

SUOMALAINEN PAKURIN (*INONOTUS OBLIQUUS*) TULEHDUKSEN HILLITSIJÄNÄ

Pertti Marnila *, Juha-Matti Pihlava, Rainer Peltola, Pirjo Mattila, Jarkko Hellström & Henri Vanhanen
(pertti.marnila@luke.fi)

www.researchgate.net/profile/Pertti_Marnila

*esittäjä

Tukijat:



UNIVERSITY OF
EASTERN FINLAND

© Natural Resources Institute Finland



”Raharääseikkö” - Pakurin puoliviljelyhanke

- ✿ Kehittää menetelmiä Pakurin laajan mittakaavan kasvatukseen
- ✿ **Kehittää työkalut Pakurin laatukontrollia varten**
- ✿ Auttaa metsänomistajia myymään pakuria luomalla verkostot tuottajien, jalostajien ja markkinoijien välille
- ✿ Tuottaa tietoa ja ohjeistukset metsänomistajille ja luonnontuotevalmistajille Pakurin viljelyyn ja jatkojalostukseen

Pakuri eli *Inonotus obliquus* –käävän steriili pahka



Picture: Kai Pulkkinen

© Natural Resources Institute Finland

Tutkimuksen tarkoitus

- Suomalaisesta Pakurista kehittämään markkinoille tuotteita, kuten pakuriteetä. Tuotteiden myyntivalttina on terveellisyys.
- Pakurissa, kuten muissakin luonnontuotteissa, on **suuri määrä erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä**. Niiden keskinäiset määräsuhteet vaihtelevat. Kasvuolosuhteet ja alue, raaka-aineen esikäsittely, prosessointi sekä säilytysolosuhteet ja aika vaikuttavat lopputuotteen ominaisuuksiin.
- Terveysvaikutus on kaikkien tuotteen aineosien yhteisvaikutus. Toistaiseksi **ei pystytä varmistamaan tuotteen terveysvaikutusta muutamien yhdisteiden pitoisuuksien perusteella**. Muutos jonkun yhdisteen pitoisuudessa tai uuden yhdisteen ilmaantuminen voi kumota toisten vaikutukset.
- Siksi kehitimme nopean ja melko huokean **menetelmän** ehkä **tärkeimmän bioaktiivisuuden, tulehduksen eston, mittaamiseen**. Vertasimme kotimaisista Pakureista tekemiemme uutteen biologista aktiivisuutta niihin, mitä kirjallisuudessa on kuvattu.

Pakurin immuunivaikutukset

- Muiden terveyttä edistävien ominaisuuksiensa lisäksi Pakuri **auttaa säätelemään immuunijärjestelmän toimintaa**. Pakuri **vahvistaa joitain immuunijärjestelmän osia**, kuten esim. tappajasolujen (NK-solut) toimintaa (ADCC-reaktiot) ja toisaalta Pakuri hillitsee fagosytoivien solujen aktiivisuutta.
- Koe-eläin – ja solumallitutkimuksissa Pakuri on suojannut verisuonten seinämien endoteelisoluja happen radikaalien ja ei-toivottujen tulehdusreaktioiden aiheuttamilta vaurioilta.
- Pakurilla on raportoitu olevan monenlaisia suotuisia terveysvaikutuksia. Näistä **tulehduksen esto ja immuunijärjestelmän toimintaa säätelevät** vaikutukset ovat tärkeimmät ihmisten aineenvaihdunnan terveyden kannalta.

Terveys ja metatulehdus 1

- 2-tyypin diabetes, verisuonten ahtautuminen, monet syövät ja Alzheimerin tauti, - niin erilaisia kuin nämä sairaudet ovatkin, niiden kaikkien synnyssä ja etenemisessä on keskeisessä asemassa pitkäaikainen tulehdus.
- **Liika-aktiiviset valkosolut** ovat keskeisessä asemassa näiden sairauksien synnyssä.
- **Neutrofiilit**, joita on noin puolet kaikiosta valkosoluista, ovat **pääasiallinen happiradikaalien lähde tulehduksen aikana**. Monosyyteillä ja makrofageilla on myös keskeinen rooli valtimotaudin ja 2-tyypin diabeteksen kehittämisessä. Liika-aktiiviset **monosyytit ja makrofagit ovat tulehdusvälittäjäaineiden (sytokiinit) pääasiallinen lähde**. Myös ne vapauttavat **hapen radikaaleja**.
- Nämä prosessit ovat mukana ateroskleroottisen plakin kehittymisen kaikissa vaiheissa ja tulehdusvälittäjäaineiden vapauttamisessa, joka edesauttaa insuliiniepäherkkyyden kehittymistä.

