

12.11. 2003

Toimeksiantaja

Kari Herttua
Ravintorengas Oy
29810 Siikainen

Näytteet

Tilaaajan toimittamat Havupuu uutejuoma näytteet.

Analyysit

Analyysit tehtiin osana Tekes-rahoitteista hanketta "Luonnonmateriaalien terveysvaikutusten prekliininen evaluaatio" (tutkimusahoitus päätös 40030/03, 2003-2004):

1. Fenolisten yhdisteiden **koostumus** määritettiin nestekromatografisesti (HPLC, UV-detektio 280 nm). Pitoisuuksia määritettäessä käytettiin seuraavia Havupuu uutejuomia: parasta ennen 09.04.04, 24.04.04 ja 29.04.04. Määritykset tehtiin Turun yliopiston kemian laitoksella (prof. Kalevi Pihlaja).
2. **Antioksidanttiteho** määritettiin *ex vivo* LDL (low density lipoprotein) partikkelin hapettumisen estäjänä. LDL:n hapettumista seurattiin mittaamalla head space kaasukromatografisella menetelmällä muodostuneen lipidien hapettumistuotteen, heksanaalin, määrää. Tutkimuksen kohteena oli Havupuu uutejuoma: parasta ennen 28.03.03. Määritykset tehtiin Helsingin yliopiston soveltavan kemian ja mikrobiologian laitoksella (prof. Marina Heinonen).
3. **Tulehduksen estovaikutusta** tutkittiin mittaamalla vaikutusta tulehduksessa aktivoituvaan ja tulehdusreaktiota voimistavaan typpioksidisynteesiin ja COX-2 välitteiseen prostaglandiinisynteesiin. Työssä käytettiin hiiren J774 makrofagi solulinjaa. Solujen typpioksidituotto (NO) määritettiin mittaamalla typpioksidin aineenvaihduntatuotetta, nitriittiä, Griessin menetelmällä. Indusoituvan typpioksidisyntaasi –entsyymin (iNOS) ilmentymistä soluissa mitattiin Western blot menetelmällä. Prostaglandiinin (PGE₂) tuottoa mitattiin radioimmunologisella menetelmällä ja indusoituvan prostaglandiinisyntaasi –entsyymin (COX-2) ilmentymistä Western blot menetelmällä. Tulehduksen estoa tutkittiin kahdella eri Havupuu uutejuoman (parasta ennen 29.08.04) pitoisuudella: 1:100 (1% soluviljelymediumissa) ja 1:50 (2 % soluviljelymediumissa). Määritykset tehtiin Tampereen yliopiston lääketieteen laitoksella (prof. Eeva Moilanen).
4. **Lääkeaineiden imeytymistä** ohut- ja paksusuolesta voidaan mallintaa paksusuolen syöpäkasvaimesta alun perin eristetyn Caco-2 solulinjan avulla *in vitro*. USA:ssa FDA (Food and Drug Administration) on laatinut listan lääkeaineista ja yhdisteistä, joiden imeytymisprosessit ovat jo hyvin tunnettuja



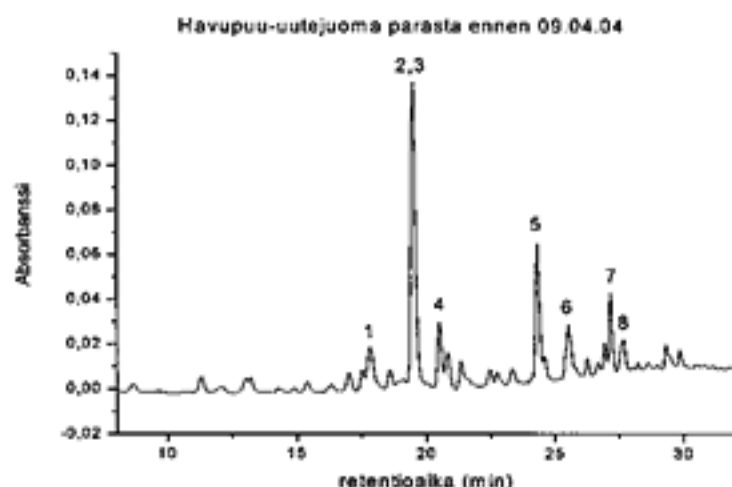
ja jotka he hyväksyvät imeytymiskokeiden validointiin. Näillä aineilla voidaan myös tutkia erilaisia imeytymisen edisteitä tai estovaikutuksia. Pakkaskuivatun Havupuu uutejuoman vaikutusta (pitoisuudet 0,01; 0,1 ja 1 mg/ml) tiettyjen lääkeaineiden imeytymiseen tutkittiin. Lääkeaineet valittiin niiden erilaisten kulkeutumistapojen suolen epiteelisolukon läpi perusteella. Määritykset tehtiin Helsingin yliopiston Farmasian laitoksella (prof. Heikki Vuorela). Käytetyt mallilääkeaineet ja niiden pääasialliset kulkeutumismekanismit on esitetty alla:

