

# Pektiner og polyfenoler fra svarthyll (*Sambucus nigra* L.) med potensielle helseeffekter

Giang Thanh Thi Ho  
Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo  
E-post: [g.t.t.ho@farmasi.uio.no](mailto:g.t.t.ho@farmasi.uio.no)

## TITTEL

Bioactive compounds in flowers and fruits of *Sambucus nigra* L.

## VEILEDERE

Hilde Barsett og Helle Wangenstein, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, og samarbeidspartner Eili Tranheim Kase, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

## FORSVAR AV OPPGAVEN

2017, vår

## HOVEDBUDSKAP

Isolerte pektiner fra svarthyllbær og svarthyllblomst viste i våre forsøk effekt både på det medfødte og det ervervede immunsystemet.

Svarthyllbær og svarthyllblomst med høyt innhold av polyfenoler kan ha en gunstig effekt på glukose- og fettmetabolismen, samt hemme karbohydratspaltende enzymer i tarmen.

## BAKGRUNN OG HENSIKT

Inntak av plantemat er assosiert med helsegunstige effekter som å styrke immunforsvaret og begrense utvikling av livsstilssykdommer som blant annet diabetes (1). Svarthyll (*Sambucus nigra* L.) er en stor busk eller et lite tre som kan bli opp til 10 meter høyt, med gulhvite blomster og blåsvarte bær. I folkemedisinen er både blomstene og saften fra bærene blitt brukt mot diabetes, infeksjoner, forkjølelse og influensa (1). I dag brukes svarthyllbærekstrakt blant annet som kosttilskudd ved forkjølelse, mens uttrekk av svarthyllblomst brukes både som aromatisk juice eller saft, og som plantebasert legemid-

del (1). Svarthyll inneholder ulike typer polyfenoler; bærene er rike på flavonoider av type antocyaniner som gir bærene en blåsvart farge, mens blomstene er rike på flavonoler. Både blomst og bær inneholder en del klorogensyre og kaffesyre. Flavonoider og andre polyfenoler fra svarthyll har begrenset absorpsjon fra tarmen, men kan omdannes ved hjelp av tarmbakterier til metabolitter (enkler fenoliske substanser) som lettere tas opp. De høymolekylære pektinene i svarthyll er i mindre grad studert. Pektiner er sure polysakkarider som finnes i plantecelleveggen kjent blant annet for sin fibereffekt på mage/tarm, og har vist å kunne påvirke immunsystemet.

Det er fortsatt mye vi ikke vet om pektiner, polyfenoler og metabolitter fra svarthyll og deres rolle i behandling eller forebygging av infeksjoner og inflammatoriske sykdommer. Hensikten med dette doktorgradsprosjektet var å undersøke den potensielle helseeffekten av svarthyllbær og svarthyllblomst med hovedfokus på immunmodulerende og anti-diabeteseffekter av pektiner og fenoliske substanser.

## MATERIALER OG METODER

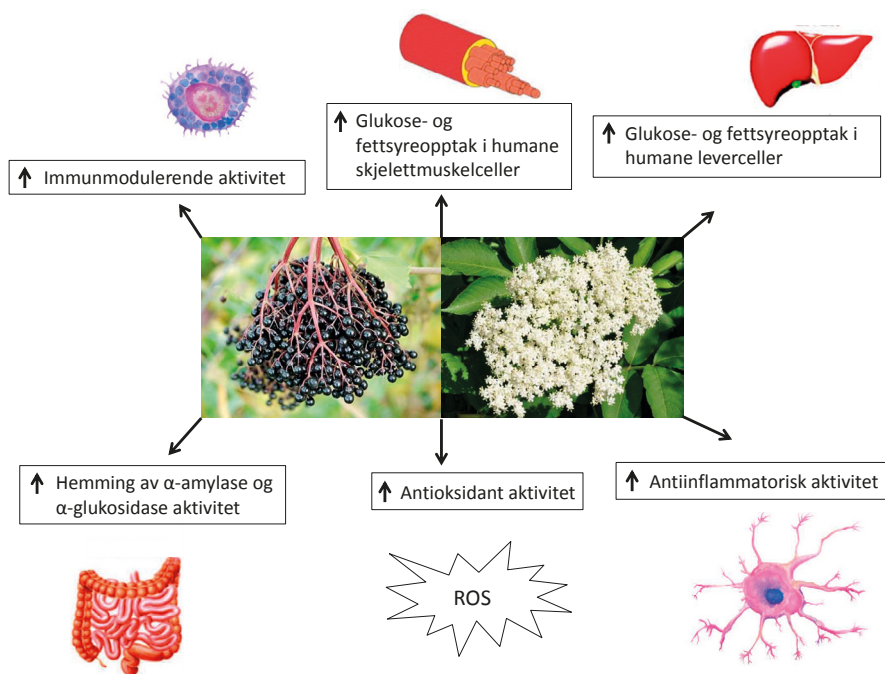
Svarthyllbær som ble benyttet i dette prosjektet var fra kultivaren *Sambucus nigra* Sampo, høstet i Fresvik i Sogn. Tørkede svarthyllblomster ble kjøpt på Bondens marked i Oslo. Både svarthyllbær og svarthyllblomst ble ekstrahert med diklorometan, etanol og vann for å skille polysakkaridene fra polyfenolene. Vannekstraktene inneholder mer høymolekylære forbindelser som pektiner, mens alkoholekstraktene inneholder de lavmolekylære forbindelsene som polyfenoler. Kolonnekromatografi ble brukt til opprensning av ekstraktene, mens NMR spektroskopi, GC-MS, GC-FID og/eller HPLC analyse ble brukt til å identifisere polyfenolene og pektinene. Humane skjeltmuskulceller og leverceller ble benyttet til å studere glukose- og fettstofferopptak. Hemming av karbohydratspaltende enzymer ble studert. Makrofager og dendritiske celler ble benyttet i antiinflammatoriske og immunmodulerende studier. Komplementtesten ble utført med røde blodlegemer fra sau (SRBC), antistoffer mot SRBC fra kanin og komplementkilde fra humant serum, også for å studere immunmodulerende