Influence of Anthropological Stimuli on Atherogenesis

Characteristics of Plaque Development

1. EC Injury and Activation
(mechanical trauma, shear stress, infection, ROS)

2. LDL Oxidation
(scavenger receptors, oxLDL/acLDL)

3. M ϕ Infiltration
(cytokines, growth factors, ROS)

4. SMC Proliferation and Migration
(ECM components, cytokines, growth factors)

5. Thrombosis
(platelets, lymphocytes)



↑Energy Intake
↑ Sat/Trans Fat
↑Smoking
↓Physical Activity

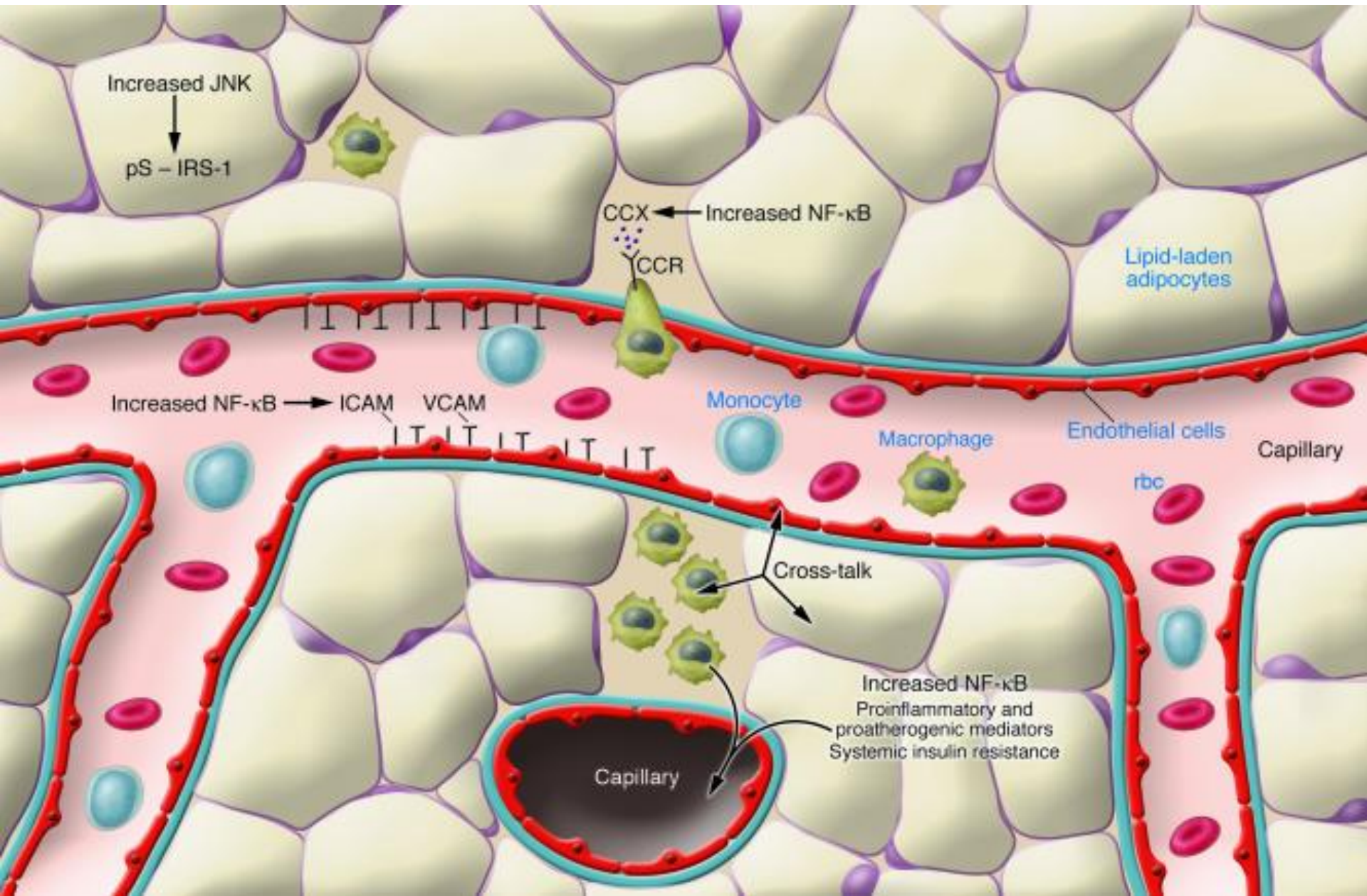
↑Energy Intake
↑ ω -6/ ω -3 ratio
↑ Sat/Trans Fat
↓Vitamins
↑Salt
↑Smoking
↓Physical Activity

↑Energy Intake
↑ ω -6/ ω -3 ratio
↑ Sat/Trans Fat
↓Vitamins
↑Salt
↑Smoking
↓Physical Activity

↑Energy Intake
↑ ω -6/ ω -3 ratio
↑ Sat/Trans Fat
↓Vitamins
↑Smoking

↑Energy Intake
↑ ω -6/ ω -3 ratio
↑ Sat/Trans Fat
↓Vitamins
↑Smoking
↓Physical Activity

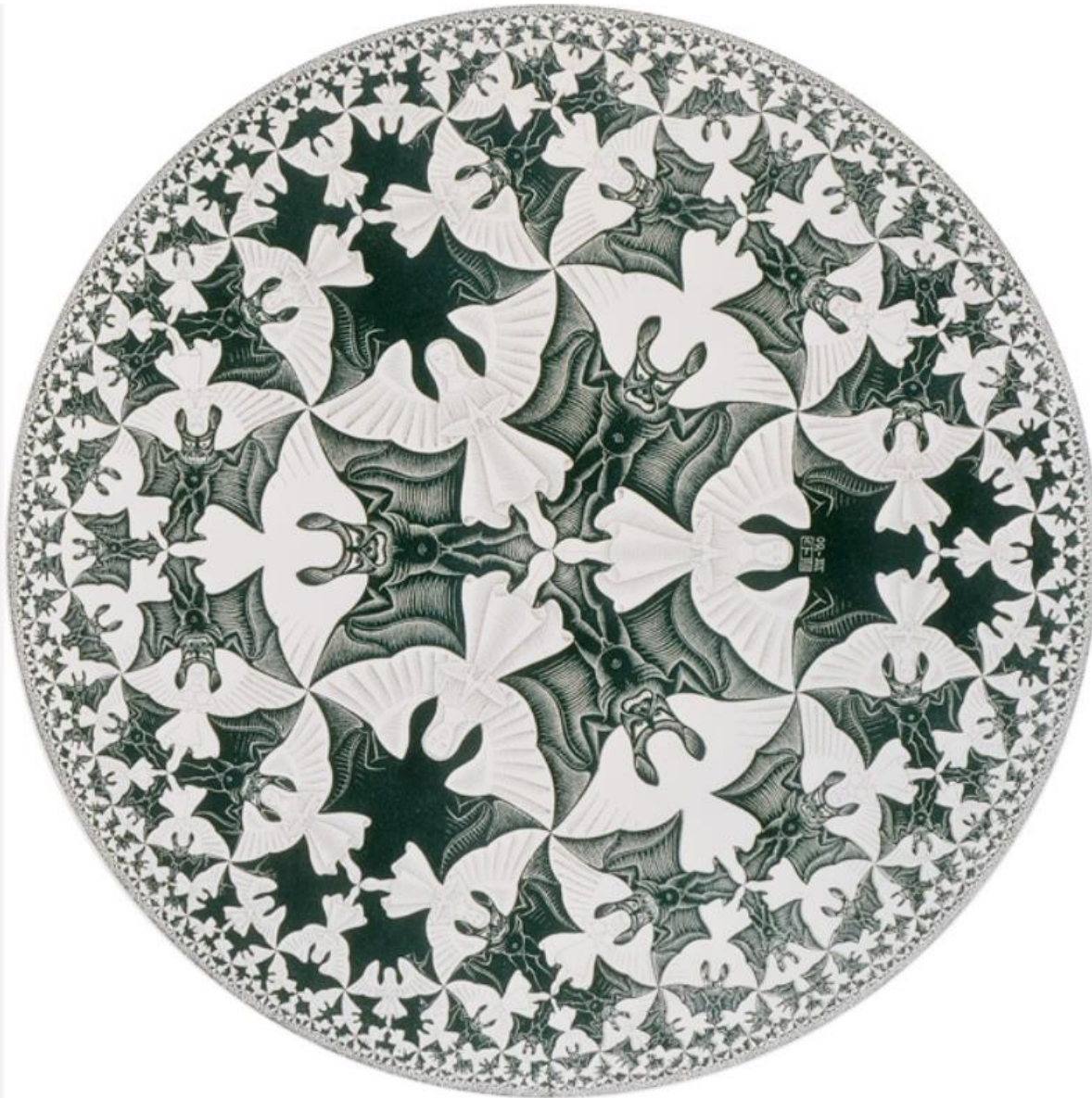
Historical Trend and Potential Molecular Target(s) of Anthropological Stimuli