- **Verapamiili:** Kulkeutuu passiivisesti ja nopeasti. Imeytyminen hidastuu aktiivisen effluksimekanismin kautta.
- **Ketoprofeeni:** Kulkeutuu aktiivisella mekanismilla ja nopeasti.
- **Metoprololi:** Kulkeutuu passiivisesti ja nopeasti, sekä para- että transsellulaarisesti.
- **Parasetamoli:** Kulkeutuu passiivisesti ja nopeasti, vain transsellulaarisesti. (Ei kuulu FDA:n listaan, mutta tunnetaan hyvin)

Tulokset

1. Fenoliset yhdisteet

Havupuu uutejuoma sisältää erityyppisiä fenolisia yhdisteitä, joista määrällisesti eniten resveratroliglukosidia ja katekiinia. Tunnistettujen fenolisten yhdisteiden yhteenlaskettu määrä Havupuu uutejuomassa on 489 µg/ml. Lisäksi uutejuoma sisältää muita fenolisia yhdisteitä. Uutejuomasta voidaan HPLC-kromatogrammin perusteella todeta mm. seuraavat pääyhdisteet:



1	fenolisen hapon johdannainen	35 ± 2 µg/ml
2+3	resveratroliglukosidi ja katekiini yhteensä	249 ± 5 µg/ml
4	ferulahappoglukosidi	35 ± 2 µg/ml
5	lignaaniglukosidi	51 ± 1 µg/ml
6	lignaaniksylosidi	32 ± 1 µg/ml
7	taksifoliiniglukosidi	46 ± 2 µg/ml
8	taksifoliini	41 ± 1 µg/ml

Yhdisteiden 1,4,5 ja 6 määrä on laskettu p-hydroksibentsoehapon avulla, yhdisteiden 2 ja 3 katekiinin avulla ja yhdisteiden 7 ja 8 taksifoliinin avulla.

2. Antioksidanttiteho

Monet fenoliset yhdisteet estävät elimistön LDL-partikkelien hapettumista, jonka voimassaolevan hypoteesin mukaan ajatellaan olevan alkusyynä sydän- ja verisuonitautien kehittymiselle. Mitä enemmän LDL-partikkeleihin on kertynyt ravinnostamme peräisin olevia antioksidantteja sitä paremmin partikkeli kykenee puolustautumaan sisältämiensä lipidien (rasvahapot, kolesteroli ym.) hapettumista vastaan. LDL:n hapettumistesti on *ex vivo* -malli elimistössä tapahtuvalle LDL:n hapettumiselle. Tehokkaimmillaan näyte vähentää LDL partikkelin hapettumista 100 %:sti. Havupuu uutejuoma on erittäin tehokas (antioksidanttiteho 95 %) LDL partikkelin hapettumisen estäjä. Antioksidanttitehoon vaikuttavat Havupuu uutejuoman sisältämät fenoliset yhdisteet.

3. Tulehdusten esto

Aiempien tutkimusten perusteella tiedetään, että kun makrofageja stimuloidaan bakteeriperäisellä lipopolysakkaridilla, niissä käynnistyy tulehdusta välittävien yhdisteiden, mm. typpioksidin (NO) synteesi. Solut tuottavat runsaasti typpioksidia iNOS-entsyymien (tulehduksessa indusoituva typpioksidisyntaasin muoto) katalysoimassa reaktiossa. Havupuu uutejuoma esti vähäisessä määrin typpioksidin tuottoa ja iNOS entsyymien ilmentymistä käytettäessä pitoisuutta 2 %.