effekt. Antioksidanteffekt ble studert med radikalfangertest og ved å se på evnen til å hemme enzymer som genererer frie radikaler.

## RESULTATER OG DISKUSJON

**Pektiner fra svarthyllbær og svarthyllblomst med immunmodulerende aktivitet:** Resultatene for GC og GC-MS viste at polysakkaridfraksjonene som ble isolert fra 50 prosent etanolekstrakt og vannekstraktene fra svarthyllbær og svarthyllblomst inneholdt monosakkarider og bindingsforhold som er typiske for pektiner. De isolerte polysakkaridfraksjonene bestod av både nøytrale sukkerer som arabinose, rhamnose, galaktose, xylose, glukose og mannose og sure sukkerer som glukuronsyre og galakturonsyre (2, 3). Pektinene fra svarthyllbær bestod av en lang hovedkjede kalt homogalakturonan eller det «glatte området» som er galakturonanregioner bestående av galakturonsyrer. Homogalakturonan var stedvis avbrutt av korte forgrenede rhamnogalakturonan-I områder kalt «det hårete området». Her er hovedkjeden bygget opp av alternerende rhamnose og galakturonsyre enheter. Andre sidekjedder som ble identifisert på rhamnogalakturonan-I var arabinogalaktan-I og arabinogalaktan-II (2). I motsetning til svarthyllbær, bestod polysakkaridfraksjonene fra svarthyllblomst kun av korte områder av homogalakturonan og større eller flere områder av det «hårete området». Rhamnogalakturonan-I var her mer forgrenet med flere/større nøytrale sidekjedder av arabinan, galaktan, arabinogalaktan-I og arabinogalaktan-II. I tillegg bestod pektinene fra svarthyllblomst av den komplekse og mest uvanlige polysakkaridet rhamnogalakturonan-II (3, 4).

Komplementsystemet og makrofagene spiller en viktig rolle i forsvaret mot mange virus- og bakterieinfeksjoner. Celforsøk viste at pektinpolysakkaridene fra svarthyllbær og svarthyllblomst stimulerte både makrofagene og komplementsystemet (2–4), pektinene fra svarthyllblomst var mest aktive. Vi har sett at små forandringer i struktur, molekylvekt eller konformasjon av polysakkaridet har en stor innvirkning på biologisk aktivitet. Avspaltning av arabinose ved svak syrehydrolyse førte til redusert immunmodulerende aktivitet, mens avspal-



Figur 1. *In vitro*-effekter til svarthyllbær og svarthyllblomst.

ting av estergrupper førte til økt aktivitet. Ved enzymdegradering med pektinase ble polysakkaridet spaltet opp i mindre karbohydratkjeder. Hårete/forgrenede områder ble oppkonsentrert, og viste en økt komplementfikserende og makrofagstimulerende aktivitet. Fra resultatene ble det vist at pektiner med en hovedkjede bestående av alternerende enheter av galakturonsyre og rhamnose, høyt forgrenede områder med bindinger typisk for arabinogalaktan-I og arabinogalaktan-II, og høy grad av forgreningspunkter på galakturonsyren er viktig for biologisk aktivitet (2, 4). Dette indikerer at den tredimensjonale strukturen og det hårete området spiller en viktig rolle for immunmodulerende aktivitet.