Terveys ja metatulehdus 2

- **Myeloperoksidaasi (MPO)** on **hapettava** entsyymi, jota **aktivoituneet valkosolut** vapauttavat verenkiertoon.
- MPO voi paikallisesti toimia NO –oxidaasina ja aiheuttaa verisuonen sisäseinän solujen toimintahäiriötä ja kohottaa verenpainetta.
- Akuuteista sydänoireista kärsivillä infarktipotilailla veren MPO-aktiivisuus on yksi ennusteeseen vaikuttava tekijä.
- **Strategioilla, jotka kohdistuvat valkosolujen aktivoitumiseen tulehdussoluiksi**, katsotaan paitsi olevan kansantautiemme syntyä ehkäisevä vaikutus, myös **olevan terapeuttista vaikutusta**, koska monosyytti–makrofagi systeemin liika-aktiivisuus on dynaaminen prosessi, joka jatkuu koko sairauden etenemisen ajan.
- Elintarvikkeiden, joilla on tulehdusta hillitseviä ominaisuuksia, katsotaan yleensä olevan hyväksi ihmisille **valtimotaudin ja 2-tyypin diabeteksen** kannalta.

Immuunipuolustuksella on hintansa.

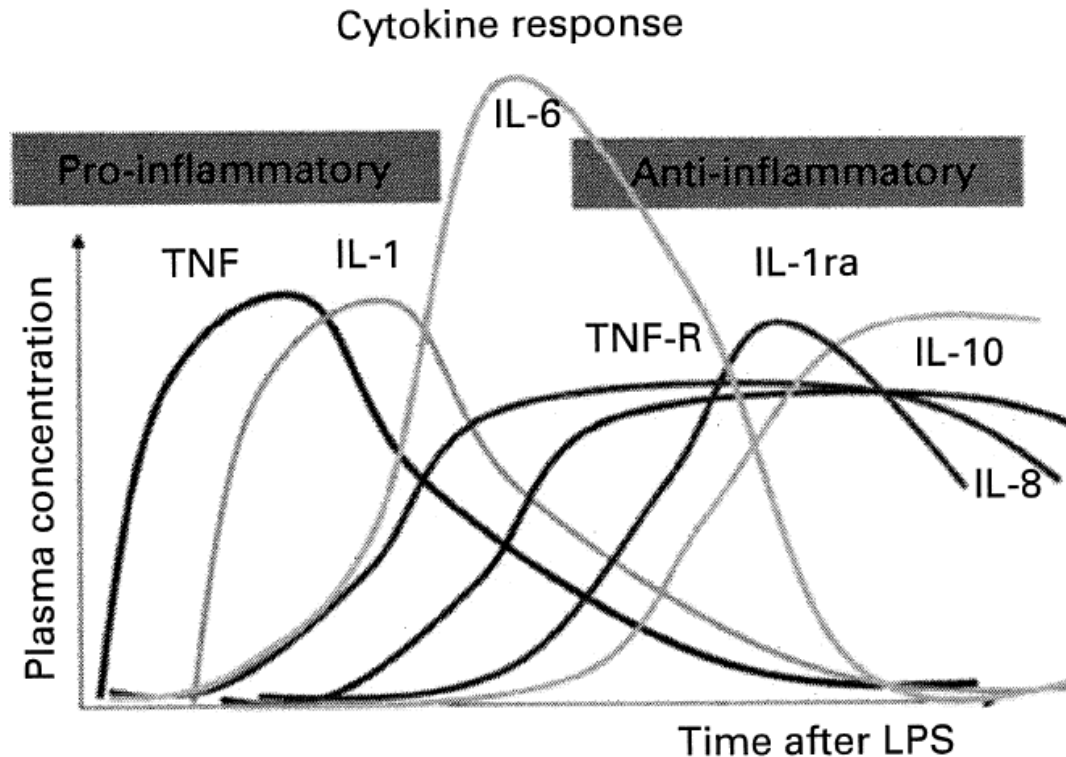


Maurits C. Escher
Enkelit ja paholaiset
v.1960

Tulehdusvaikutuksen mittaaminen 1

- Koeputkimenetelmillä, joilla tutkitaan uusia mahdollisesti tulehdusta hillitseviä yhdisteitä, jotka voisivat estää fagosyyttien muuttumista tulehdussoluiksi tai happiradikaalien tuottoa, on **usein korkeat materiaalikustannukset**. Suurten näytemäärien tutkiminen eri pitoisuuksina voi vaatia **satoja yksittäisiä mittauksia**. Siksi aikaa ja tarvikkeita säästäviä menetelmiä tarvitaan.
- Yleisimmin käytettyjä menetelmiä on mitata tutkittavan aineen **vaikutusta valkosolujen tuottamien tulehdusvälittäjäaineiden tuottoon**. Haittoina on testeissä käytettävien **monoklonaalisten vasta-aineiden kalleus** ja tosiasia, että edes jonkinlaisen kuvan saaminen esim. Pakurin tulehdusvaikutuksesta edellyttää **vähintään kolmen tai neljän eri sytokiinin** mittaamista eri näytepitoisuuksilla. **Tulehdustekijät erittyvät eri aikoina**, jonka takia näytteetkin on otettava **useaan kertaan eri ajankohtina**.

