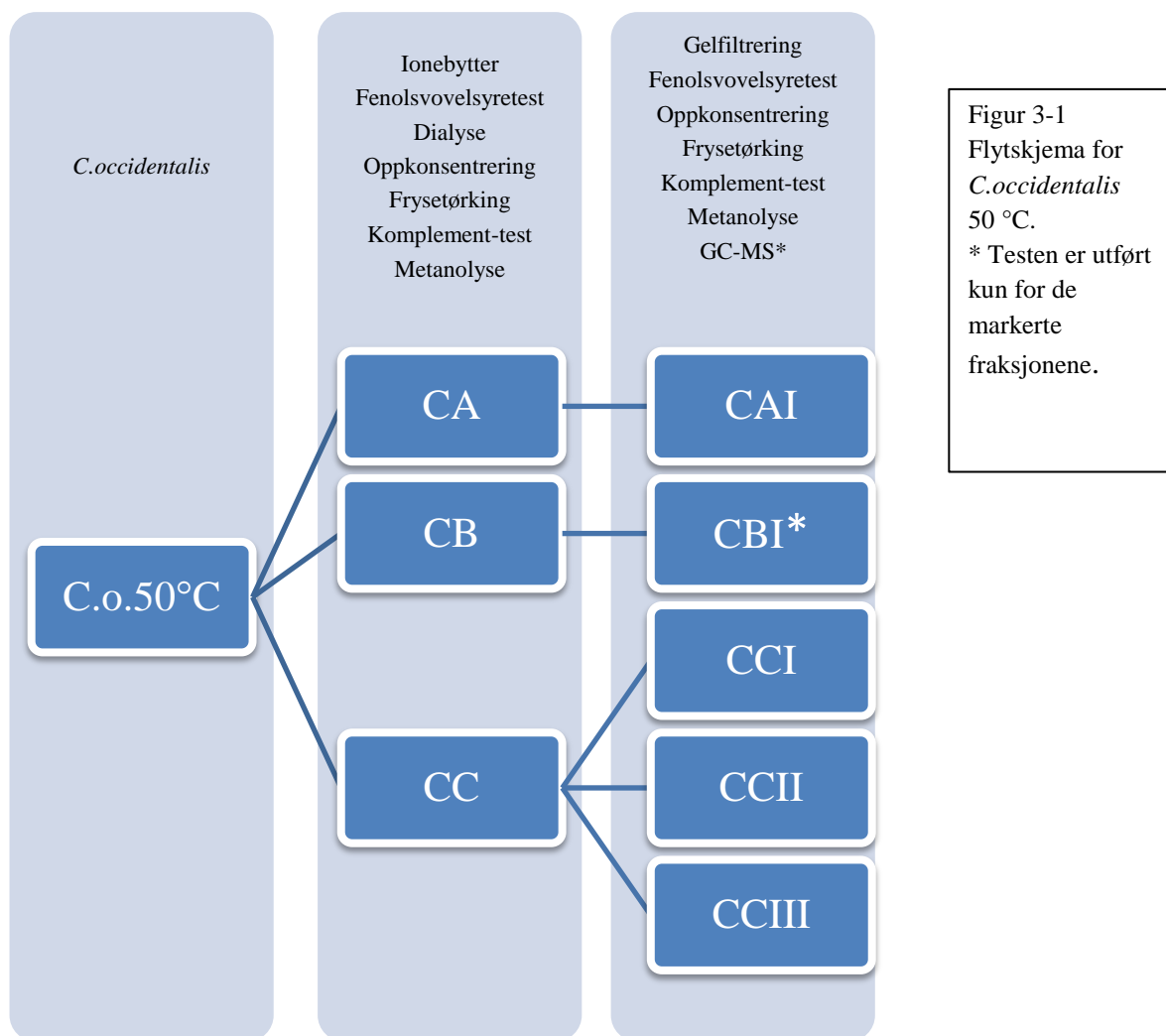
Biogel P-30 kolonne

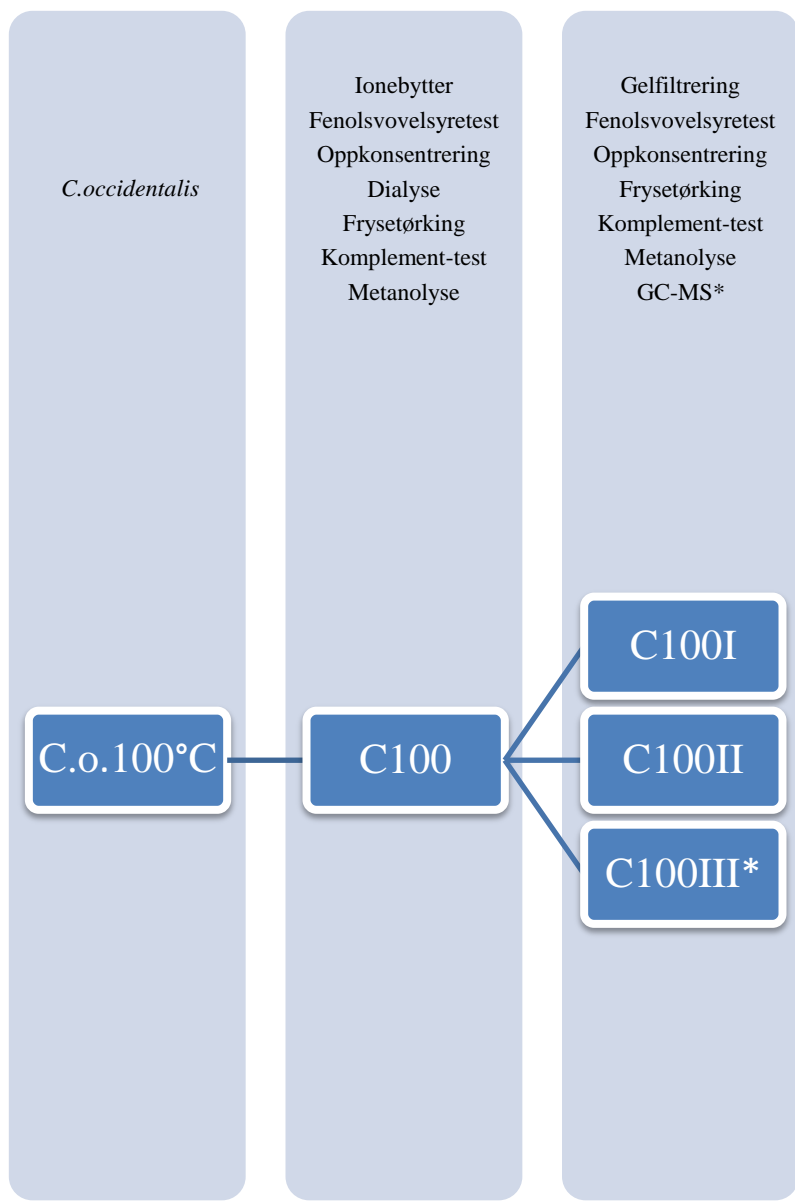
Filter: PALL Acrodisc®, sterile, 0,45 µm

Prosedyre

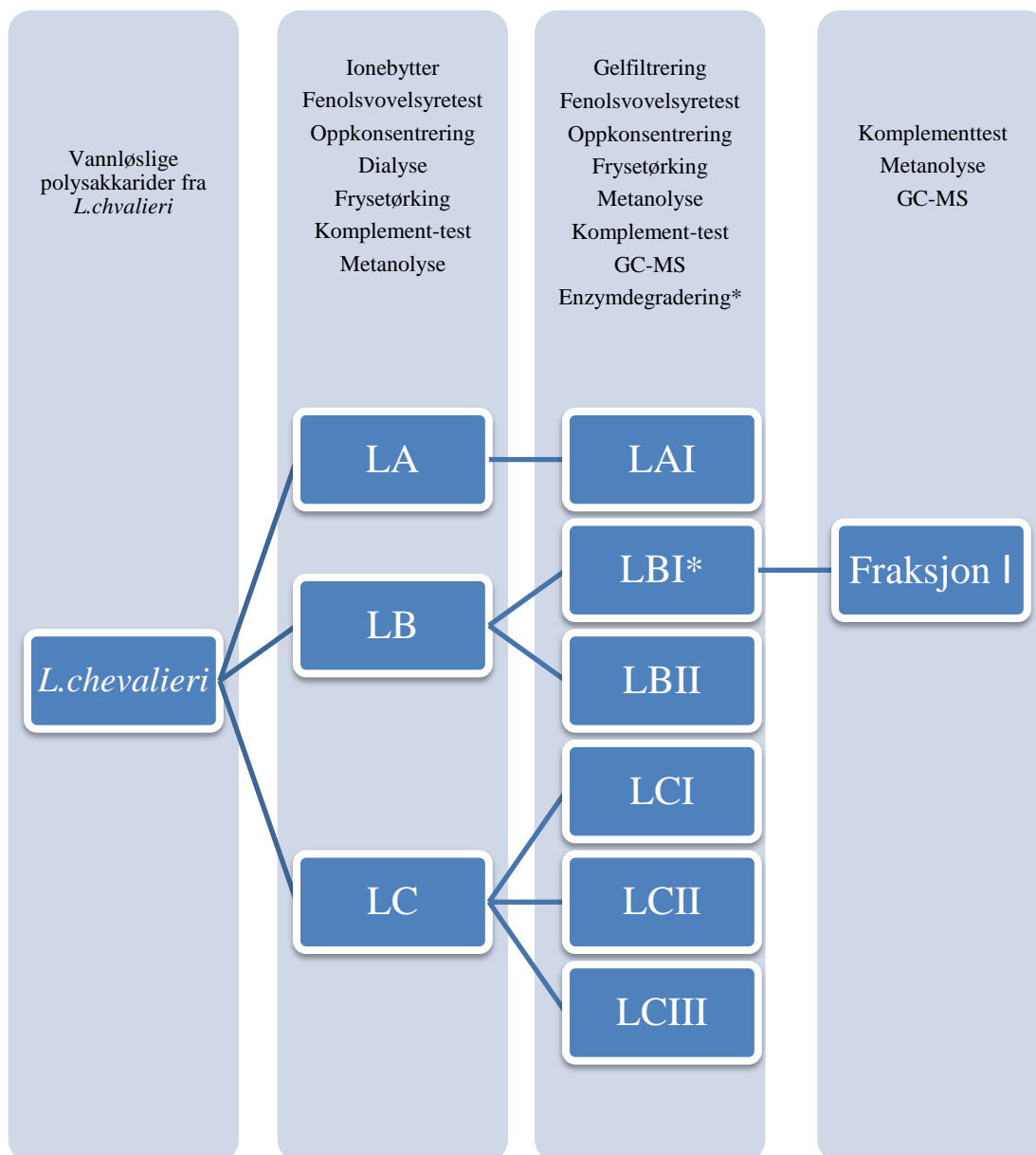
1. 25 mg prøve ble veid inn i metyleringsrør.
2. Prøven ble løst i 5 ml 50 mM NaOH og de-forestret i 24 timer ved 0 °C
3. Reaksjonsoppløsningen ble nøytralisert ved tilsetning av noen få dråper iseddik
4. Den de-forestrede prøve ble fortynnet med 50 mM acetatbuffer (pH 4,0) til en konsentrasjon på 5 mg/ml
5. Det ble tilsatt 1,6 µl D-(1–4)-polygalacturonase .
6. Løsningen ble inkubert 26 timer ved 37 °C.
7. Etter 26 timer ble enzymene deaktivert ved å prøveløsning ble kokt opp i to minutter.
8. Prøven ble filtrert 0,45 µm og overført til en Biogel P-30 kolonne.
9. Det ble samlet totalt 20 rør á 2,5 ml per rør.
10. Residuet ble frysetørket, veid og brukt videre.

3 Resultater og diskusjon





Figur 3-2
 Flyteskjema for
C.occidentalis
 100 °C. * Testen er
 utført kun for de
 markerte
 fraksjonene.

