

■ Suomalaiset luonnonaineet uusina anti-infektiivinä



Carina Tikkanen-Kaukanen, PhD

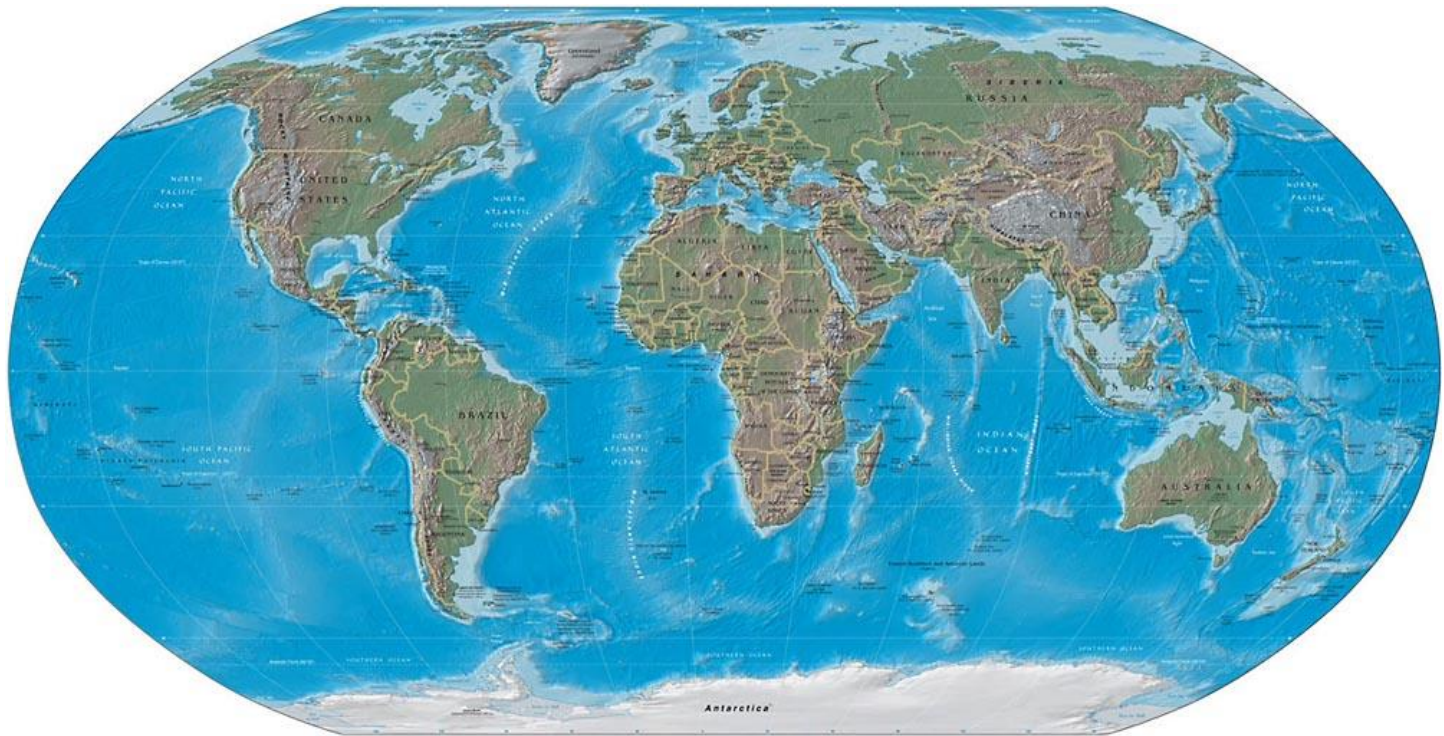
Adjunct Professor in Pharmaceutical Biology, University of Helsinki