Tulehdusvaikutusten mittaaminen - sytokiinivaste

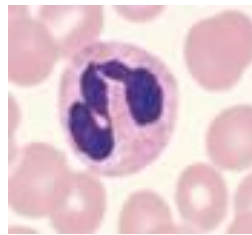
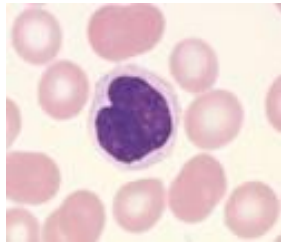


Eri tulehdusvälittäjäaineiden (sytokiinit) ilmaantumisen aikajärjestys *E. coli* –bakteerin soluseinän lipopolysakkaridin (LPS) antamisen jälkeen. Ensinnä vapautetaan tulehdusta edistäviä ja sitten hillitseviä välittäjäaineita.

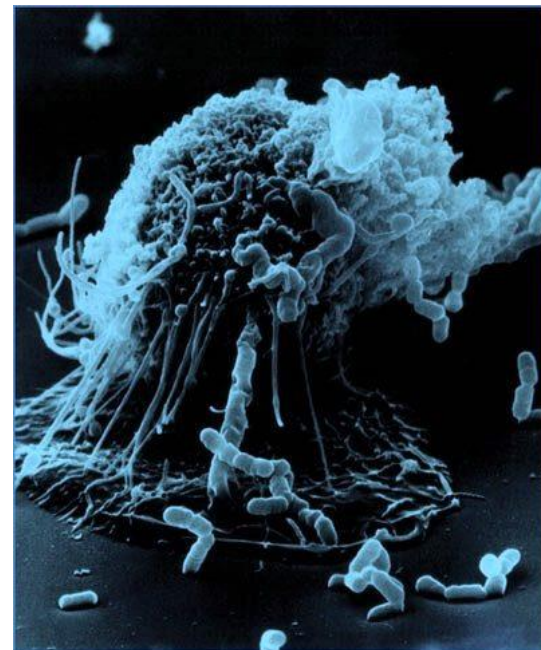
Keskinäiset pitoisuudet ja aika ovat keinotekoisilla asteikoilla, jotta ne saadaan esitettyä samassa kuvassa. Calder ym. 2013. British Journal of Nutrition. 109, S1, S1-S34.

Pakurin vaikutuksen testaaminen valkosoluihin

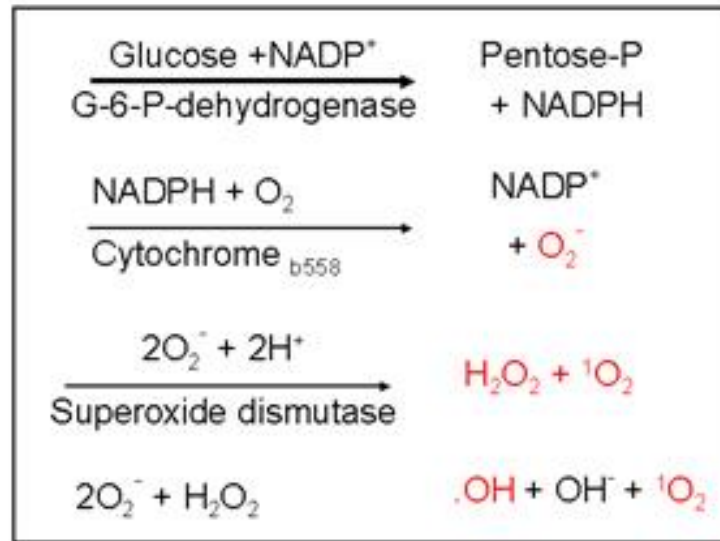
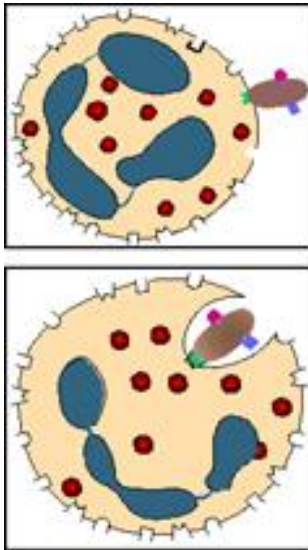
- Päädyimme mittaamaan **suoraan Pakurin vaikutusta veren aktivoituneiden valkosolujen happiradikaalien tuottoon**. Tätä varten kehitimme kemiluminesensiin perustuvan nopean ja tarkan menetelmän mitata solujen perustason superoksidiradikaalin tuotantoa, myeloperoksidaasin aktiivisuutta ja radikaalien tuotantoa tapporeaktioiden aikana.



- Monosyytti (vas.) ja neutrofiili (oik.) May-Grünwald –Giemsa värjättyinä. Oikealla neutrofiili syö bakteereita (pyyhkäisyelektronimikroskooppikuva).



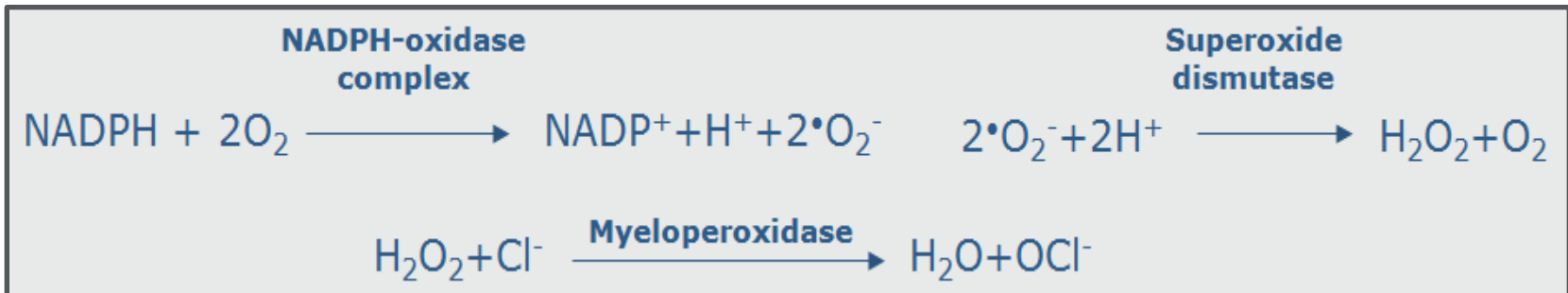
Fagosytoivien valkosolujen kemiluminesenssi