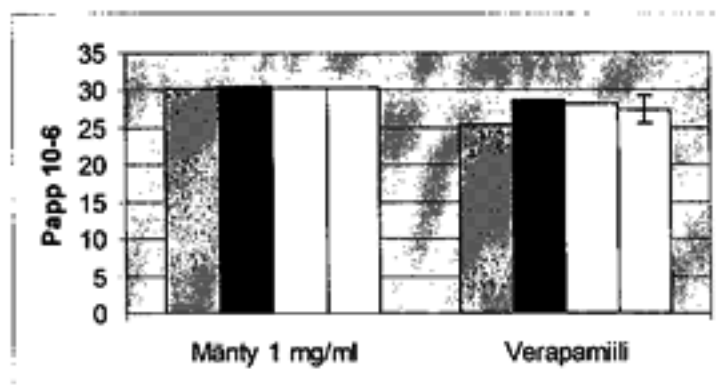
Tulehduksissa tärkein prostaglandiini on PGE₂. Havupuu-uutejuoma esti merkittävästi prostaglandiinien tuottoa, mutta sillä ei ollut vaikutusta COX-2 entsyymien ilmentymiseen. Havupuu uutejuoma sisältää todennäköisesti yhdisteitä,

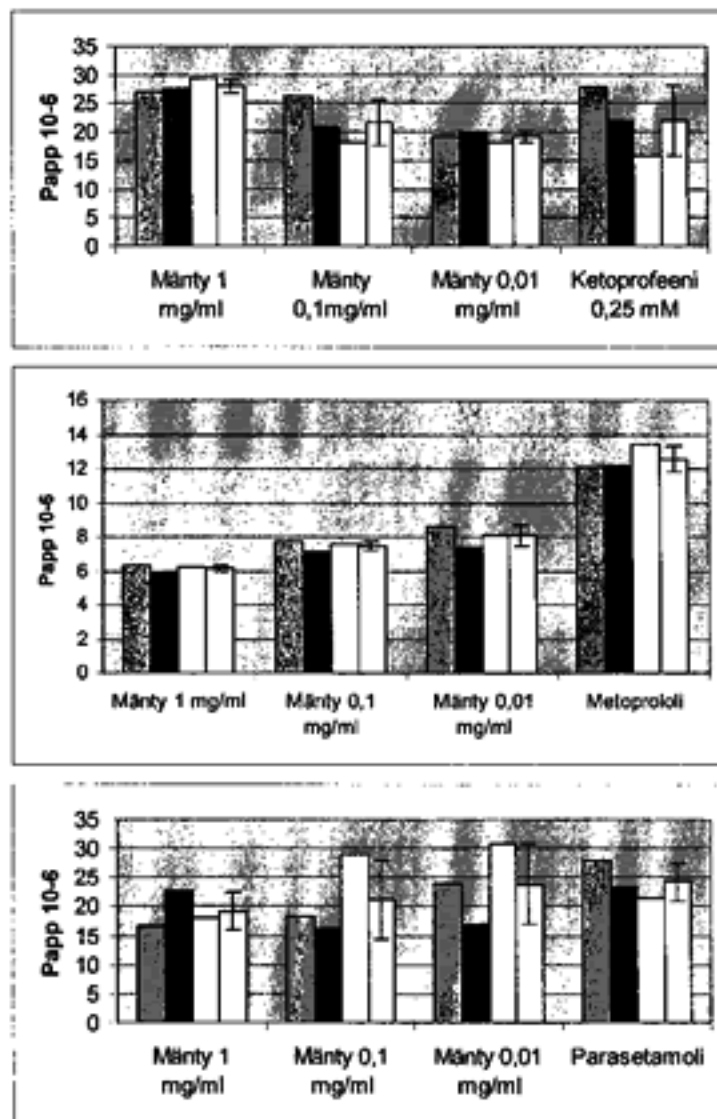
joita estävät COX-2 entsyymin aktiivisuutta ja tätä kautta se vähentää muodostuvien prostaglandiinien määrää.