Adjunct Professor in Public Health, University of Eastern Finland

Research Director of Food Sector, Finnish Organic Research Institute

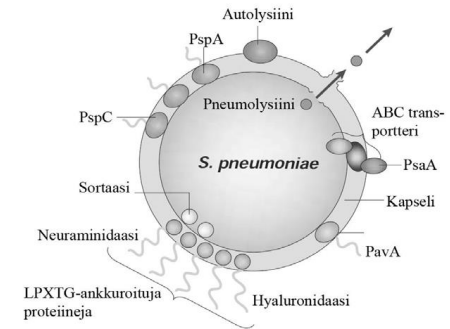
Visiting Scientist, University of Helsinki, Ruralia Institute

Antimicrobial resistance (AMR)



Osasto /
Henkilön
nimi /
Esityksen
nimi

AMR



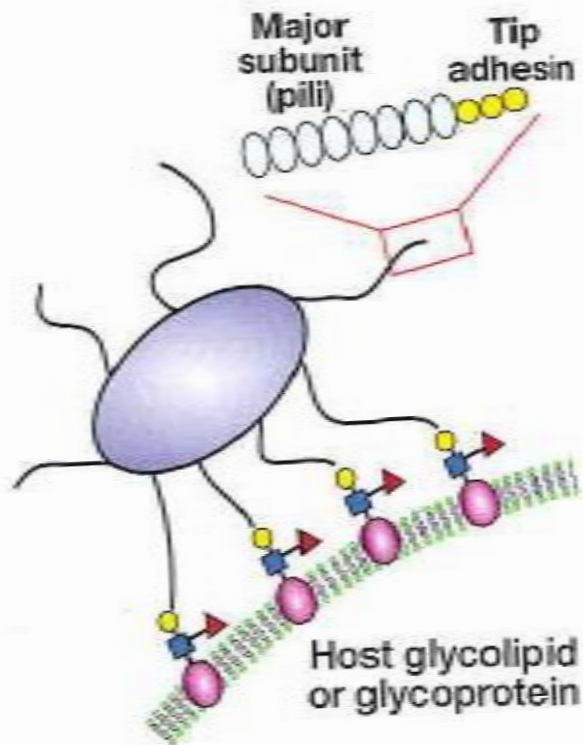
- Global: covers every country, every human-being
- Comparable to climate change problems in size (Laxminaryan et al, Lancet 2013)
- New antibiotics are not available in the near future
- Antibiotics do not reach those who need them (developing countries)
- Pneumococcus: over 1 million children death yearly
- Pneumococcus: one of the main resistant bacterial strains (7)
- DEATH; SUFFER; ECONOMIC LOSSES

Fighting against AMR

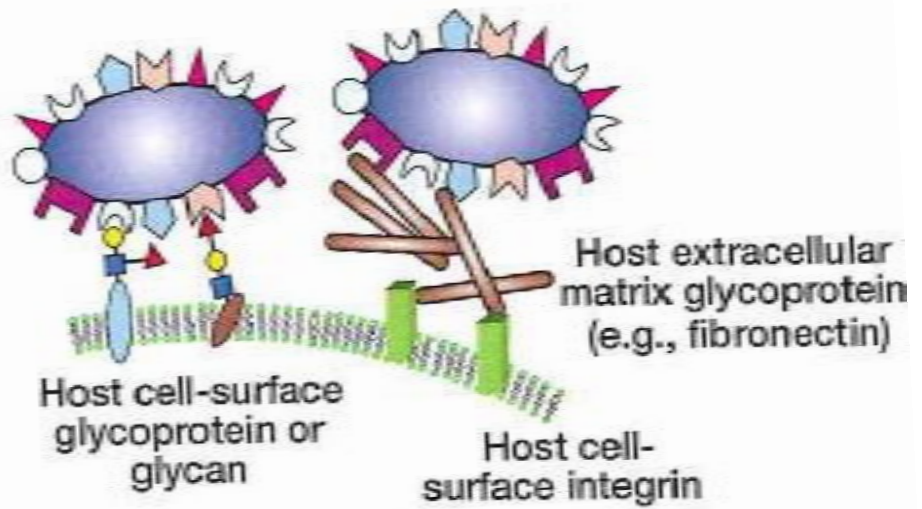
- Natural alternatives in prevention and cure
- Anti-adhesion therapy and natural antimicrobials