Fagosytoivat valkosolut tappavat mikrobeja lysosomaalisten hajottavien entsyymien, kuten **proteaa sien, ja hyvin toksisten reaktiivisten happiyhdisteiden** avulla. Happiyhdisteet emittoivat fotoneja, valoa, kun niiden hapetusenergia purkautuu. Tapporeaktiot voivat tapahtua sekä solujen ulko- että sisäpuolella lysosomeissa. **Tätä valoemissiota kutsutaan fagosyyttien kemiluminesenssiksi (KL).** KL korreloi hyvin syötyjen mikrobien määrän ja niiden tapon kanssa.

Kemiluminesenssin vahvistaminen

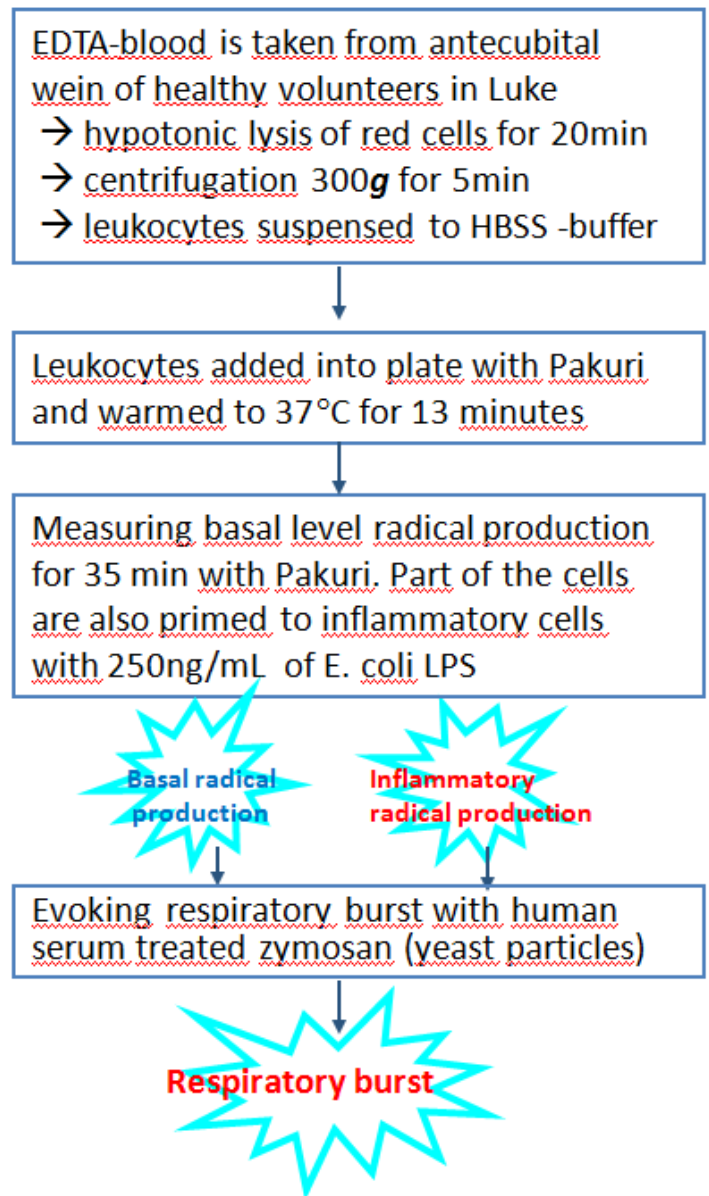
Production of reactive oxygen radicals during respiratory burst:



- **Lusigeniini ja luminoli vahvistavat KL-emission** 10^2 - 10^3 ja 10^4 -kertaisesti.
- Lusigeniini on **hyvin spesifinen superoksidiradikalille**, joten lusigeniini KL heijastaa **NADPH-okidaasikompleksin toimintaa**.
- Luminolin KL lähes täysin riippuvainen **myeloperoksideasin (MPO) aktiivisuudesta** solun sisägranuloista.