#### Polyfenoler fra svarthyllbær og svarthyllblomst med antiinflammatorisk effekt:

Ved en inflammasjon vil makrofager og dendritiske celler aktiveres og skille ut flere inflammatoriske mediatorer, en av dem er nitrogen oksid (NO). Høye nivåer av NO kan føre til vevsskade og inflammatoriske sykdommer. Alkoholekstraktene fra svarthyll viste hemming av NO-produksjonen i makrofagene og i de dendritiske cellene i motsetning til vannekstraktene (5). Et høyt innhold av polyfenoler i alkoholekstraktene kan være årsak til NO-hemmingen. Blant polyfenolene som finnes i svarthyllbær var det antocyaninene cyanidin-3-glukosid og cyanidin-3-sambubiosid, og de fenoliske

syrene klorogensyre og kaffesyre som viste sterkest hemming. Flavonolene kaempferol, quercetin og rutin, som det blant annet finnes mye av i svarthyllblomst, viste en doseavhengig hemming av NO-produksjonen. Også metabolittene fra disse polyfenolene var effektive inhibitorer av den inflammatoriske mediatoren NO (5). Hemmingen av slike mediatorer kan spille en viktig rolle i forebygging eller behandling av infeksjoner og inflammatoriske sykdommer.

#### Polyfenoler fra svarthyllbær og svarthyllblomst med antidiabeteseffekt:

Individer med type 2 diabetes har dårlig opptak av glukose og fettsyrer i skjelettmuskelceller og leverceller. Antocyaniner, flavonoler og fenoliske syrer fra svarthyllbær og svarthyllblomst i tillegg til deres metabolitter viste i laboratorieforsøk å øke glukose- og fettsyreopptak i humane skjelettmuskelceller og humane leverceller (6–8). Økningen ligger typisk mellom 30 og 40 prosent for de mest aktive stoffene. I tillegg ble det vist at enkelte polyfenoler fra svarthyllblomst og svarthyllbær var kraftige hemmere av to enzymer som finnes i mage-tarm-kanalen og som spiller en sentral rolle for opptak av glukose i kroppen. Disse innholdsstoffene var mer effektive enn legemiddelet akarbosom brukes i dag til behandling av diabetes (6, 7). De observerte biologiske effektene kan ha en klinisk relevans siden den

laveste konsentrasjonen som har blitt brukt i forsøkene også er detektert i mennesker. Oksidativt stress og frie radikaler er involvert i utviklingen av diabetes. Polyfenoler og noen av metabolittene viste høy DPPH radikalscavengeraktivitet. I tillegg viste de 15-lipoksygenase og xantin oksidase. Disse enzymene er involvert i produksjonen av reaktive oksygen species ved type 2-diabetes (6, 7).

#### KONKLUSJON

I dette doktorgradsarbeidet har laboratorieforsøk vist at svarthyllbær og svarthyllblomst inneholder substanser som kan ha en gunstig effekt ved diabetes og inflammatoriske sykdommer, og det er antatt at et høyt innhold av polyfenoler og pektiner er årsaken til dette (figur 1). Polysakkarider og polyfenoler fra svarthyll kan muligens forklare den tradisjonelle bruken av svarthyll mot diabetes, infeksjoner og forkjølelse. Laboratorieforsøkene virker lovende, men det er nødvending med studier på mennesker for å bekrefte resultatene.

#### REFERANSER

1. Ho GTT. Bioactive compounds in flowers and fruits of *Sambucus nigra* L. Doktoravhandling, Oslo: Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Universitetet i Oslo, 2017.
2. Ho GTT, Ahmed A, Zou YF et al. Structure-activity relationship of immunomodulating pectins from elderberries. *Carbohydr Polym* 2015; 125: 314–22.
3. Ho GTT, Zou YF, Aslaksen TH et al. Structural characterization of bioactive pectic polysaccharides from elderflowers (*Sambuci flos*). *Carbohydr Polym* 2016; 135: 128–37.
4. Ho GTT, Zou YF, Wangenstein H et al. RG-I regions from elderflower pectins substituted on GalA are strong immunomodulators. *Int J Biol Macromol* 2016; 92: 731–8.
5. Ho GTT, Wangenstein H, Barsett H. Elderberry and elderflower extracts, phenolic compounds, and metabolites and their effect on complement, RAW 264.7 macrophages and dendritic cells. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 1–17.
6. Ho GTT, Kase ET, Wangenstein H et al. Effect of phenolic compounds from elderflowers on glucose- and fatty acid uptake in human myotubes and HepG2-cells. *Molecules* 2017; 90: 1–15.
7. Ho GTT, Kase ET, Wangenstein H et al. Phenolic elderberry extracts, anthocyanins, procyanidins, and metabolites influence glucose and fatty acid uptake in human skeletal muscle cells. *J Agr Food Chem* 2017; 65: 2677–85.
8. Ho GTT, Nguyen TKY, Kase ET et al. Enhanced glucose uptake in human liver cells and inhibition of carbohydrate hydrolyzing enzymes by Nordic berry extracts. *Molecules* 2017; 22: 1–15.