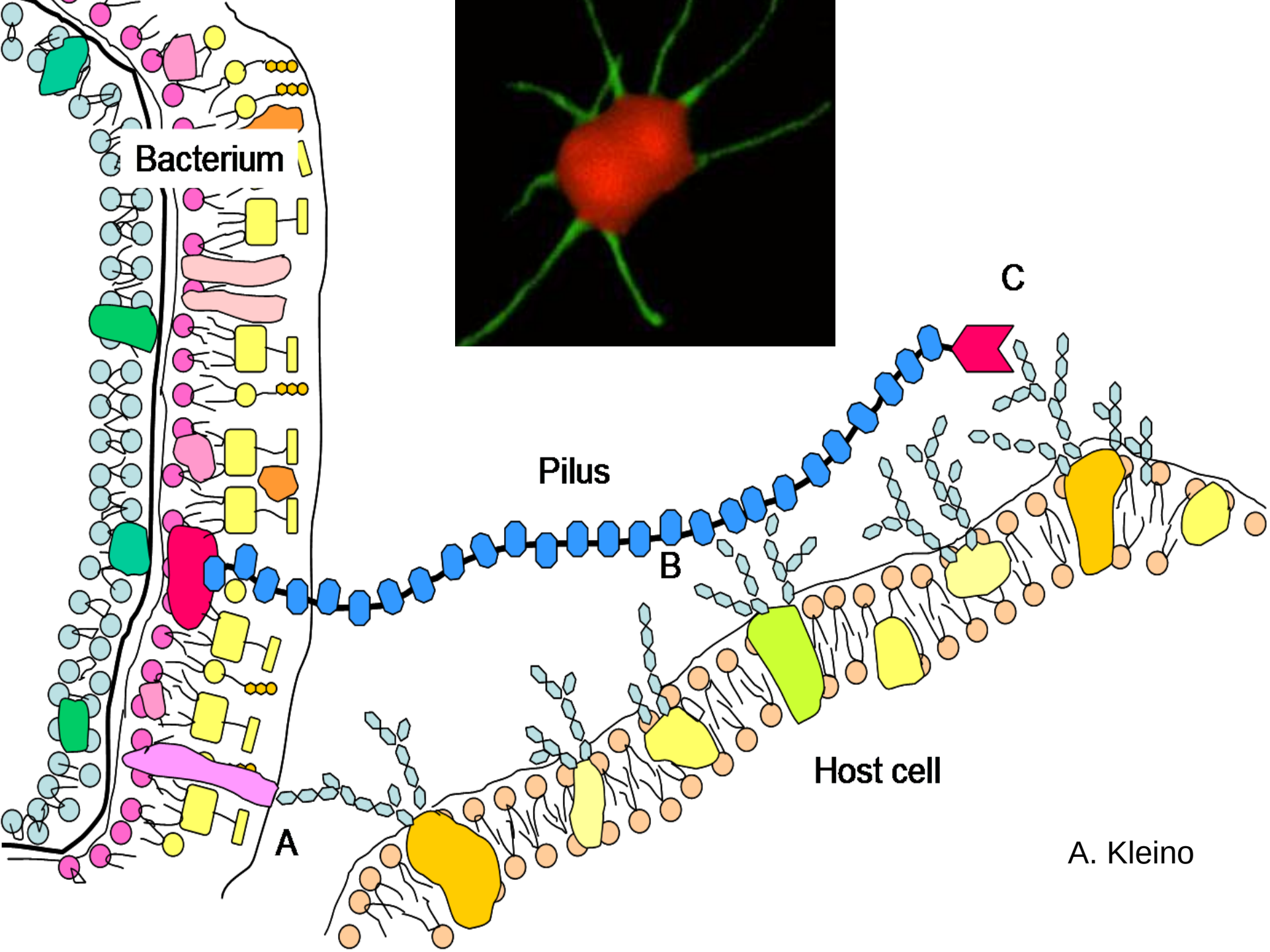
Bacterial adhesion

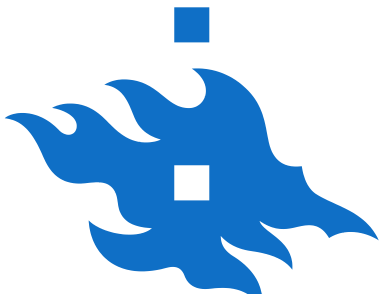
a) Pili or Fimbriae



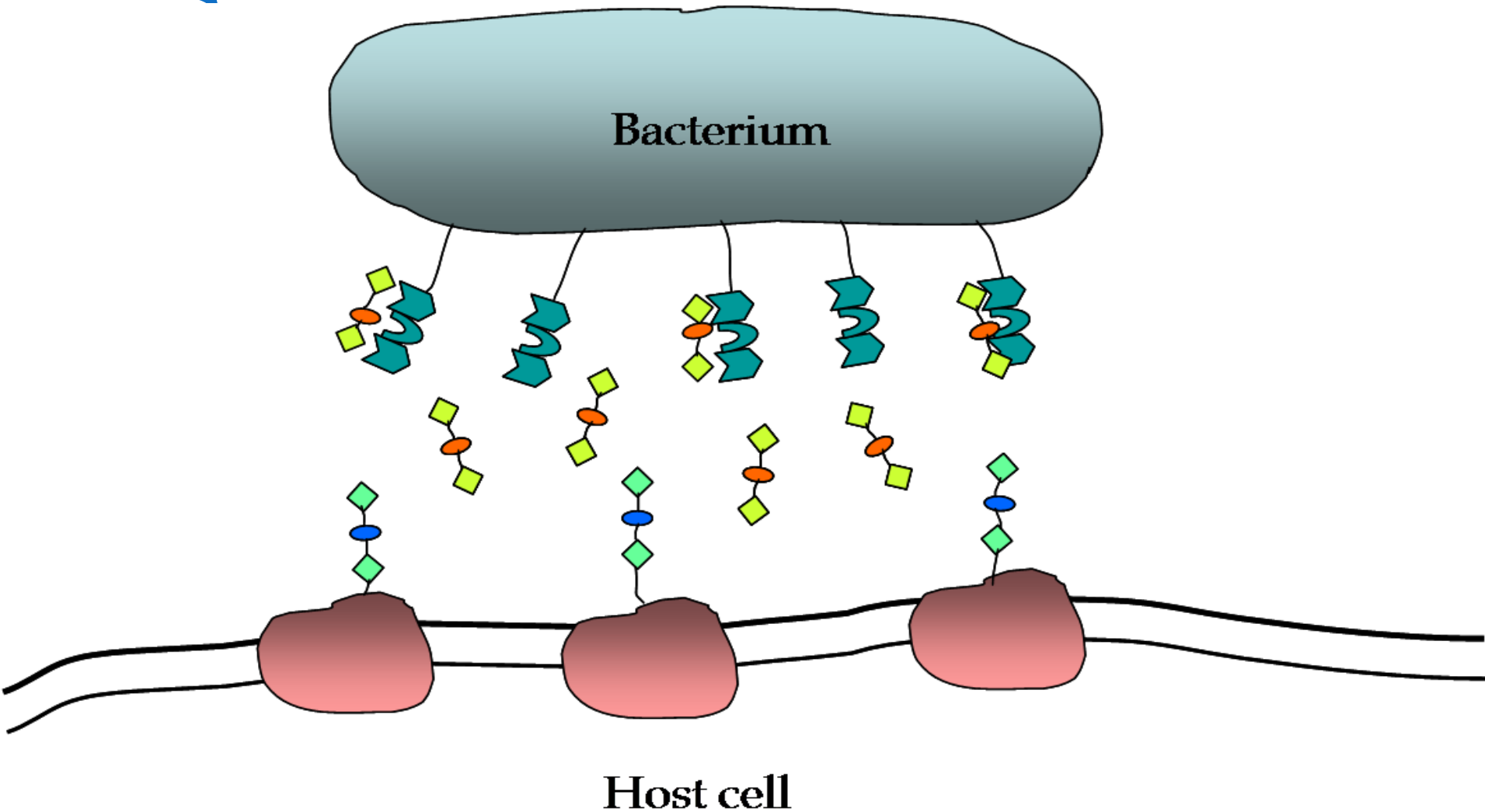
b) Afimbrial Adhesins







Anti-Adhesion Therapy



A. Kleino according to Zopf and Roth, Lancet 1996

Amerikan karpalo (*Vaccinium macrocarpon*)

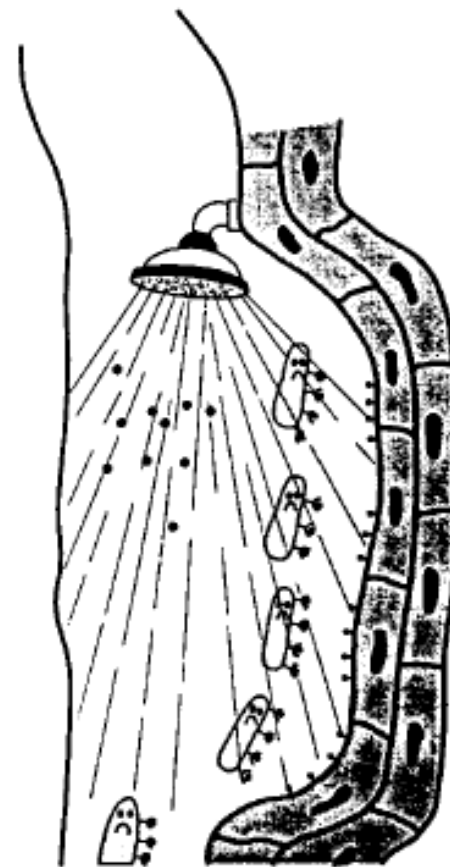
- *E. coli* (virtsatieinfektiot) myös karpalo-puolukka-mehu
- *Helicobacter pylori* (vatsahaava, pohjukaissuolihaava)
- Mutans streptokokki (suun patogeeni) (Zafriri et al 1989; Shmueli et al 2004; Weiss et al 2004)