Vaikutus tulehduksen välittäjäaineisiin	Havupuu-uutejuoma, pitoisuus soluviljelmässä	
	1 %	2 %
Typpioksidin (NO) tuoton esto (%)	10 %	17 %
Tulehduksessa indusoituvan typpioksidisyntaasin (iNOS) ilmentymisen esto (%)	ei vaikutusta	24 %
Prostaglandiinin (PGE ₂) tuoton esto (%)	54 %	60 %
Tulehduksessa indusoituvan COX-2 entsyymin ilmentymisen esto (%)	ei vaikutusta	ei vaikutusta

4. Edistetutkimukset Caco-2 soluviljelmillä *in vitro*

Männynkuoresta ja -nihilasta valmistettu Havupuu uutejuoma (kuivattuna) esti pitoisuudella 1 mg/ml selvästi metoprololin imeytymistä (kuvat alla). Uutejuomalla tehty pitoisuussarja osoittaa myös pitoisuus-vaikutus riippuvuutta imeytymisen estolle. Tutkitut Havupuu uutejuoma -näytteet eivät olleet sytotoksisia Caco-2 soluille (MTT-testillä määritettynä).





Kuva . Havupuu uutejuoman (kuvassa Mänty) vaikutus mallilääkeaineiden kulkeutumiseen Caco-2 solukerroksen läpi. P_{app} -arvo kuvaa kulkeutumishopeutta pinta-alaa kohden.

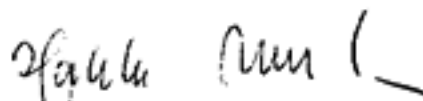
Yhteenveto

Nuoren männyn kuoresta ja nilasta valmistettu Havupuu uutejuoma sisältää erityyppisiä fenolisia yhdisteitä, joista määrällisesti eniten resveratroliglukosidia ja katekiinia. Tunnistettujen fenolisten yhdisteiden yhteenlaskettu määrä Havupuu uutejuomassa on 489 µg/ml. Havupuu uutejuoma on erittäin tehokas antioksidantti, joka hidastaa elimistön LDL partikkelin hapettumista (antioksidanttiteho 95 % *ex vivo* testissä). Antioksidanttitehoon vaikuttavat Havupuu uutejuoman sisältämät fenoliset yhdisteet. Havupuu uutejuomalla havaittiin soluviljelmässä 1-2 % pitoisuutena selvä tulehduksen hillitsemiseen liittyvä prostaglandiinin tuottoa estävä vaikutus, mutta lisätutkimuksia tarvitaan saman ilmiön havaitsemiseksi elimistössä Havupuu uutejuoman nauttimisen jälkeen. Havupuu uutejuoma (kuivattuna) esti pitoisuudella 1 mg/ml selvästi metoprololin imeytymistä, mikä osoittaa että tuotteella on vaikutusta tiettyjen lääkeaineiden imeytymiseen. Havupuu uutejuoma (kuivattuna) ei ole sytotoksisinen Caco-2 soluille.

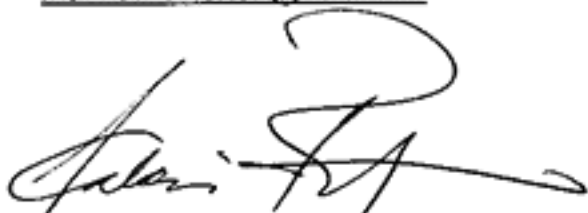
Helsingissä, Turussa ja Tampereella 12.11.2003



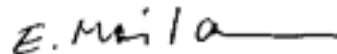
Marina Heinonen, professori
Helsingin yliopisto
Soveltavan kemian ja mikrobiologian laitos
Elintarvikekemian
marina.heinonen@helsinki.fi



Heikki Vuorela, professori
Helsingin yliopisto
Farmasian laitos
Farmakognosia
heikki.vuorela@helsinki.fi



Kalevi Pihlaja, professori
Turun yliopisto
Kemian laitos
Ympäristökemian
kalevi.pihlaja@utu.fi



Eeva Moilanen, professori
Tampereen yliopisto
Lääketieteen laitos
Immunofarmakologia
eeva.moilanen@uta.fi