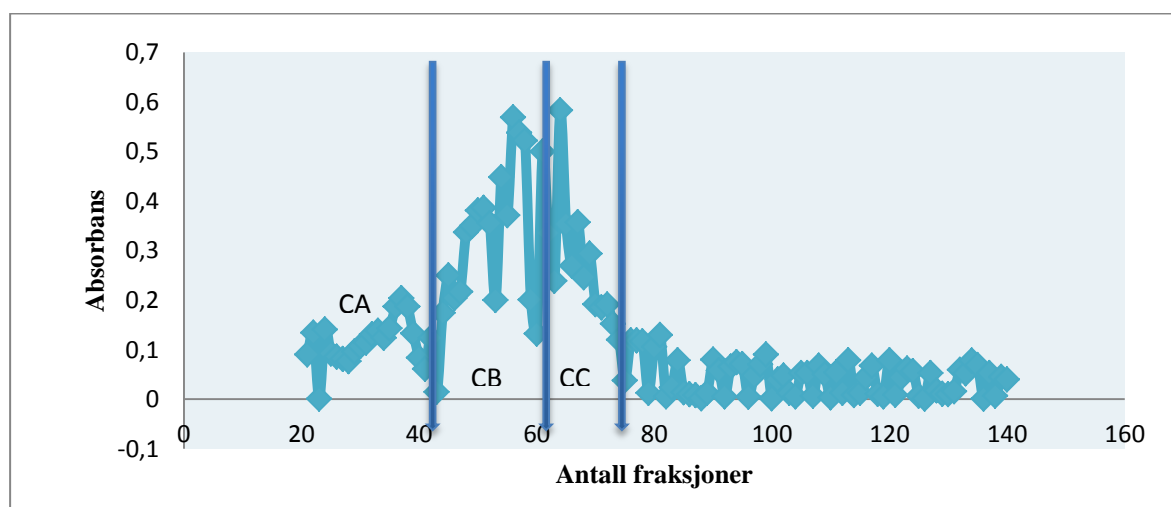


Figur 3-3. Vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri*.
 * Testen er utført kun for de markerte fraksjonene.

3.1 Isolering av polysakkarider

3.1.1 Ionebytterkromatografi – ANX Sepharose (Fast Flow)

De to fraksjonene fra *C.occidentalis* ekstrahert med 50 og 100 °C destillert vann ble applisert på ANX Sepharose (Fast Flow) for å separere nøytrale polysakkaridene fra de sure. Det ble kjørt tre runder, der ved hver runde ble ca. 100 mg av den ekstraherte prøven løst i 20-100 ml destillert vann avhengig av hvor raskt tørket materiale lot seg løses, deretter ble prøveløsningen sentrifugert og steriltfiltrert. Det samme ble utført for vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri*, der ble det kjørt to runder. Etter hver runde ble fenolsvovelsyretest (metode 2.4.1) utført. Fraksjonene som inneholdt polysakkarider viste en svak gulffarge. Fraksjonene ble samlet inn etter karbohydratsprofilen. Nøytrale polysakkarider ble eluert ut med destillert vann. Etter at det ble bestemt hvilke fraksjoner som skulle slås sammen, ble de tilhørende fraksjonene dialysert for å fjerne salter, oppkonsentrert og til slutt frysetørket.



Figur 3-4. Karbohydratprofil etter 3. runde eluering av vannløselige polysakkarider fra *C.occidentalis*.

Sure polysakkarider ble eluert ut etter økende surhetsgrad ved hjelp av en NaCl-gradient fra 0 til 1,5 M som ble laget ved hver kjøring. Til sist ble kolonnen rensert for de aller sureste polysakkaridene og fargestoffer som fremdeles satt fast i kolonnen, med 2 M NaCl. De nøytrale polysakkaridene ble eluert med to kolonnevolum vann og kastet. Grunnen til at nøytrale polysakkarider ikke ble oppkonsentrert og frysetørket er lav biologisk aktivitet.

De sammenslåtte fraksjoner fra *C.occidentalis* ekstrahert med 50 °C vann ble kalt for CA, CB, og CC. Fraksjonen som var ekstrahert med 100 °C destillert vann ble kalt for C100. For vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* ble det kalt LA, LB og LC.

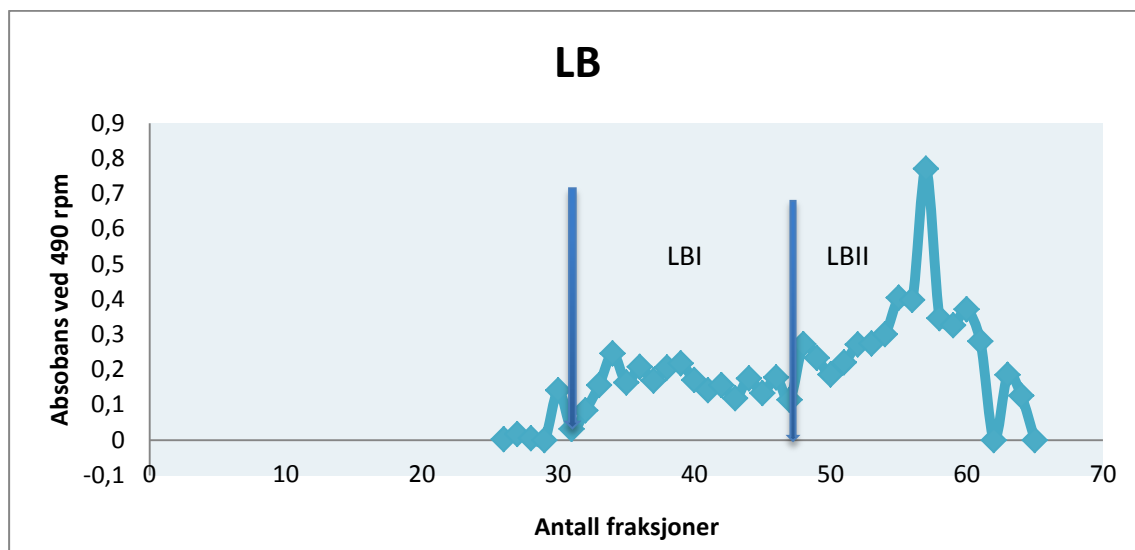
Frysetørkede fraksjoner ble så undersøkt for biologisk aktivitet ved hjelp av komplementfikseringstesten. De fraksjonene som viste høyere aktivitet enn standarden BP II og hadde et høyt utbytte ble brukt for videre polysakkaridanalyser.

Fraksjon	Vekt etter ekstraksjon	Sure fraksjoner	Utbytte i mg
<i>C.occidentalis</i> 50 °C vann	257.4 mg	CA	38,7
		CB	61,4
		CC	56,1
<i>C.occidentalis</i> 100 °C vann	337 mg	C100	74,9
Vannløselige polysakkarider fra <i>L.chevalieri</i>	800 mg	LA	45,5
		LB	109,5
		LC	151,5

Tabell 3-1. Tabellen viser utbytte etter ionebytter for de ulike råekstraktene.

3.1.2 Gelfiltrering

Ved gelfiltrering separeres molekyler etter deres størrelse. Metoden brukes til å skille høymolekylære forbindelser fra lavmolekylære, deretter sammenlignes komplementaktivitet mellom prøvene før og etter gelfiltrering. Det ble bestemt å jobbe videre med de sure fraksjonene fra både *C.occidentalis* og vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri*. Alle disse viste signifikant aktivitet i komplement-testen som er omtalt senere. Fraksjonene ble sterilfiltrert før applisering på kolonnene. LB og LC ble applisert på en større kolonne, "High Load Superdex 200 26/60" mens CA, CB, CC, C100 og LA ble applisert på en mindre kolonne, "High Load Superdex 200 16/60".



Figur 3-5. Karbohydratprofil etter eluering av LB på gelkolonne. Denne prøven ble fraksjonert i to deler, LBI og LBII.

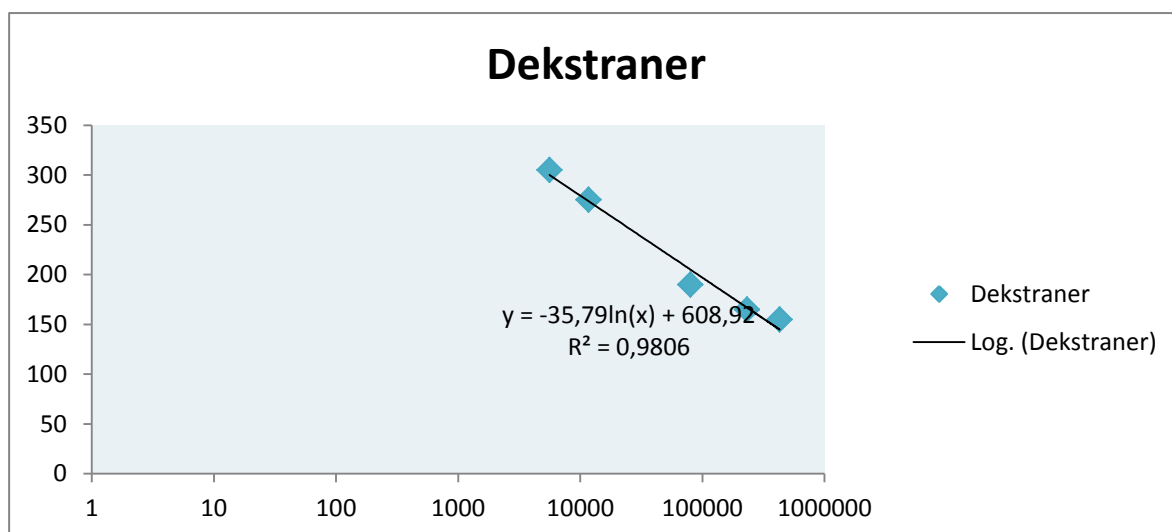
Prøvene ble løst i 20-50 ml destillert vann. Alle prøvene fra *C.occidentalis* og *L.chevalieri* hadde god løselighet og lot seg løse i små vannmengder. Løsningene ble sterilfiltrert med et filter med porestørrelse 0,22 μm før de ble injisert på kolonnen. Fenolsvovelsyretesten, (metode 2.4.1), ble foretatt, deretter ble prøvene oppkonsentrert (metode 2.1.7) og frysetørket (metode 2.1.8). Etersom destillert vann ble benyttet som elueringsmiddel, trengtes det ikke dialyse i etterkant.

Etter gelfiltrering på HiLoad Superdex 16/600 200 og High Load Superdex 200 26/60 ble de isolerte fraksjonene metanolysert og monosakkaridsammensetningen ble bestemt ved GC. Fraksjonene ble kalt CAI, CBI, CCI, CCII, CCIII, C100I, C100II, C100III, LAI, LBI, LBII, LCI, LCII og LCIII.

Sure fraksjoner fra ionebytter	På satt mengde i mg	Fraksjoner etter gel filtrering	Utbytte i mg	Utbytte i %
CA	38,7	CAI	7	18,1
CB	61,4	CBI	8,2	13,4
CC	56,1	CCI	7	40
		CCII	5	
		CCIII	10,3	
C100	70,5	C100I	7	48,5
		C100II	7	
		C100III	20,2	
LA	43,7	LAI	5,5	12,6
LB	109,5	LBI	33,1	62,2
		LBII	35	
LC	144,4	LCI	14,2	37,7
		LCII	20	
		LCIII	20,2	

Tabell 3-2. Tabellen viser utbytte etter gelfiltrering for de ulike råekstraktene.

For å bestemme molekylvekten ble det benyttet en standardkurve for dekstraner med kjent molekylvekt. Standardkurven ble brukt til å finne en regresjonslinje og funksjonene til regresjonslinjen. Kurven ble laget ved at fem ulike dekstraner med kjent molekylvolum ble gelfiltrert i "High Load Superdex 200 26/60" kolonne. Det samme ble utført for den mindre kolonnen "High Load Superdex 200 16/60". Til denne kolonnen ble det laget fem ulike dekstraner med kjent molekylvekt, der funksjonen fra regresjonslinjen ble brukt til å beregne molekylvektsdistribusjonen. En godt tilpasset lineær regresjonslinje ble fastslått og satt til en verdi på 0,98056 som betyr at tilpasningen til regresjonslinjen var svært god og tilfredsstillende.



Figur 3-6. Standardkurve basert på dekstraner med kjent volum.

Molekylvekten til fraksjonene ble beregnet etter hvilken kolonne fraksjonen ble kjørt på. De fem standardene i begge kurvene ble plottet inn i ett diagram der y-aksen var antall milliliter som gikk gjennom kolonnen og x-aksen var molekylvekt i logaritmiskskala. Det ble også laget en standardkurve til for fraksjoner som er kjørt i den lille kolonnen. Forskjellen mellom de to standardkurvene var at y-aksen var logaritmen til molekylvekten og x-aksen var antall milliliter. Regresjonsligningen fra begge kurvene kunne brukes til å beregne molekylvektfordelingen for polysakkaridene i de ulike fraksjonene.