Protokolla

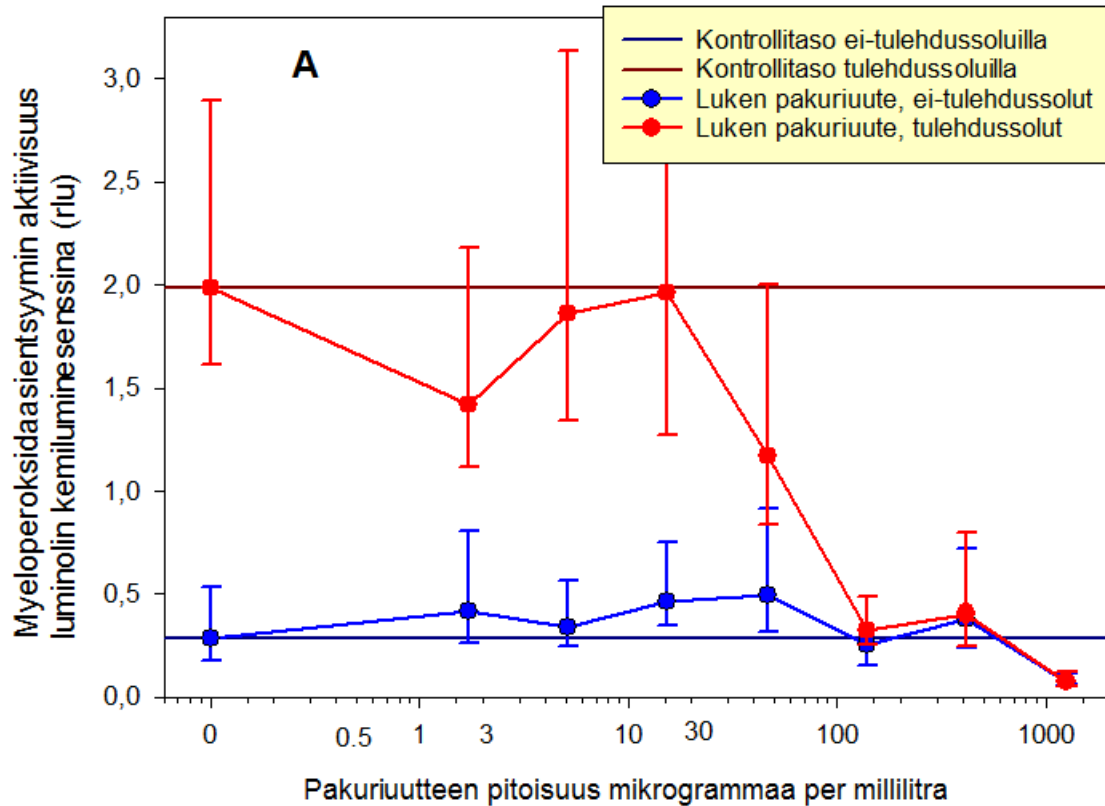
- Perifeeristä EDTA-verta sekoitettiin 0.83% ammoniumkloridiliuokseen (1:10 v:v) ja sekoitettiin 20min ajan. Punasolujen kalvotähteet poistettiin sentrifugoimalla ja valkosolut suspentoitiin HBSS-puskuriin, jossa 0.1% gelatiinia.
- Eri solutyyppejä ei eroteltu soluaktivaation välttämiseksi erotusprosessien aikana. Myös eri solutyypin keskinäiset vuorovaikutusten haluttiin tapahtuvan LPS-käsittelyn aikana.
- Luminoli tai lusigeniini lisättiin (0.8mM). 100µl soluja pantiin kuoppalevyn kaivoihin ja lisättiin **50µl Pakuria**. Soluja haudottiin 35 min ajan 37° C:ssa. Osa soluista muutettiin tulehdussoluiksi lisäämällä LPS:a (250ng/ml). Perustason superoksidin tai MPO:n tuottamien hapen radikaalien tuotto mitattiin ns. ultraheikkona KL-emissiona luminometrillä.
- Lopuksi indusoitiin solutapporeaktio lisäämällä seerumikäsiteltyjä hiivapartikkeleita 125µg. Reaktiota seurattiin 1 tunti 20 min kineettisesti.
- The KL huippuarvo kuvaa tapporeaktion voimaa ja huipun ajankohta kuvaa reaktionopeutta.



Pakurinäytteiden esikäsittely valkosolutesteihin

- Pakurit pakastettiin, jauhettiin ja pakkaskuivattiin.
 - Jauhetta punnittiin 7,5 g ja pantiin 250 ml pyörökeittimeen johon lisättiin 50ml Milli-Q -vettä.
 - Seosta refluksoitiin 2 tuntia sähköhauteessa → jäähdytys.
 - Suodatus Whatman 1 –paperin läpi Büchner-suppilossa.
 - Suodos punnittiin lautasella ja pakkaskuivattiin. Kuiva-aine punnittiin.
 - Säilytys -22° C.
-
- Tulehduskokeita varten pulverit liuotettiin HBSS-puskuriin (30mg/ml).
 - pH säädettiin 7.4:ään 20mM natrium-boorihappopuskurilla (pH 9.0) ja HBSS-puskuria lisättiin niin että pitoisuus oli 15mg/ml.
 - Seos sentrifugoitiin kahdesti 30 000g:ssä 20min ajan, jotta kaikki liukenemattomat partikkelit saataisiin pois.
 - Neste suodatettiin 0,22µm mikrosuodattimien läpi
 - Säilytys erissä -22C:ssa.
 - Pitoisuudet kokeissa olivat 1,71 - 1250 µg/ml (w/v).

Pakuriute vaikuttaa lepotilassa olevien solujen perustason MPO-radikaalituottoon tulehdussoluilla



- Pisteet ovat 6 henkilön keskiarvoja \pm keskihajonta.
- Koska signaali oli hyvin pieni, keskihajonta oli korkea.

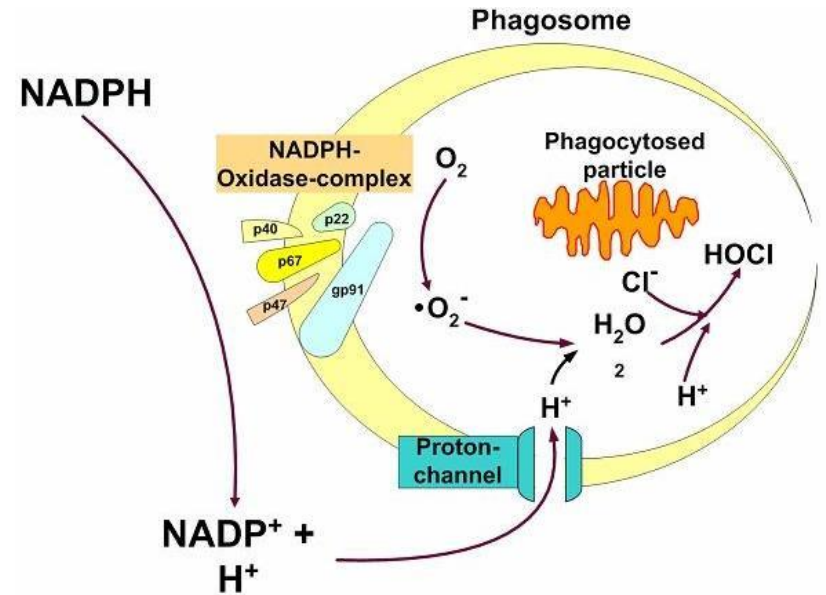
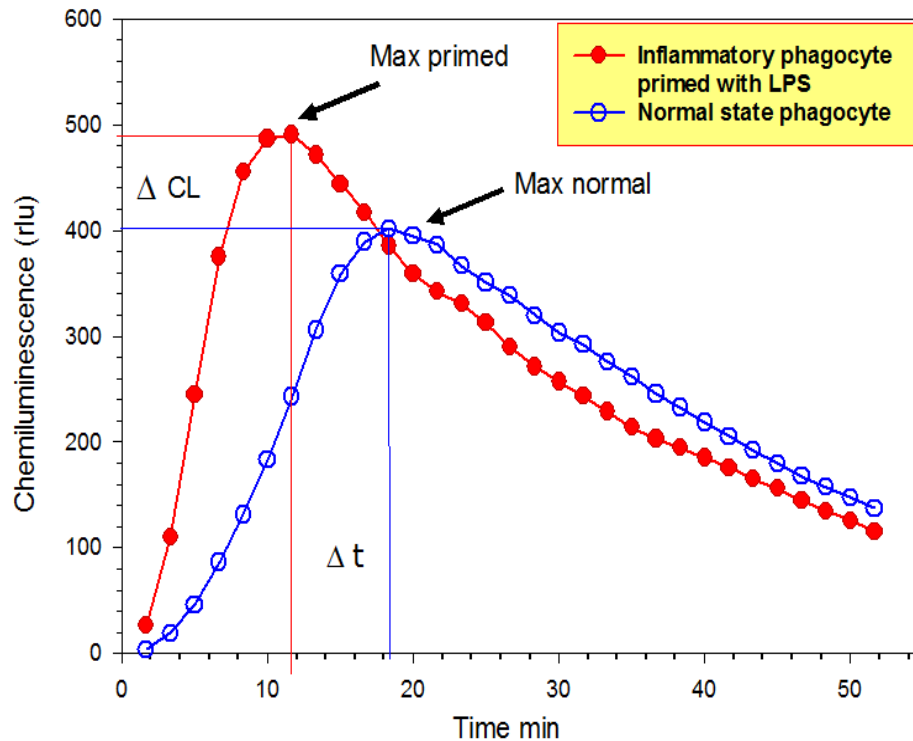
Pakuri **vähensi perustason** myeloperoksidaasista riippuvaa radikaalien tuottoa lepotilassa olevilla soluilla (6 koehenkilöä).