Molekylvekt for de forskjellige fraksjonene

HiLoad Superdex 16/60 200 prep og 26/60 200 er hoved kolonner som ble benyttet til gelfiltrering. Kolonnene er fra GE Healthcare.

Superdex prep 200 kolonne er en sammensatt matriks av dekstran og kryssbundet agarose. Den høye kjemiske og fysiske stabilitet av agarose gjør at matriksen egner seg for separasjon av molekyler i molekylvektsområdet 10000-600000 Da for Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences, 2011).

	Fra	Til	Hovedtopp	sekundærtopp
CAI	7 500	158 900	71 100	-
CBI	16 700	115 200	60 600	-
CCI	37 400	83 500	71 200	-
CCII	16700	31 800	27 100	-
CCIII	4600	14 300	12 100	8800
C100 I	69 000	421 000	230 400	126 000
C100 II	11 400	65 400	37 600	-
C100 III	4600	7500	3100	-
LA	83 700	355 000	186 600	-
LBI*	32 700	322 200	114 300	-
LBII*	3500	25 300	8500	-
LCI*	44 300	370 500	105 300	-
LCII*	11 300	45 500	19 700	-
LCIII*	3200	9800	7400	-

Tabell 3-3. Oversikt over molekylvekten i Da til de ulike fraksjonene etter gelfiltrering *Fraksjoner som er eluert i den store kolonne på HighLoad Superdex prep grade 200, størrelse 26/60.

Tabell 3-3 viser at molekylvektfordelingen for fraksjonene fra bladene til *C.occidentalis* strekker seg fra ca. 4600 Da til 421000 Da, mens molekylvektfordelingen for fraksjonene fra vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* strekker seg fra 3200 Da til 370000 Da. Det er stor spredning innenfor de ulike plantene. Med god spredning og stor intervall antar man at det finnes ulike strukturer av høymolekylære forbindelser i prøvene. Metoden brukes til å bestemme i hvilket molekylvektintervall strukturene i prøvene ligger innenfor. Denne metoden gir ingen nøyaktig svar, men resultatet kan brukes som et estimat.

3.2 Struktur og aktivitetsforhold- *C.occidentalis* 50 °C

3.2.1 Monosakkaridsammensetning etter ionebytter

1 mg prøve av alle fraksjonene ble veid inn, metanolysert og TMS-derivatisert, deretter ble de tilhørende prøvene kjørt i gasskromatogrammet for å bestemme monosakkaridinnholdet. Ved GC-analyse gir hvert monosakkarid et karakteristisk mønster av topper. Det skyldes at et monosakkarid kan forekomme i flere konformasjoner som α - eller β - konformasjon. Deretter

kan man sammenligne prøvens kromatogram med mønstre og retensjonstider med standardkurve som er laget på forhånd med identifiserte monosakkarider. Man sammenligner retensjonstiden og antall topper, samtidig bestemmes monosakkaridmengden i de forskjellige prøvene ved hjelp av arealet under kurven til den høyeste toppen i mønsteret.

Sampl-ID	CA	CB	CC	C100
Ara	26,3	14,4	12,7	7,3
Rha	4,0	14,1	16,0	4,2
Fuc	4,1	2,1	0,8	4,7
Man	1,4	n.d.	0,2	14,5
Gal	40,9	23,7	22,2	3,5
Glc	2,0	2,2	2,1	n.d.
GlcA	0,1	0,3	0,9	0,5
GalA	18,2	40,0	41,6	65,2
4-O-Me-GlcA	3,1	3,5	3,7	0,5

Tabell 3-4. Karbohydratsammensetning av fraksjoner etter ionebytterkromatografi. Verdiene er oppgitt i prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold. n.d. = ikke detektert.

CA, CB, CC og C100 inneholder arabinose, rhamnose, galaktose som er typiske monosakkarider i pektiner. Fraksjonene inneholder varierende grad av Gal, Ara og Rha. I tillegg er det mye av GalA, opptil 40 %, i CB, 41,6 % i CC, og 65,2 % i C100. Dette indikerer at polysakkaridene er av pektintype med glatte og hårete områder, med arabinogalaktaner blant annet på "hairy regions". Innhold av GalA er større i C100 enn CA, CB og CC, noe som kan skyldes betydelige mengder av HG i C100-fraksjon.

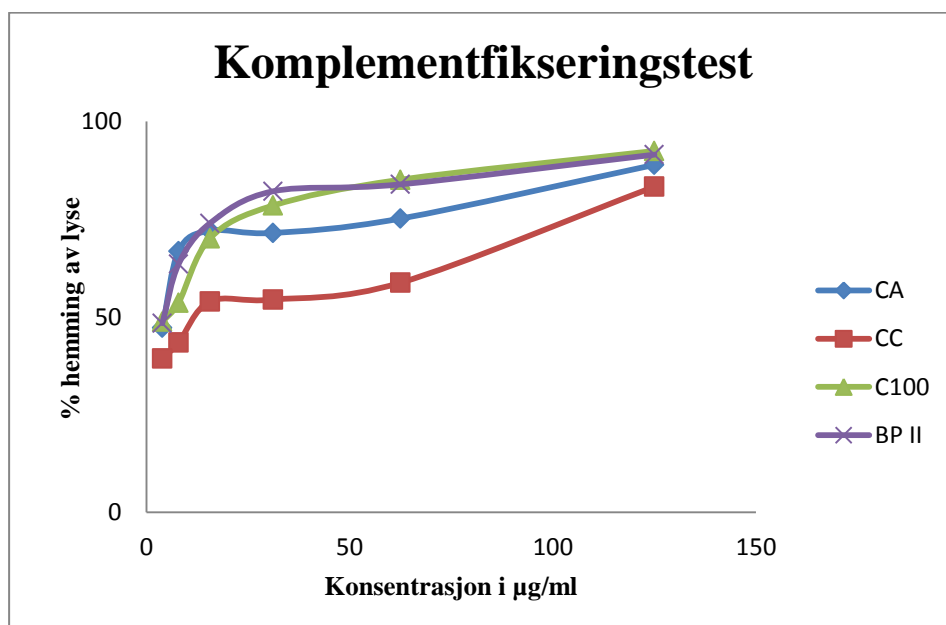
Ut i fra tabell 3-4 ser man at mengden av monosakkarider varierer i de forskjellige fraksjonene, for eksempel CA inneholder mye Ara og Gal, Dette kan forklares med at CA inneholder høyere mengder av arabinogalaktaner enn de andre fraksjonene. Rhamnose i prøvene sammen med galakturonsyre kan tyde på tilstedeværelse av områder med rhamnogalakturonaner i pektinmolekylene.

Tilstedeværelsen av 4-OMe-GlcA ble også funnet for de fleste fraksjoner etter ionebytterkromatografi, mens det var vanskelig å identifisere toppene for stoffet i kromatogrammene for de gelfiltrerte fraksjonene.

3.2.2 Aktivitet i komplementfikseringstesten

De fleste polysakkarider isolert fra tradisjonelle plantemedisiner har i få farmakologiske studier vist å være antikomplementære (Wagner, 1999). Aktiviteten måles i prosentvis hemming av hemolyse. I resultatene til testen benyttes IC_{50} verdier som måler den laveste konsentrasjonen av testsubstansen som må til for å kunne gi 50 % hemming av komplementet.

Måling av antikomplementær effekt for alle fraksjonene ble utført flere ganger, blant annet på grunn av feil fortykning av bufferløsning, manglende utstyr/stoffer på laboratorium, problemer med blod fra sau som ikke lot seg sentrifugere under prøveopparbeidelse og serum fra en annen kilde enn tidligere noe som førte til at IC_{50} verdien til standard ble høy.



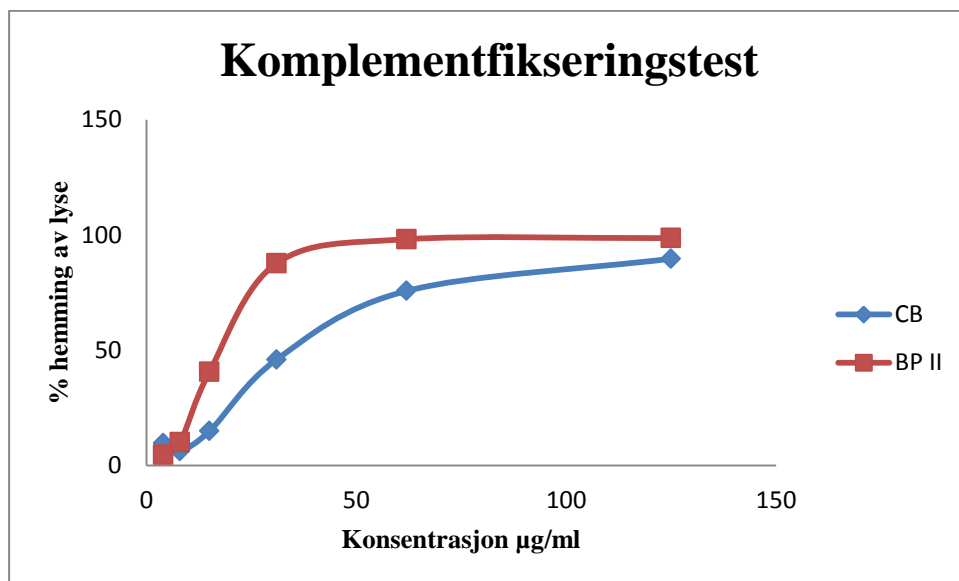
Figur 3-7. Komplementfikserende aktivitet til *C.occidentalis* ekstrahert med 50- og 100 °C destillert vann etter ionebytterkromatografi.

Ekstrakt	ICH50- verdi (µg/ml)
CA	4,7
CC	14,6
C100	4,3
BPII	3,3

Tabell 3-5. ICH-50 verdi for BPII CA, CC og C100 etter ionebytter.

Det ble bestemt å utføre komplement testen på alle fraksjonene før og etter gelfiltering. Av fraksjonene som er ekstrahert med 50 °C destillert vann var CA den mest aktive fraksjonen. Ut fra monosakkaridsammensetning inneholder CA høyest andel av Ara og Gal, som har vist å være en viktig del av arabinogalaktaner. Både AG-I og AG-II er vanlig å finne som bestanddeler i RG-I. Rhamnogalakturonan I har i flere studier som er utført på pektiner fra tradisjonelle planter vist å være viktig for den biologiske aktiviteten til polysakkaridene (Paulsen og Barsett, 2005). Bindingsforhold har ikke blitt undersøkt i og med at hele prøven ble brukt opp under gelfiltrering.

C100 har høy komplementfikserende aktivitet sammenlignet med BP II (Tabell 3-5, figur 3-7). De strukturelle forskjellene mellom fraksjonene ekstrahert med 50 og 100 °C vann er ikke så store. CA og C100 har nesten samme ICH₅₀-verdier. Dette kan skyldes mest sannsynligvis sammensetningen til RG-I som gir høy antikomplementær effekt samt spredningen i molekylvekten, se tabell 3-3.



Figur 3-8 Komplementfikserende aktivitet til CB etter ionebytterkromatografi.

Ekstrakt	ICH50-verdi (µg/ml)
CB	30,6
BP II	18,2

Tabell 3-6. ICH-50 verdi for BPII og CB.

Både CC og CB har lavere komplementfikserende aktivitet enn i forhold til BPII. For CB ble testen utført mest av alle prøvene, da resultatene var vanskelige å tolke. Det kan skyldes en feil under prøveopparbeidelsen som blant annet feil utgangskonsentrasjon eller feil fortynning av prøven. Resultatene endret seg bestandig. Tabell 3-6 og figur 3-8 viser det beste resultatet av alle forsøkene.

3.2.3 Monosakkaridsammensetning etter gelfiltrering

Tabell 3-7 viser resultater over alle opprensede fraksjoner. Ved gelfiltrering separeres makromolekylene etter deres molekylstørrelse, noe som gjør det enklere å skille høymolekylære stoffer fra lavmolekylære. Man får bedre oversikt over sukkerandelene i de forskjellige prøvene.

Sample-ID	CA1	CB1	CCI	CCII	CCIII
Ara	18,5	12,1	9,6	8,1	5,0
Rha	13,8	11,4	5,6	10,9	17,9
Fuc	2,2	0,5	1,1	0,7	0,8
Xyl	1,1	0,6	0,4	0,7	0,1
Man	2,2	0,8	2,9	0,7	n.d.
Gal	31,3	27,3	15,7	22,6	9,5
Glc	3,0	1,9	2,7	2,3	0,3
GlcA	1,9	1,4	5,5	2,0	10,8
GalA	26,0	43,8	55,9	51,1	55,6

Tabell 3-7. Monosakkaridsammensetning til *C.occidentalis* 50 °C etter gelfiltrering. Verdiene er oppgitt i prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold. n.d.= ikke detektert.

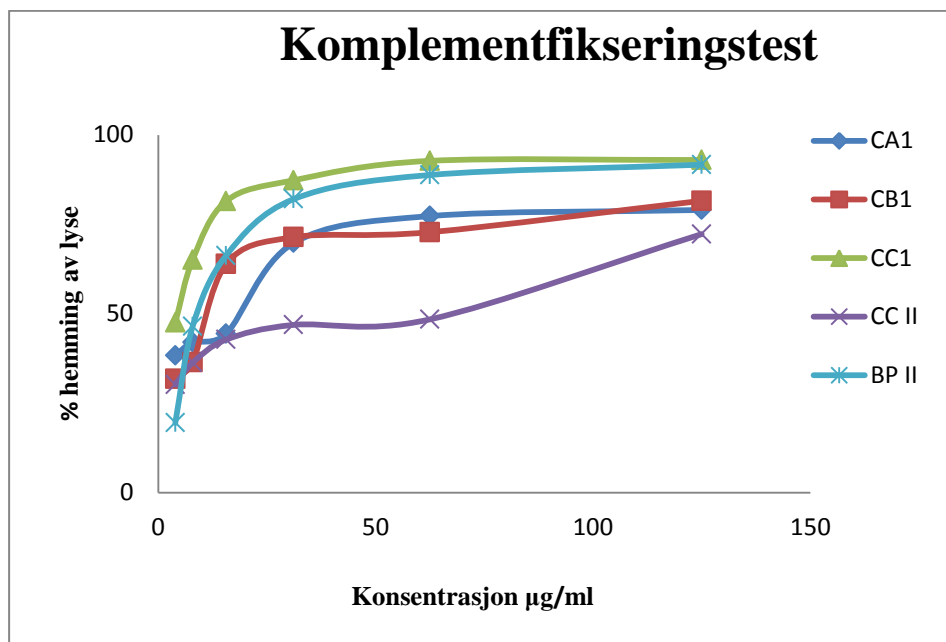
Analysen viser at alle opprensede fraksjoner inneholder relativt mye GalA, Ara og Gal. Sukkerandelen varierer i de forskjellige fraksjonene. Innhold av Ara og Gal avtar mest i CCIII. Dette kan forklares med at stoffer med høy molekylvekt elueres først ut fra kolonnen etterfulgt av lavmolekylære stoffer.

Forekomst av Rha i tillegg til GalA i de forskjellige prøvene kan tyde på innhold av rhamnogalakturonaner. Monosakkaridsammensetning for CAI før og etter gelfiltrering viste ikke store endringer. Fortsatt er andelen av Ara og Gal høy i CAI og lavere andel av GalA. Dette bekrefter at CAI inneholder forgreninger med arabinogalaktaner.

Til tross for innhold av 17.9 % Rha og 9.5 % Gal i CCIII hadde fraksjonen ingen biologisk aktivitet (se sektor 3.2.4). Det forklares med at det ikke bare er tilstedeværelse av disse monosakkaridene i prøven som er viktig for den biologiske aktiviteten men sammensetningen til monosakkaridene vil også være med for å avgjøre potensen til fraksjonen.

3.2.4 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstest ble utført på frysetørkede fraksjoner. Resultatene på fraksjoner etter gelfiltrering er vist i figur 3-9 samt tabell 3-8. Resultatene viste at aktiviteten var størst for de fraksjonene som kom først ut av kolonnen. Dette kan forklares med at fraksjoner som elueres først inneholder vanligvis høymolekylære stoffer.



Figur 3-9. Komplementfikserende aktivitet til ulike fraksjoner etter gelfiltrering.

Ekstrakt	ICH50-verdi (µg/ml)
CAI	18.7
CBI	12.5
CCI	3.5
CCII	69.3
CCIII	-
BP II	11.1

Tabell 3-8. ICH-50 verdi for BP II, CAI, CBI, CCI, CCII og CCIII.

Etter gelfiltrering har resultatene vist stor forskjell i % inhibisjon av hemolyse. For CBI og CCI viser resultatene bedre komplementfikserende aktiviteten sammenlignet med fraksjonene før gelfiltrering, som figur 3-7, 3-8 og 3-9 viser. Det kan tyde på en vellykket oppkonsentrering av sure bioaktive polysakkarider.

Aktiviteten for CA har derimot blitt lavere. Dette kan tyde på at noen aktive komponenter i ekstraktet har blitt ekskludert ved gelfiltrering. For fraksjon CCII var den biologiske aktiviteten veldig lav i forhold til BPII. Det var ikke mulig å beregne ICH₅₀ for CCIII. Dette kan skyldes at disse to sistnevnte fraksjonene inneholder lavmolekylære stoffer.

3.2.5 Bindingsforhold

For hver topp til monosakkaridet benyttes arealet under kurven (AUC). Mengden av det aktuelle monosakkaridet funnet etter metanolyse og GC ble multiplisert med forholdstallet som er blitt beregnet etter AUC til toppene. Tabell 3-9 gir en oversikt over fordelingen mellom monosakkaridene og deres bindingstyper for den gelfiltrerte fraksjonen fra *C.occidentalis*.

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i CBI etter gelfiltrering ble bestemt ved karboksylsyre-reduksjon med etterfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse. Det ble bestemt å utføre metylering på CBI-fraksjonen på grunn av den høye antikomplementæraktiviteten (se sektor 3.2.4).

Monosakkarider og bindingstypene		CBI
Ara	<i>Terminal</i>	11,5
	<i>1,2 f</i>	0,2
	<i>1,3 f</i>	0,3
	<i>1,5</i>	0,1
Rha	<i>Terminal p</i>	1,8
	<i>1,2 p</i>	7,4
	<i>1,3 p</i>	0,1
	<i>1,2,4</i>	2,1
Xyl	<i>Terminal</i>	0,6
Glc	<i>1,3</i>	1,4
	<i>1,4</i>	0,4
	<i>1,6</i>	0,1
GlcA	<i>Terminal</i>	0,9
	<i>1,4</i>	0,5
Gal	<i>Terminal f</i>	0,6
Gal	<i>Terminal p</i>	4,2
	<i>1,3 p</i>	3,9
	<i>1,6 p</i>	3,1
	<i>1,2,4 p</i>	0,6
	<i>1,3,6</i>	14,9
GalA	<i>Terminal p</i>	5,3
	<i>1,4 p</i>	38,5

Tabell 3-9. Bindingsforhold til CBI etter gelfiltrering.

Resultatene gitt i tabell 3-9 viser at CBI inneholder 3,9 % 1,3 Gal, 3,1 % 1,6 Gal, 14,9 % 1,3,6 Gal og 11,5 % terminal arabinose som er en del av arabinogalaktan type II. Det antas at fraksjonen inneholder AG-II og ikke AG-I siden fraksjonen ikke inneholder 1,4 Gal. Spormengder T-Xyl er funnet i CBI, det er mulig at denne fraksjonen inneholder mindre områder av xylogalakturonan. 38,5 % 1,4 GalA er blitt detektert i prøven, dette er hovedkjeden i pektiner.

Det er 38,5 % 1,4-GalA og 7,4 % 1,2-Rha i prøven. Dette kan tyde på at CBI inneholder områder med RG-1. 2,1 % av 1,2,4 Rha er blitt detektert i prøven som kan være tegn på innhold av forgreininger i RG-I. 1,2,4 Rha er forgreiningpunkter i C4 og noen ganger i C3 som er vanlige å finne i strukturen til RG-1 (Paulsen og Barsett, 2005).

3.3 Struktur og aktivitetsforhold- *C.occidentalis* 100 °C

3.3.1 Monosakkaridsammensetning

I likhet med prøvene etter ionebytter ble også fraksjoner fra *C.occidentalis* 100 °C vann, etter gelfiltrering, analysert på GC etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 2.5.1 og 2.5.2).

Sample.ID	C100I	C100II	C100III
Ara	17,8	11,4	2,5
Rha	2,5	4,6	8,0
Fuc	0,6	0,7	0,6
Xyl	0,5	0,8	0,6
Man	1,1	0,6	0,8
Gal	40,0	20,0	6,0
Glc	3,2	1,6	2,2
GlcA	1,7	1,9	1,5
GalA	32,7	58,1	77,4

Tabell 3-10. Monosakkaridsammensetning til *C.occidentalis* 100°C etter gelfiltrering. Verdiene er oppgitt i prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold.

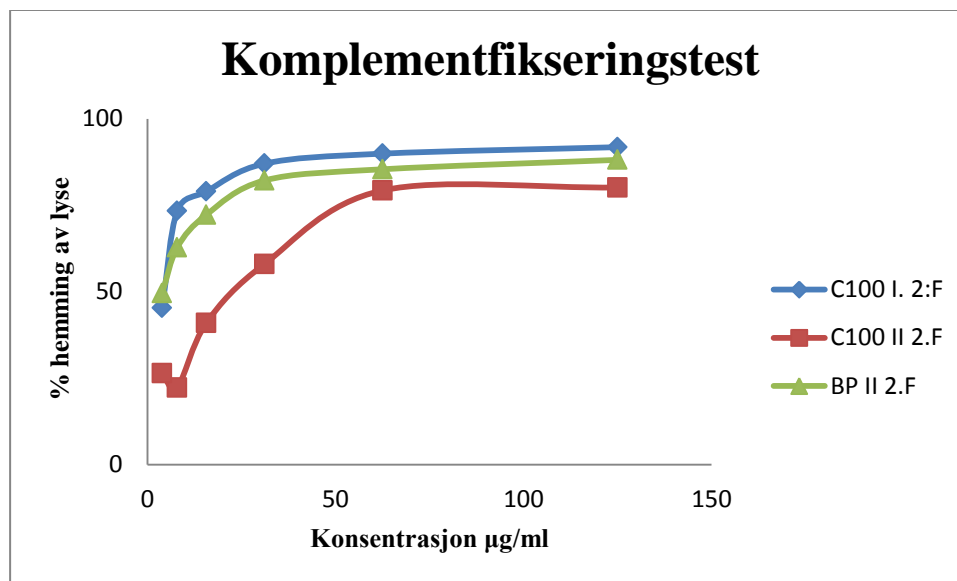
Monosakkaridsammensetningen er interessant for C100 fraksjonen etter gelfiltrering. C100I i likhet med CAI inneholder høyest andel av Gal og Ara. Det kan være fordi fraksjoner som elueres ut av kolonnen vanligvis inneholder høymolekylære forbindelser. Både arabinose og galaktose er monosakkarider som er forbundet med høy biologisk aktivitet. Samtidig vil tilstedeværelse av disse monosakkarider, Ara og Gal, tyde på innhold av arabinogalaktaner som pleier å være forgreinet i rhamnogalakturonaner.

Alle fraksjoner inneholder forskjellige mengder av GalA. Andelen av GalA er spesielt høyt i de to siste fraksjonene, dette kan indikere at C100II og C100III inneholder lange kjeder av homogalakturonaner. Forekomsten av Rha og GalA i de tre fraksjonene kan også forklares med at disse fraksjonene inneholder rhamnogalakturonaner. C100III inneholder den høyeste

andel av GalA (77.4 %), det kan indikere at fraksjonen inneholder lange kjeder med homogalakturonaner.

3.3.2 Komplementfikseringstest

Den opprensede fraksjonen fra C100 °C ble testet for komplementfikserende aktivitet. Resultatene fra komplement-testen ble sammenlignet mellom C100I 2 og 4-foldsfortynning og BP II som har høy immunologisk aktivitet.



Figur 3-10. Komplementfikserende aktivitet til C100I, C100II og BPII.