Vaikutus on **voimakkaampi tulehdussoluilla kuin normaalisolulla**. Kyseessä on oltava muukin kuin antioksidanttivaikutus. Pakuriute **vaikuttaa soluaineenvaihduntaan spesifimmin**.

MPO:n liiallisella vapautumisella vereen häiriintyneen valkosolutoiminnan seurauksena on ajan oloon **merkittävä tekijä monien kroonisten sairauksien kehittymisessä**.

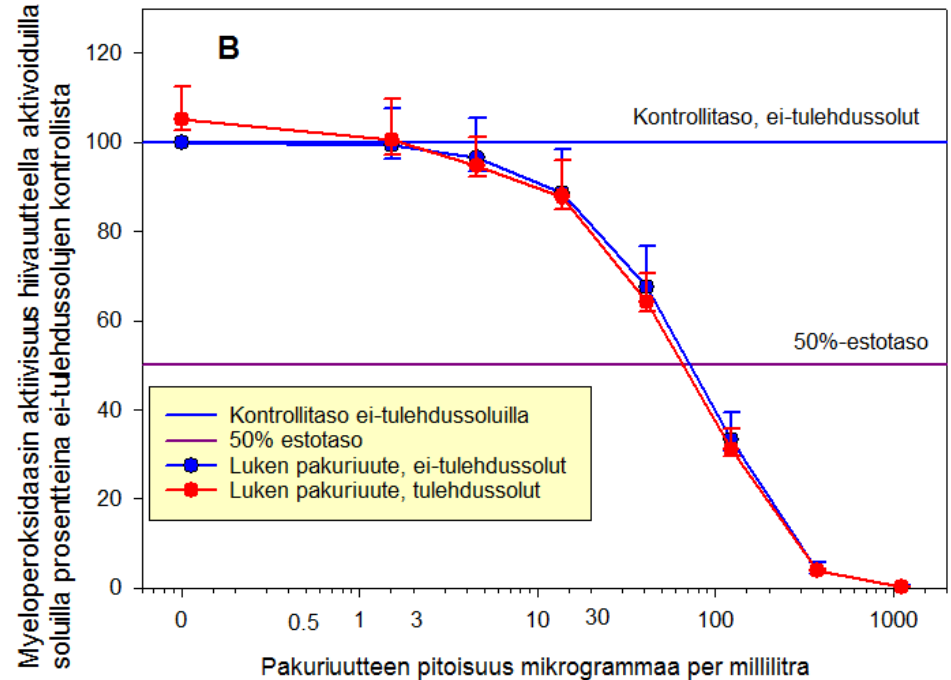
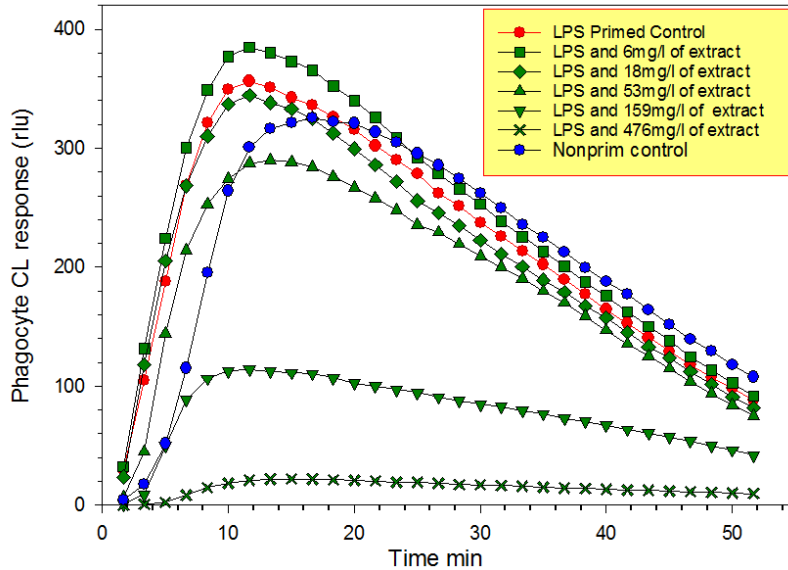
Pakurin yhdisteet **estävät näitä vahingollisia ja rappeuttavia prosesseja**. Pakurilla voi siis edesauttaa terveyttä pienentämällä aineenvaihduntasairauksien riskiä