Ekstrakt	ICH50-verdi (µg/ml)
C 100I 2:F	4.1
C 100II 2:F	20.9
C 100III	-
BP II	3.2

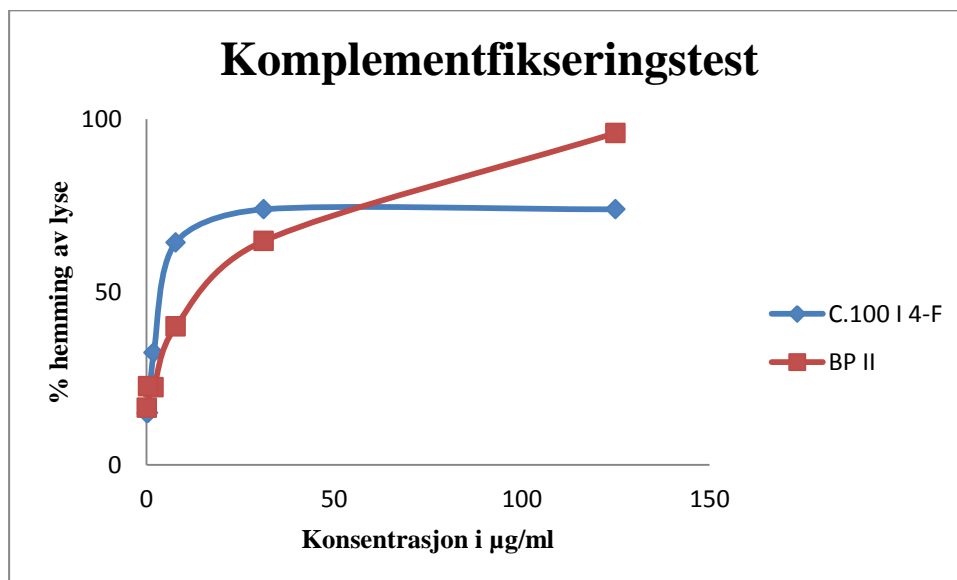
Tabell 3-11. ICH-50 verdi for 100 I, C100 II og C100 III med 2-foldsfortynning

Testen ble utført både med 2-folds og 4-folds fortynningsrekker av prøven. Det viste seg at med 2-folds fortynningsrekke var den konsentrasjonen som ga 50 % hemming av hemolyse var 3,9 µg/ml (se figur 3-10). For å få litt bedre fordelt kurv ble det bestemt å lage en 4-folds

fortynningsrekke av prøven. Aktiviteten for C100I, som figur 3-11 og tabell 3-12 viser, har høy antikomplementær aktivitet i forhold til BP II.

Ut fra monosakkaridsammensetningen viser det seg at C100I inneholder store mengder av Gal og Ara som viktige komponenter i polysakkaridene for aktiviteten av komplementsystemet. Samtidig har den høy molekylvekt som i noen studier vist å være en viktig faktor for den biologiske aktivitet (Austerheim et al, 2012). I og med at C100I hadde høy biologisk aktivitet burde den heller vært undersøkt på GC-MS istedenfor C100III.

De to andre fraksjonene, C100II og C100III, viste lav komplementfikserende aktivitet i forhold til BP II. Dette kan skyldes at de to sistnevnte fraksjonene inneholder lavmolekylære stoffer. Molekylvekten til C100II og C100III er noe lavere enn C100I som tabell 3-3 viser.



Figur 3-11. Komplementfikserende aktivitet til C100I 4-foldsfortynning etter gelfiltrering.

Ekstrakt	ICH50-verdi (µg/ml)
C.100I 4.F	5.7
BP II	9.3

Tabell 3-12. ICH-50 verdi for BP II og C100I.

Ut fra figur 3-11 og tabell 3-12 viser, C100I 4-folds fortykning høyere komplement fikserende aktivitet enn standarden BP II. I seksjon 3.3.1 er det nevnt at disse fraksjonene har noen områder med “hairy regions”, i tillegg til strukturer med arabinogalaktaner. Det er kjent at hårete områder i pektiner er viktige for biologisk aktivitet, og de har vist å aktivere den klassiske og den alternative reaksjonsveien i komplementsystemet (Paulsen og Barsett, 2005).

3.3.3 Bindingsforhold

For å bestemme hvilke bindinger som knytter monosakkaridene sammen til C100III er viktig for å kunne si noe om sammensetningen til monosakkaridene i pektinet. Dette kan oppnås ved at pektinene reduseres, metyleres, hydrolyseres og acetyleres for siden å kunne appliseres på GC-MS (metode 2.6).

Monosakkarider og bindingstypene		C100III
Ara	<i>Terminalf</i>	1,9
	<i>1,2f</i>	0,3
	<i>1,3f</i>	0,1
	<i>1,5</i>	0,2
Rha	<i>Terminal p</i>	1,4
	<i>1,2 p</i>	0,5
	<i>1,3 p</i>	2,6
	<i>1,2,4</i>	3,5
Xyl	<i>Terminal p</i>	0,2
	<i>1,4 p</i>	0,4
GlcA	<i>Terminal</i>	0,4
	<i>1,4</i>	1,8
Gal	<i>Terminalp</i>	1,7
	<i>Terminalf</i>	0,3
	<i>1,3 p</i>	0,9
	<i>1,6</i>	2,3
	<i>1,3,6</i>	0,8
GalA	<i>Terminalp</i>	7,7
	<i>1,4p</i>	69,7

Tabell 3-13. Bindingsforhold til C100III etter gelfiltrering.

Ut fra tabell 3-13 viser resultatene at C100III inneholder generelt sett mindre andeler av terminal og forgreinede polysakkarider enn i forhold til CBI (tabell 3-9). C100III inneholder 69,7 % 1,4 GalA noe som indikerer på at fraksjonene inneholder homogalakturonaner. Disse finnes ofte som lange kjeder i molekylet og utgjør den hovedkjeden i pektinet. C100III inneholder mest sannsynligvis lavmolekylære substanser. 2,2 % Glc har blitt detektert i prøven. Dette kan være en forurensning som har kommet av glassutstyret som ble brukt under prøveopparbeidelse.

C100III inneholder 3,5 % 1,2,4 Rha som kan være tegn på innhold av RG-I, men siden prøvens innhold av 1,2 Rha er så pass lav, antas det at RG-1 andelen i fraksjonene er også lav, og dermed har fraksjonen ingen biologisk aktivitet.

3.4 Struktur- og aktivitetsforhold - *Lippia chevalieri*

3.4.1 Monosakkaridsammensetning av vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* etter ionebytter

For å undersøke hvilke sukre som utgjør de forskjellige polysakkaridene, ble det valgt å bestemme monosakkaridsammensetningen til fraksjonene fra vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* ved hjelp av GC etter metanolyse og TMS-derivatisering.

Sample-ID	LA	LB	LC
Ara	20,8	3,4	3,6
Rha	4,9	5,3	0,7
Fuc	2,9	0,6	1,7
Xyl	4,0	0,8	0,6
Man	5,3	0,4	0,5
Gal	29,1	8,2	8,8
Glc	13,7	5,1	n.d.
GlcA	1,4	1,3	6,7
GalA	18,0	75,0	75,9

Tabell 3-14. Monosakkaridsammensetning til vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* etter ionebytter. Verdiene er oppgitt i prosent i forhold til totalt karbohydratinnhold. n.d. = ikke detektert.

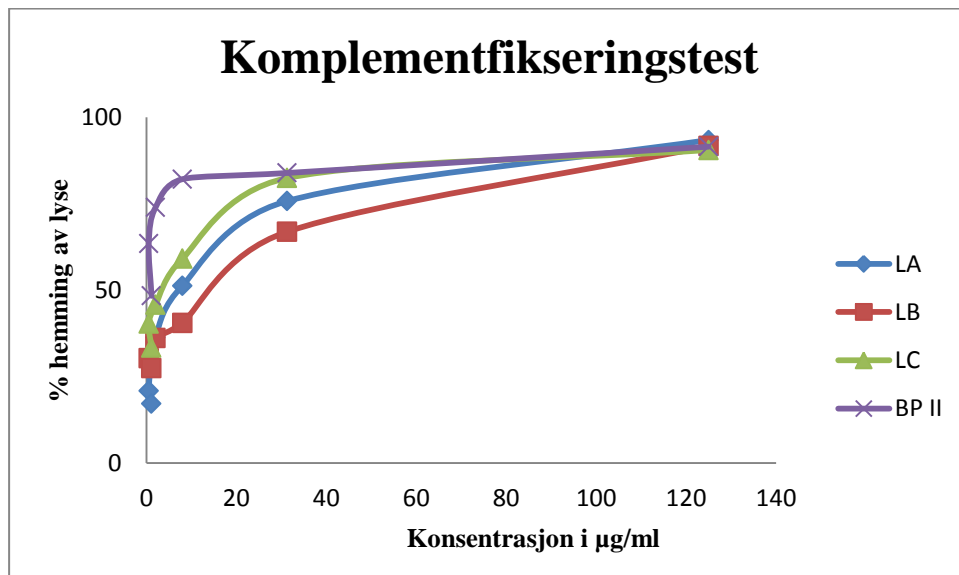
LB og LC inneholder høye mengder av GalA og andelen Gal, Ara og er mye lavere enn i LA. Dette kan forklares med at LB og LC kan inneholde høyere andel av homogalakturonaner. LC hadde høyest innhold av GalA og den hadde også høyest antikomplementæraktivitet som vist i sektor 3.4.2. Den høye andelen av Ara og Gal i LA tyder på innhold av arabinogalaktaner

LA inneholder litt Glc, noe som er uvanlig i strukturen til pektiner. Dette tyder ofte på forurensning av prøven som blant annet ikke tilstrekkelig vask av gassutstyr, men hvis innholdet er høyt kan dette indikere en faktisk tilstedeværelse av polysakkarider med glukose som xyloglukaner.

Den høye forekomsten av GalA i LA, LB og LC forklares ved at prøvene inneholder homogalakturonaner som utgjør hovedkjeden til pektinene. I tillegg til GalA ble Rha observert mest i LA og LB, noe som indikerer at fraksjonene også kan inneholde områder med rhamnogalakturonaner.

3.4.2 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Komplementfikseringstesten ble brukt for å undersøke om fraksjonene hadde biologisk aktivitet etter kjøring med ionebytter. 1 mg prøve løst i 1 ml bufferløsning av fraksjonene LA, LB og LC, ble benyttet for å teste antikomplementæraktiviten.

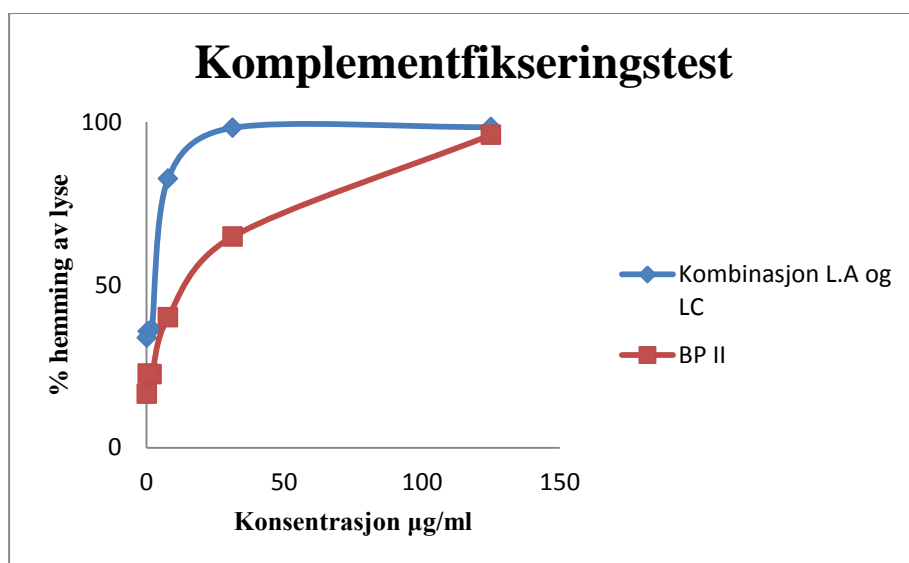


Figur 3-12. Komplementfikserende aktivitet til LA, LB, LC og BPII etter ionebytterkromatografi.

Ekstrakt	ICH50-verdi ($\mu\text{g/ml}$)
LA	4.2
LB	17.1
LC	1,6
BP II	3,3

Tabell 3-15. ICH-50 verdi for BP II, LA, LB og LC.

Resultatene viser at LC er den mest potente fraksjonen, som tyder på bedre komplementfikserende aktivitet. Resultatene er vist i figur 3-12, samt tabell 3-15. LB hadde lavere antikomplementær effekt enn de andre fraksjonene og har 10 ganger lavere antikomplementær aktivitet enn BP II. Det kan være utfordrende å sammenligne den biologiske aktiviteten mellom LB og LC, siden for eksempel fraksjonene er svært like i monosakkaridsammensetningen.



Figur 3-13. Komplementfikserende aktivitet til kombinasjon av to fraksjoner isolert fra vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* etter ionebytterkromatografi.

Ekstrakt	ICH50-verdi ($\mu\text{g/ml}$)
Kombinasjon LA og LC	1.35
BP II	10.3

Tabell 3-16. ICH-50 verdi for BP II, Kombinasjon LA og LC.

Det ble også foreslått å teste den biologiske aktiviteten til en kombinasjon av to fraksjoner av vannløselige polysakkarider etter ionebytterkromatografi. Resultatet viste at kombinasjonen av LA og LC har 7 ganger høyere antikomplementær aktivitet enn BP II. Denne biologiske aktiviteten kan som nevnt tidligere ha sammenheng med sammensetningen til “hairy regions” til pektinene som har vist å påvirke den antikomplementære effekten *in-vitro* (Wells, 2011). Begge fraksjonene inneholder Gal, Ara og GalA som er viktige deler av pektinsammensetningen.

3.4.3 Monosakkaridsammensetning etter gelfiltrering

Det ble bestemt å kjøre metanolyse på alle fraksjonene fra *L. chvalieri* etter gelfiltrering for å få en mer detaljert oversikt over innholdet av de forskjellige monosakkaridene i de opprensede fraksjonene. Tabell 3-17 viser monosakkaridsammensetningen av LAI, LBI, LBII, LCI, LCII og LCIII etter gelfiltreringen.

Sample-ID	LAI	LBI	LBII	LCI	LCII	LCIII
Ara	19,7	6,7	3,1	3,6	4,2	15,5
Rha	3,7	5,7	4,4	5,5	7,3	4,5
Fuc	0,3	0,9	1,0	1,1	1,4	3,0
Xyl	3,9	1,2	1,5	1,7	1,0	0,2
Man	6,9	2,3	0,5	2,8	0,6	1,3
Gal	35,3	19,1	0,5	15,6	7,0	3,6
Glc	7,8	4,1	4,2	8,9	15,1	6,1
GlcA	4,8	5,1	1,9	5,5	3,2	4,6
GalA	17,8	55,0	83,0	55,5	60,3	61,4

Tabell 3-17. Monosakkaridsammensetning til vannløselige polysakkarider fra *L. chevalieri* etter gelfiltrering. Verdiene er oppgitt i forhold til totalt karbohydratinnhold.

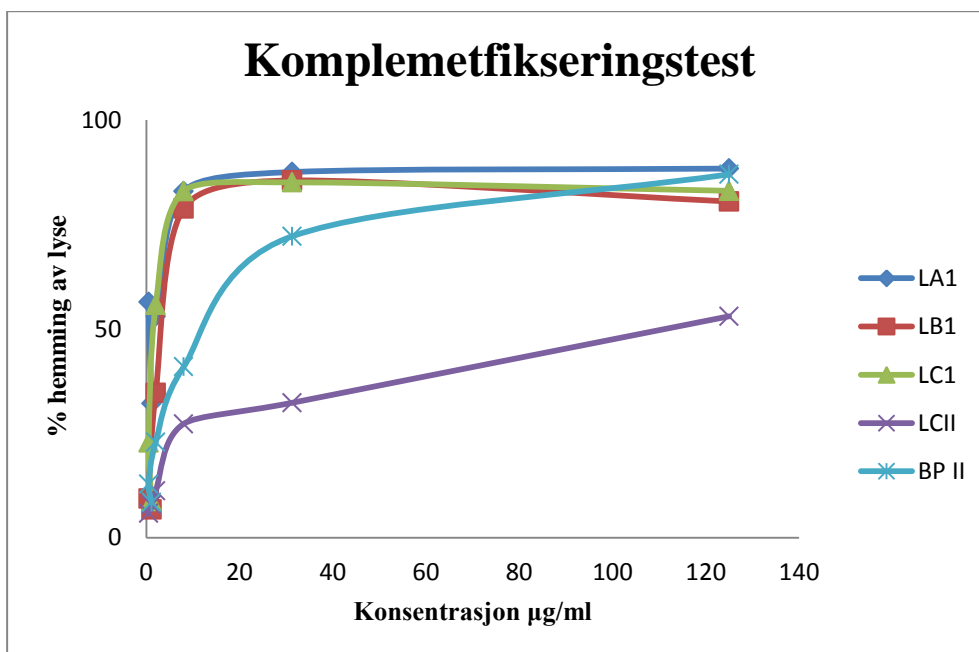
Generelt kan man si at alle fraksjoner som er vist i tabell 3-17 inneholder GalA, Rha, Ara og Gal. Disse er, som nevnt tidligere, monosakkarider som er typiske å finne i pektiner. Andelen av Gal er relativt høy i LAI, LBI og LCI. Forekomsten av Ara varierer i de forskjellige prøvene. Tilstedeværelse av Gal og Ara kan tyde på innhold av arabinogalaktaner. Her er det observert også små mengder av Glc, som omtalt tidligere, anses dette som forurensningskilde.

Forekomst av Rha i tillegg til GalA i alle disse fraksjonene kan også indikere på innhold av rhamnogalakturonaner type I. Fraksjonen LBII inneholder høyere andel GalA i forhold til innholdet av Ara, Rha og Gal. Dette indikerer at fraksjonene har flere områder med

homogalakturonan i pektinet. Xylose forekomsten i noen av fraksjonene kan tyde på innhold xylogalakturonan.

3.4.4 Aktivitet i komplementfikseringstesten

For å finne ut hvilke fraksjoner som var biologisk aktive etter gelfiltrering, ble det utført en komplementfikseringstest på fraksjoner etter ionebytter fra vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri*. Biologisk aktivitet til fraksjonene ble målt i forhold til både standarden BP II og fraksjoner etter ionebytter.



Figur 3-14. Komplementfikserende aktivitet til ulike fraksjoner etter gelfiltrering.

Ekstrakt	ICH ₅₀ -verdi (µg/ml)
LAI	0.7
LBI	4.1
LBII	-
LCI	3.1
LCII	110.8
LCIII	-
BPII	12.3

Tabell 3-18. ICH-50 verdi for BPII, LAI, LBI, LBII, LCI, LCII og LCIII.

De sure opprensede fraksjonene fra *L.chevalieri*, viste alle høyere ICH₅₀-verdi enn BP II, bortsett fra LBII, LCII og LCIII. Dette kan skyldes at de sistnevnte fraksjonene har lav molekylære stoffer og større områder av homogalakturonaner. For fraksjonene LBII og LCIII var det vanskelig å beregne ICH₅₀ da resultatene ga skjev kurve og negative tall verdier.

Tabell 3-14 og 3-18 viser at ICH₅₀-verdier for fraksjonene før og etter gelfiltrering er forskjellige. Den antikomplementære aktiviteten har økt etter opprensing av prøvene. Dette gjelder spesielt prøver med høymolekylære forbindelser. Dette kan tyde på at det er stoffer i fraksjonene fra ionebytterkromatografi som reduserer prøvenes effekt på komplement. For LAI, LBI og LCI kan den høye antikomplementære effekten skyldes, som beskrevet i innledningen, innhold av "hairy regions" med AG-II. Resultatene fra metylering (seksjon 3.4.5) viser også at de tre fraksjonene inneholder områder med RG-I og RG-II.

3.4.5 Bindingsforhold

Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i fraksjonene etter gelfiltrering (LAI, LBI, LBII, LCI, LCII, LCIII) ble bestemt ved karboksylsyre-reduksjon, med påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS analyse.

Monosakkarider og bindingstypene		LAI	LBI	LBII	LCI	LCIII
Ara	<i>Terminalf</i>	1,7	3,0	2,7	2,6	1,5
	<i>1,2f</i>	3,8	0,4	0,2	0,1	6,7
	<i>1,3f</i>	4,7	0,3	0,1	0,5	6,7
	<i>1,5f</i>	3,3	1,1	0,1	0,2	0,6
	<i>1,3,5f</i>	0,1	0,5	n.d.	0,2	n.d.
	<i>1,2,5</i>	6,1	1,4	n.d.	n.d.	n.d.
Rha	<i>Terminalp</i>	0,2	2,1	0,9	2,4	0,7
	<i>1,2</i>	1,0	1,1	1,2	2,6	2,1
	<i>1,3</i>	0,5	0,4	1,4	0,5	1,7
	<i>1,2,4</i>	1,8	2,1	0,9	n.d.	n.d.
Xyl	<i>Terminalp</i>	n.d.	1,0	1,1	1,2	0,1
	<i>1,4p</i>	3,9	0,2	0,4	0,5	0,1
Glc	<i>Terminalp</i>	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3
	<i>1,3</i>	4,0	0,3	n.d.	0,6	n.d.
	<i>1,4</i>	2,3	3,4	3,0	7,7	4,9
	<i>1,6</i>	0,5	0,2	0,4	0,3	0,9
	<i>1,4,6</i>	0,9	0,1	0,6	0,2	n.d.
GlcA	<i>Terminal</i>	1,1	1,4	1,9	1,5	0,9
	<i>1,4</i>	3,7	3,7	n.d.	4,0	3,7
Gal	<i>Terminalf</i>	0,7	0,5	0,1	0,3	0,2
	<i>Terminalp</i>	3,1	4,3	0,2	2,5	0,9
	<i>1,3p</i>	3,2	1,6	0,1	2,1	0,2
	<i>1,6p</i>	8,0	1,9	0,1	5,3	2,3
	<i>1,2,4p</i>	0,4	2,7	n.d.	1,4	n.d.
	<i>1,3,4p</i>	5,4	0,8	n.d.	2,0	n.d.
	<i>1,3,4,6</i>	0,2	0,1	n.d.	0,2	n.d.
	<i>1,3,6</i>	13,1	7,2	n.d.	1,8	n.d.
<i>1,4,6</i>	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
GalA	<i>Terminalp</i>	10,4	7,5	3,5	12,0	3,9
	<i>1,4p</i>	7,4	35,0	74,5	37,6	47,4
	<i>1,3,4p</i>	n.d.	11,5	5,0	5,9	10,1

Tabell 3-19. Bindingsforhold til alle fraksjonene isolert fra *L.chevalieri* etter gelfiltrering. n.d. = ikke detektert.

Alle fraksjonene inneholder terminal Ara, terminal Rha, og 1,3 Rha som kan være bundet i RG-II. Rhamnogalakturonan-II består av en kjede med 1,4 GalA og 1,3,4 GalA, hvor terminal arabinose og rhamnose kan være bundet i forgreningspunktene. LAI, LBI og LCIs innhold av 1,4 GalA og 1,3,4 Gal, tyder på tilstedeværelse av RG-II, LBII inneholder 74,5 % av 1,4 GalA enhetene noe som indikerer at strukturen har betydelige områder med homogalakturonan.

AG-II kan være bundet til enten 1,3 Gal eller 1,6 Gal, (Paulsen og Barsett, 2005). Fraksjonene inneholder varierende mengde av de forskjellige sukkerenheter som er typiske å finne i AG-II, noe som kan tyde på at rensede vannløselige polysakkarider fra *L.chevalieri* er rike på sidekjeder med AG-II. Tabell 5-19 viser at tillegg til innhold av 1,3 Gal og 1,6 Gal, er også terminal- og 1,5 Ara og 1,3,6 Gal blitt detektert i flere prøver blant annet inneholder LAI 1,7 % av T-Ara og 3,3 % av 1,5-Ara mens LBI inneholder 3,0 % T-Ara og 1,1% 1,5 Ara. Disse monosakkaridene er også typiske å finne i strukturen til AG-II.

AG-I er bygget opp av en stamme bestående av β -1,4-bundet galaktan, med sidekjeder av arabinaner som er bundet gjennom C3 posisjon i RG-I (Paulsen og Barsett, 2005). 1,4 Gal ble ikke observert i noen av prøvene noe som tyder på fravær av AG-I.

1,3,4 Rha som har også blitt observert i LAI og LBI. Denne forgreiningen er vanlig å finne i strukturen til RG-I. Hårete områder fra RG-I og RG-II har vist seg å påvirke både den klassiske og den alternative aktiveringsveien i humant komplementsystem (Yamada og Kiyohara 1999). LAI, LBI og LCI viste høy antikomplementær effekt ved komplementfikseringstesten (seksjon 3.4.4).

Fraksjonene inneholder spormengder av T-Glc og større andeler 1,4-bundet glukose. Dette er sannsynligvis forurensninger som kommer fra stivelse. En annen forklaring på innhold av 1,4 Glc samt T-Xyl i LAI fraksjonen er at denne fraksjonen inneholder xyloglukaner i sin struktur. Terminal Xyl sitter som regel i sidekjeder eller direkte ved forgreningspunkter av GalA.