Radikaalituotto tapporeaktiossa ja LPS -käsittely



Tulehdustilassa fagosyytit reagoivat nopeammin ja usein voimakkaammin mikrobeihin kuin normaalitilaiset solut. Mikrobin kappaleet tai tulehdusvälittäjäaineet aiheuttavat solun muuttumisen tulehdussoluksi

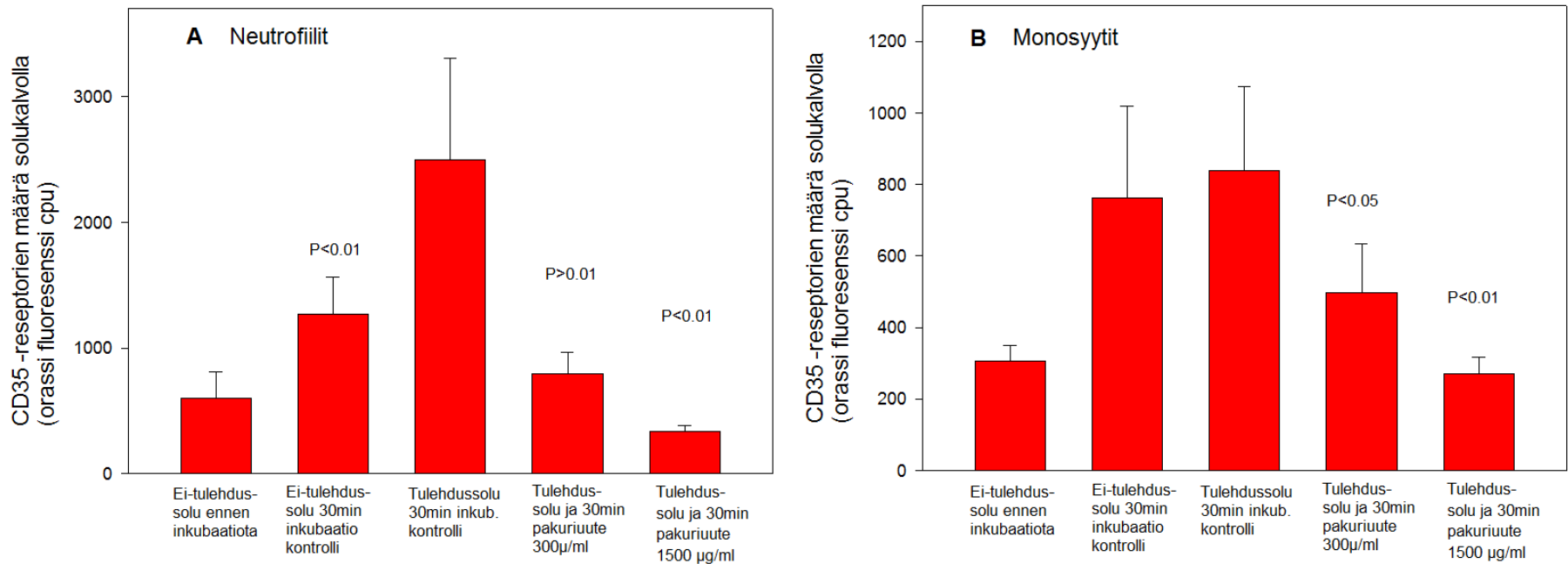
Pakuriutteen vaikutus tapporeaktioon



- Hiivalla indusoidun tapporeaktion radikaalituotto oli 500- 1000 kertaa suurempi kuin lepotilassa olevan ei-tulehdussolun (edellinen kalvo).
- Oikeanpuoleisen kuvan pisteet ovat 8:n koehenkilön keskiarvoja ja \pm keskihajonta.

- Pakuri vähentää myeloperoksidiaasi-peräisten radikaalien tuotantoa myös lyhytaikaisen tapporeaktion aikana.
- Tapporeaktiossa Pakurin vaikutus on sama sekä tulehdussoluiohin että normaalisoluihin.

Pakuri hillitsee degranulaatiota ja reseptorien kuljetusta solukalvolle (CD35 ekspressio)



Pakuri esti valkosolujen aktivaatiota LPS:lla (neutrofiilit) tai lämpimässä inkuboimalla indusoitaessa (monosyytit). Nämä käsittelyt johtavat herkästi mobilisoituvien vesikkeliön (secretory vesicles, SV sekä secretory vesicle-like granules, SVLGs) fuusioon sekä solujen tunnistusmolekyylien, fagosytoosireseptorien CD35, nopeaan mobilisoitumiseen ja siirtymiseen solukalvolle. Tämä on olennainen osa solun muuttumisessa tulehdussoluksi.

Pakurin tulehdusta hillitsevä vaikutus **ei johdu vain antioksidanttiaktiivisuudesta vaan Pakuri vaikuttaa solun toimintoihin spesifisemmällä tavoilla.** Kuvassa tilastolliset erot on esitetty LPS:llä aktivoituja verrokkeihin nähden.

Yhteenveto

- Kehitimme **kohtalaisen yksinkertaisen, nopean ja huokean** koeputkimenetelmän **Pakurin** vesiuutteen **tulehdusta hillitsevän vaikutuksen testaamiseen**
- Lukuisat tekijät vaikuttavat Pakurituotteiden laatuun. Siksi **huokeita testausmenetelmiä tarvitaan** niin raaka-aineiden kuin tuotteiden bioaktiivisuuksien varmistamiseen.
- Tulehdussoluiksi muuttuneiden valkosolujen liikatoiminnan tuloksena syntyy suuria määriä happen radikaaleja. Niillä on keskeinen rooli monien kansantautiemme, kuten valtimotaudin, myöhemmän iän muistisairauksien ja 2 tyypin sokeritaudin kehittymisessä ja etenemisessä. **Pakuriuutteet hillitsivät valkosolujen happiradikaalituottoa**. Tämä on Pakurin terveysvaikutuksista ehkä merkittävin.
- Tulostemme perusteella Pakurin vaikutus valkosoluihin ei ole pelkästään antioksidanttiaktiivisuutta. Pakuri vaikutti spesifisemmällä tavoilla fagosytoivien valkosolujen aktivaatioon ja solukoneiston toimintaan. Tämä johtopäätös on samansuuntainen aiemmin julkaistujen koe-eläin- ja solututkimusten kanssa.

Thank you!