LBII og LCIII ser ut til å inneholde lavmolekylære stoffer. De hadde lav eller ingen antikompletær effekt, se tabell 3-18. Den høye forekomsten av terminal GalA i disse fraksjonene kan bekrefte denne teorien (tabell 3-19).

3.5 Strukturoppklaring etter enzymatisk degradering

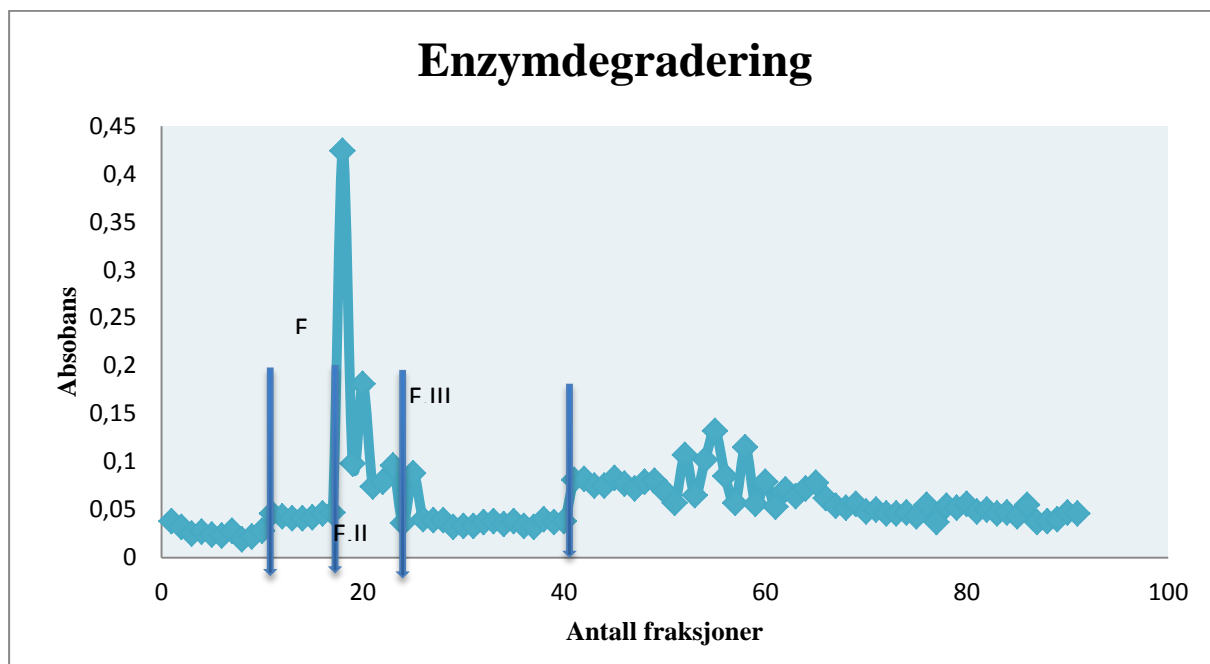
3.5.1 Enzymdegradering

Det ble bestemt for polymeren LBI med høyt innhold av 1-4 koblede galakturonsyre å enzymdegradere den med endo- α -d-(1-4)-polygalakturonase. Etter enzymatisk degradering med Endo-polygalakturonidase ble 1,4-GalA bindinger degradert ved å katalysere hydrolyse av glykosidbindinger som binder sammen galakturonsyre enheter. For å kunne følge den enzymatiske degraderingen, ble prøven testet for reduserende endegrupper. Dette ble utført ved hjelp av en fargeforandring i DNS-løsning, se metode 4-8. Etter 28 timer, stoppet nydannelsen av reduserende endegrupper opp.

På satt mengde av LBI	Utbytte i mg	Utbytte i %
25 mg	1,5	6

Tbell 3-20 viser utbytte til fraksjon I i mg og % etter enzymdegradering

Etter enzymatisk degradering ble prøveløsningen fra LBI applisert på biogel P-30 kolonne for å få separert de store pektinområdene. Prøven ble deretter eluert ut i en fraksjonssamler med destillert vann. Fenolsvovelsyretesten (metode 2.4.1) ble benyttet for å bestemme innholdet av karbohydrat i eluatene fra de ulike ekstraktene, og deretter fraksjonere eluatene slik vist på figur 3.21. Fraksjonen ble oppkonsentrert, frysetørket og tatt videre til monosakkaridbestemmelse, metanolyse og komplementfikseringstest. Fraksjonen ble kalt for Fraksjon I og utbytte vises i tabell 3-20.



Figur 3-15. Elueringsprofil etter enzymatiskdegradering av LBI på Bio-gel P 30.

Det ble bestemt å fortsette med Fraksjon I siden de to andre fraksjonene, Fraksjon II og Fraksjon III, som skulle samles opp, frysetørkes og brukes videre hadde et veldig lavt utbytte (se figur 3-15). Frysetørkede stoffer kunne ikke veies eller tas ut fra rundkolben som ble brukt under prøveopparbeidelsen.

3.5.2 Monosakkaridsammensetning

25 mg av LBI ble enzymdegradert. Kun fraksjon I har blitt undersøkt med gaskromatografi etter metanalyse og TMS-derivatisering (metode 2.5).

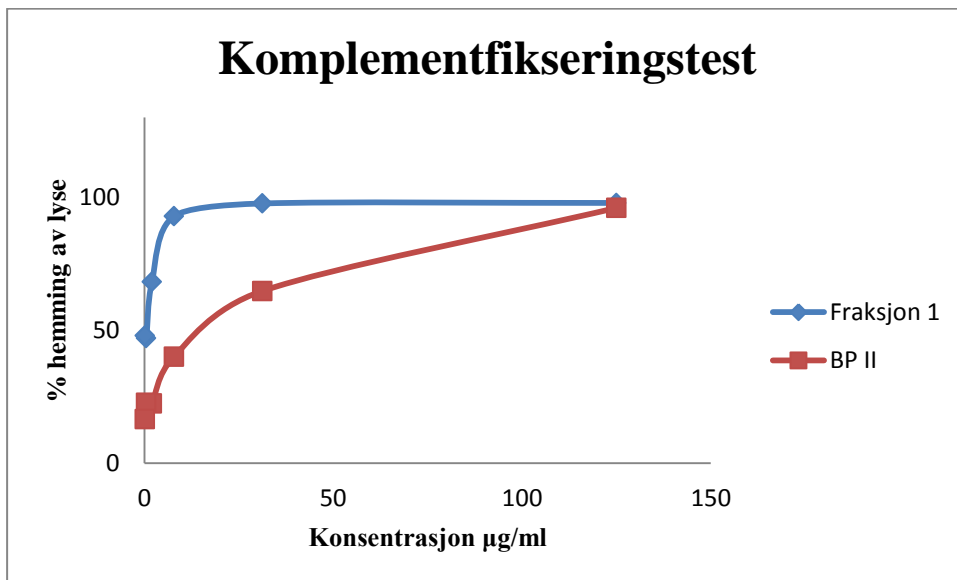
Sample-ID	Fraksjon I
Ara	9.0
Rha	7.9
Fuc	2.6
Xyl	1.9
Man	8.3
Gal	19.3
Glc	8.0
GlcA	7.6
GalA	35.6

Tabell 3-21. Monosakkaridsammensetning til Fraksjon I. Verdiene er oppgitt i prosent i forhold til totalt karbohydratinhold.

Tabell 3-21 viser monosakkaridsammensetningen etter at LBI ble enzymdegradert. Fraksjon I inneholder 9 % Ara og 19.3 % Gal, dette indikerer på at fraksjonen inneholder områder med arabinogalaktaner. Av de andre monosakkaridene har Rha og GalA blitt detektert i prøven. Dette kan være områder med rhamnogalakturonaner. Komplementaktiviteten var høyest i denne fraksjonen.

3.5.3 Aktivitet i komplementfikseringstesten

Den enzymdegraderte fraksjonen fra LBI ble testet med komplementfikseringstesten (metode 2.7). Fraksjon I viste høyest aktivitet av alle de andre fraksjonene som er testet før og etter gelfiltrering.



Figur 3-16. Komplementfikserende aktivitet til Fraksjon I.

Ekstrakt	ICH50-verdi (µg/ml)
Fraksjon I	0,3
BP II	6,3

Tabell 3-22. ICH-50 verdi for BP II og Fraksjon I

Fraksjon I var 21 ganger så aktiv som den positive kontrollen. Det ser ut til at jo større tetthet av rhamifiserte område desto større effekt har pektinet til å påvirke komplementaktiviteten.

Etter enzymdegradering viste fraksjon I høyest antikomplementær effekt. Det tyder på at homogalakturonan-området trenger ikke å være tilstede for optimal aktivitet. Flere studier gjort på pektiner viser at forgrenede områder isolert ved enzymdegradering har mer potente komplementfikserende aktivitet enn de native pektinene (Yamada og Kiyohara, 2007).

Det var ikke mulig å regne ut molekylvekten for denne fraksjonen, men det antas at høymolekylære stoffer elueres først ut fra kolonnen. Den høye aktiviteten til Fraksjon I kan være på grunn av høy molekylvekt samt monosakkaridsammensetning. Tilstedeværelse av Gal, Rha, Ara og GalA har i flere forsøk vist å påvirke komplement aktiviteten.

3.5.4 Bindingsforhold

Pektiner er store molekyler, og for å kunne få mer informasjon om struktur og aktivitetsforhold må man degradere pektinet enzymatisk. Man kan da isolere de forgrenede områdene, for så å bestemme bindingstypen mellom de respektive monosakkaridene. Bindingsforholdene mellom monosakkaridene i den enzymatisk degraderte polysakkaridfraksjonen ble bestemt ved karboksylsyrreduksjon og påfølgende metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse (metode 2.6).

Monosakkarider og bindingstypene		Fraksjon I
Ara	<i>Terminalf</i>	1,9
	<i>1,2f</i>	0,7
	<i>1,3f</i>	0,6
	<i>1,5</i>	2,3
	<i>1,2,5</i>	3,5
Rha	<i>Terminalp</i>	3,0
	<i>1,2p</i>	1,1
	<i>1,3p</i>	2,2
	<i>1,2,4</i>	1,6
Xyl	<i>Terminalp</i>	1,5
	<i>1,4 p</i>	0,4
Glc	<i>Terminal</i>	1,1
	<i>1,3</i>	6,4
	<i>1,4</i>	0,2
	<i>1,6</i>	0,3
GlcA	<i>Terminal</i>	0,9
	<i>1,4</i>	6,7
Gal	<i>Terminalf</i>	2,1
Gal	<i>Terminalp</i>	0,1
	<i>1,3p</i>	1,5
	<i>1,6p</i>	1,0
	<i>1,2,4p</i>	0,2
	<i>1,3,6</i>	13,2
	<i>1,3,4,6</i>	1,2
GalA	<i>1,4 p</i>	33,5
	<i>1,3,4 p</i>	2,1

Tabell 3-23. Bindingsforhold til fraksjonen I.

1,3-Gal, 1,6-Gal og 1,3,6-Gal ble detektert i Fraksjon I. Disse sakkaridenhetene er, som nevnt tidligere, en del av AG-II. Samtidig vil innhold av 2,1 % 1,3,4-GalA, 3,1 % T-Rha og 2,2 % 1,3-Rha tyder på at polysakkaridene inneholder RG-II.

Resultatene fra tabell 3-23 viser også at fraksjonen inneholder 1,1 % av 1,2 Rha som utgjør sammen med GalA hovedstrukturen til RG-I. 1,2,4 Rha-innhold indikerer på at fraksjonen inneholder forgreininger i områder med RG-I. Det antas at andelen av RG-I er lav i og med at mengden av 1,2 og 1,2,4 Rha er begrenset.

T-xylose har blitt detektert både før og etter enzymdegradering. Det indikerer at xylogalakturonaner er tilstede både i LBI og Fraksjon I. Det har ikke blitt observert 1,4-Gal og heller ikke 1,3,4 Gal i Fraksjon I. Det kan være fordi Fraksjon I ikke inneholder AG-I, men kun AG-II.

4 Konklusjon

Målet med oppgaven var å utføre struktur- og aktivitetsstudier på polysakkarider isolert fra bladene til *C.occidentalis* og vannløselige polysakkarider fra bladene til *L.chevalieri*.

Polysakkaridene som var isolert av Mei Gi Cheung skulle undersøkes med hensyn til karbohydratinnhold og struktur og deretter teste den biologiske aktiviteten til ræktraktene relatert til immunsystemet. Til slutt gjennomføre enzymdegradering på fraksjoner som hadde høy antikomplementær effekt.

Basert på resultatene fra metanolysen og bindingsforhold viste analysen innhold av vanlige pektinstrukturer som AG-II, RG-I, RG-II og HG. Alle prøver som ble kjørt gjennom ionebytter inneholdt en stor andel av terminale polysakkarider, noe som tyder på en høy andel forgrenede pektiner i fraksjonene. Det ble blant annet observert at alle prøvene inneholdt betydelige mengder homogalakturonan som er sammensatt av 1,4 GalA enheter. 1,4 GalA enheter. Innholdet av arabinose, rhamnose, galaktose og galakturonsyre ble også detektert i alle fraksjonene isolert fra *C.occidentalis* og *L.chevalieri*. 1,4 Gal ble ikke detektert i noen av test-fraksjonene, noe som tyder på at disse fraksjonene fra begge plantene ikke inneholder AG-I men kun AG-II i sine strukturer.

Noen fraksjoner isolert fra *L.chevalieri* blant annet LC inneholdt glukose, dette kan være forurensning fra stivelse eller at fraksjonen inneholdt xyloglukaner i sin struktur som ikke har mye å si for den biologiske aktiviteten. Alle fraksjonene som har blitt metylert viste innhold av 1,2-Rha og 1,4-GalA, som utgjør ryggraden til RG-I. Andelen av Ara og Gal varierte i disse fraksjonene.

Fraksjonene med den høyeste andel av disse monosakkaridene, Ara og Gal, hadde høy molekylvekt samt høy antikomplementær effekt. Disse fraksjonene var CA, CAI, LA, LAI, C100, C100I og Fraksjon I. Av disse fraksjonene var Fraksjon I den mest potente fraksjonen. Komplementfikseringstest ble utført på alle fraksjoner både før og etter gelfiltrering. Aktiviteten til de fleste fraksjonene fra *L.chevalieri* økte betydelig etter gelfiltrering noe som ikke var tilfelle for noen fraksjoner fra *C.occidentalis* som CA.

Den enzymatiskdegraderte fraksjonen fra LBI inneholdt Gal, Ara, Rha og GalA som er typiske bindinger i arabinogalaktaner og rhamnogalakturonaner. Resultatene fra komplementfikseringstesten til LBI som ble enzymdegradert viste oppgang på den antikomplementære effekten.

Undersøkelsen på bindingsforholdene til Fraksjon I viste innhold av 1,3,6 Gal samt 1,3- og 1,6 Gal som er en viktig del av RG-II. 1,2 Rha og 1,4 GalA har også blitt observert i fraksjonen, noe som indikerer på tilstedeværelse av RG-I. Både RGI, AG-II og RG-II er viktige deler av pektinssammensetning for å aktivere komplementsystemet (Paulsen og Barsett, 2005). Innhold av Gal, Rha GalA og Ara indikerer tilstedeværelse av viktige elementer i pektiner forbundet med høy antikomplementær effekt.

5 Reagensliste

1 metyl-imidazol: Fluka

37 % saltsyre: VWR

Agarose: Bio-rad laboratories

Ammoniakk (NH₃): Prolabo

Antistoff (Virion 9020 amboceptor): Kanin

Bovint serum albumin: Sigma Aldrich

Biophytum petersianum, BPII

Carbodiimide: Sigma Aldrich

Diklormetan (DKM): Sigma Aldrich

Diatomaceous Earth Dimetylsulfoksid (DMSO): Merck

Eddiksyre (CH₃COOH)

Eddiksyreanhydrid: Merck

Etanol (CH₃CH₂OH): Fischer Chemicals

Fenol: Merck

Fosfat bufret Salin (PBS): Sigma Aldrich

Heksan: Fischer Chemicals

Human serum: ECG, tappet 18.12.2013

Iseddik: Merck

Kloroform (CHCl₃)

Konsentrert saltsyre (HCl)

MES: Sigma Aldrich

Metanol: Fischer Chemicals

Metyljodid: Fluka

Natriumacetat: Merck

Natriumazid: Merck

Natriumbordeuterid (NaBD_4): Sigma Aldrich

Natriumhydroksid (NaOH): Merck

Natriumklorid (NaCl): VWR Chemicals

Natruimthiosulfat-5-hydrat: Merck

Sølvnitrat (AgNO_3): Merck

TMS-reagens: Merck

Toluen: VWR

Trifluoreddiksyre (TFA): Pierce, PERBIO

TRIZMA: Sigma

Litteraturliste

Aragao, T., *Et al.*, (2009). Toxicological reproductive study of *Cassia occidentalis* L. in female Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* **1**, 163-166.

Austarheim, I., Christensen, B. E., Hegna, I. K *Et al.*; (2012). Chemical and biological characterization of pectin-like polysaccharides from the bark of the Malian medicinal tree *Cola cordifolia*. *Carbohydrate Polymers.* **1**, 259- 268.

Bangou, M. J., (2012). *Lippia chevalieri* Moldenke: A brief review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *American Journal of Drug Delivery.* **3** 289-296.

BioNET-EAFRINET-Keys and Fact Sheets, (2011). “*Senna occidentalis* (Coffee Senna)”, URL:[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Senna_occidentalis_\(Coffee_Senna\).htm](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/weeds/key/weeds/Media/Html/Senna_occidentalis_(Coffee_Senna).htm) aksessert 15.1.2014

Blystad, H., (2014), Folkehelseinstitute Malaria, URL:http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=239&trg=Content_6493&Main_6157=6287:0:25,5499&MainContent_6287=6493:0:25,6833&Content_6493=6441:82817::0:6446:77:::0:0 aksessert 20.05.2014

Bora, S. N., Purushottam J. og Bora. P. S., (2008). Department of Ophthalmology, Jones Eye Institute, University of Arkansas for Medical Sciences The role of complement in ocular pathology URL:<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00281-008-0110-y/fulltext.html> aksessert: 20.07.2014

Chambers, R., Clamp, J., (1971). An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal*, **125**, 1009.

Ciucanu, I. og Kerek, F., (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research.* **131**, 209-217.

Cui, S.W., (2005). Food carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications. Taylor and Francis Group. 2-36, 51-78, 108-124.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry.* **28**, 350- 356.

Fry, S. C., (1988). The structure and functions of xyloglucan, *Department of Botany. University of Edinburgh* **40**, 1-11.

GE Healthcare (2011) ANX Sepharose 4 Fast Flow (High sub),
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/nb/GELifeSciences-no/17128704> Aksessert 06.05.2014

Glæserud, S. (2008) Immunmodulerende polysakkarider isolert fra en sårhelende plante fra Mali. Oslo, *Universitet i Oslo*.

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

Hansen, B. L., Hansen, G. N., Thomsen, A. R., *Immunsystemet vort indre forsvar* (1999) G.E.C Gads forlag København J.P Damm & Søn ApS, Randers. 3 utgave s. 42-57.

Kim, J. B. og Carpita, N. C., (1992). "Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles." *Plant Physiology*. **2**, 2646-653.

Malaria consortium, (2012). URL: http://www.malariaconsortium.org/pages/about_malaria.htm
aksessert: 18.02.2104

Meskini, S., (2011). "Kjemisk og biologisk karakterisering av polysakkarider fra ville og kultiverte røtter fra *Vernonia kotschyana*, Etnofarmakologiske studier i Mali", *Universitetet i Oslo*.

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

Mohnen D., (2008). Current opinion in plant biologi, Pectin structure and biosynthesis URL;
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526608000630> aksessert 28.06.2014

National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2012), Malaia URL:
<http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx> aksessert 17.07.2014

NIAID (National Institutes of Allergy and Infectious Diseases), (2012), "Malaria" (Life cycle of the Malaria Parasite), URL: <http://www.niaid.nih.gov/topics/malaria/pages/lifecycle.aspx>, aksessert 13.04.2014

Oetjen, G.W. (1999). Freeze drying. Weinheim: Wiley VCH Verlag s. 1-3

Ohrt, C., Willingmyre, D. W., Lee, P., *Et al.*, (2002), Assessment of Azithromycin in Combination with Other Antimalarial Drugs against Plasmodium falciparum In Vitro, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**, 2518-2524.

Paulsen, B. S., Barsett, H. (2005). Polysaccharides I, Structure, Characterization and Use", Bioactive pectic polysaccharides Polysaccharides, Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Paulsen, B.S., Barsett, H., (2005), "*Polysaccharides I, Structure, Characterization and Use*", Bioactive Pectic Polysaccharides, Springer-Verlag Berlin Heidelberg **186**, 69-101.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., (2004). Legemiddelanalyse, Gasskromatografi: Fagbokforlaget, 2. Utgave, Vigmostad & Bjørke AS, s. 216.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., (2010). Legemiddelanalyse, Bergen: Fagbokforlaget, 2. utgave kap. 17 s. 200-218, s .300-302.

Petersen, E., Kurtzhals, J., David, K., (2014). Midler mot malaria URL <http://pro.medicin.dk/Laegemiddelgrupper/Grupper/253000> aksessert: 02.03.2014

Sadiq, S., Shuaibu, M., Bello, A. B., *Et al.*, (2012). Journale of Chemical Engineering, Phytochemistry and Antimicrobial Activities of Cassia Occidentalis Used for Herbal Remedies. **1**, 38-41.

Scheller, H. V., Ulskov, P. (2010). Hemicelluloses. Annual Review of Plant Biology, 61 (1), 263–89. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315

Schols, H. A., Voragen, A. G. J., (2002). "Pectins and their Manipulation", The chemical structure of pectins, Blackwell Publishing, CRC press, Oxford, s 222-239.

Sveaas, A., (2007). Immunmodulerende polysakkarider isolert fra Biophytum petersianum Klotzsch. Etnofarmakologiske studier i Mali, *Universitetet i Oslo*: s 56.

Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W. (1963). Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivates of Sugars and Related Substances. *Journal of the American Chemical Society*. **85**, 2497-2507.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Cell Walls: Structure, Biogenesis and Expansion. Plant Physiology, Sinauer Associates Inc. Publishers, Massachusetts, s.312-337.

Talmadge. K., Keegstra, K, *Et al.*, (1973). The Structure og Plant Cell Walls URL: <http://www.plantphysiol.org/content/51/1/158.full.pdf+html> aksessert: 22.05.2014

Taylor, L. N., (2005), The Healing Power of Rainforest Herbs, Tropical plant database, *C. occidentalis* URL: http://www.rain-tree.com/fedegosa.htm#U3i5Aa1_sSg aksessert 10.05.2014

The Global Biodiversity Information Facility, (2013) “*Classification of Species: Lippia chevalieri Moldenke*”, URL:<http://data.gbif.org/species/browse/taxon/4085380?qs=Lippia%20chevalierii> aksessert 16.06.2014

The university of Georgia, (2007). Plant Cell Walls, URL: http://www.uea.ac.uk/menu/acad_depts/cap/carbohydrate/projects/RGII.htm aksessert 20.06.2014

USDA (United States Department of Agriculture), (2013). “*Plants Profile- Senna occidentalis (L.) Link*”, URL: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SEOC2> aksessert 04.05.2014

Verma, L., Singour, P. K., Chaurasiya, P. K., *Et al.*, (2010). Effect of ethanolic extract of *Cassia occidentalis* Linn. for the management of alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Resarch*, **3**, 132–137.

Wang, I. C., Liangzhi, X., *ET al.*, (2007). Sino Biological Inc, URL:<http://www.sinobiological.com/Complement-Activation-Pathways-a-1511.html> aksessert 01.02.2014

Wanger, H. (1999), Immunmodulatore Agents from plants, Institut for farmasøytisk biologi, Munchen, s.161-175, 175-184.

Wells. T. NC., (2011). Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots?, *Malaria Journal*, **10**, 1-3.

White, N. J., Med, N. E. J., (1996), The Treatment of Malaria, *The New England Journal of Medicine*, **335**, 800-806.

Wikipedia. (2014). *Cell Wall*. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Cell_wall#Plant_c aksessert 14.04.2014

Wikispaces. (2013) Lab Conceptes Df. URL: <https://ehumanbiofield.wikispaces.com> aksessert 24.08.2014

Willcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, P., (2004). “Traditional medicinal plants and malaria”, CRC Press LLC, Florida. s.134-149.

Yamada, H., Kiyohara, H., (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. Immunomodulatory agents from plants. Birkhäuser, Basel, 161

Yamada, H., Kiyohara, H., (2007). "Immunomodulating Activity of Plant Polysaccharide Structures" *Comprehensive Glycoscience: from Chemistry to Systems Biology*, Elsevier Ltd. 4, 667-671