- Karpalon antiadheesio-aktiivisuus on osoitettu johtuvan hiilihydraateista sekä fenolisista **proantosyanidiineista** *E. coli* ssa karpalon proantosyanidiinit on identifioitu inhiboivan P-fimbriallista Gal-alpha1-4Gal- tunnistavaa *E. coli* a (Foo et al 2000).), mutta fruktoosi inhiboi mannoosi specifistä (tyyppi 1) fimbriallista *E. coli* (Zafriri et al 1989).

Antiadhesion

ADHESION PROTECTS INVADING
MICROORGANISM FROM ELIMINATION
BY NATURAL CLEANSING MECHANISMS



INHIBITORS OF ADHESION
PREVENT INFECTION



Keruutuotteet



- **Metsämarjojen** terveysvaikutukset (mm. anti-infektiivisyys) - runsaasti tutkimuksia
- Sienet (proteiinilähde, terveysvaikutukset, tutkimuksia)

Erikoistuotteet:

- Mahla
- **Antimikrobinen pihka** (tutkimuksia / tuotekehitys: Arno Sipponen),
- **Pakurikäöpä:** positiivinen vaikutus immunteettiin + antiviral

Healthy food from fields and forests - honey



- Flowers as a source for nectar
- Biodiversity essential for bee survival
- Multifloral honeysf from forest and field flowers
- Unifloral honeys (in our study):
 - *lingonberry honey, cloudberry honey, heather honey, willow herb honey, buckwheat honey*

Food from fields – milk

- The impact of feed on milk composition - anti-infective oligosaccharides
- Organic milk!

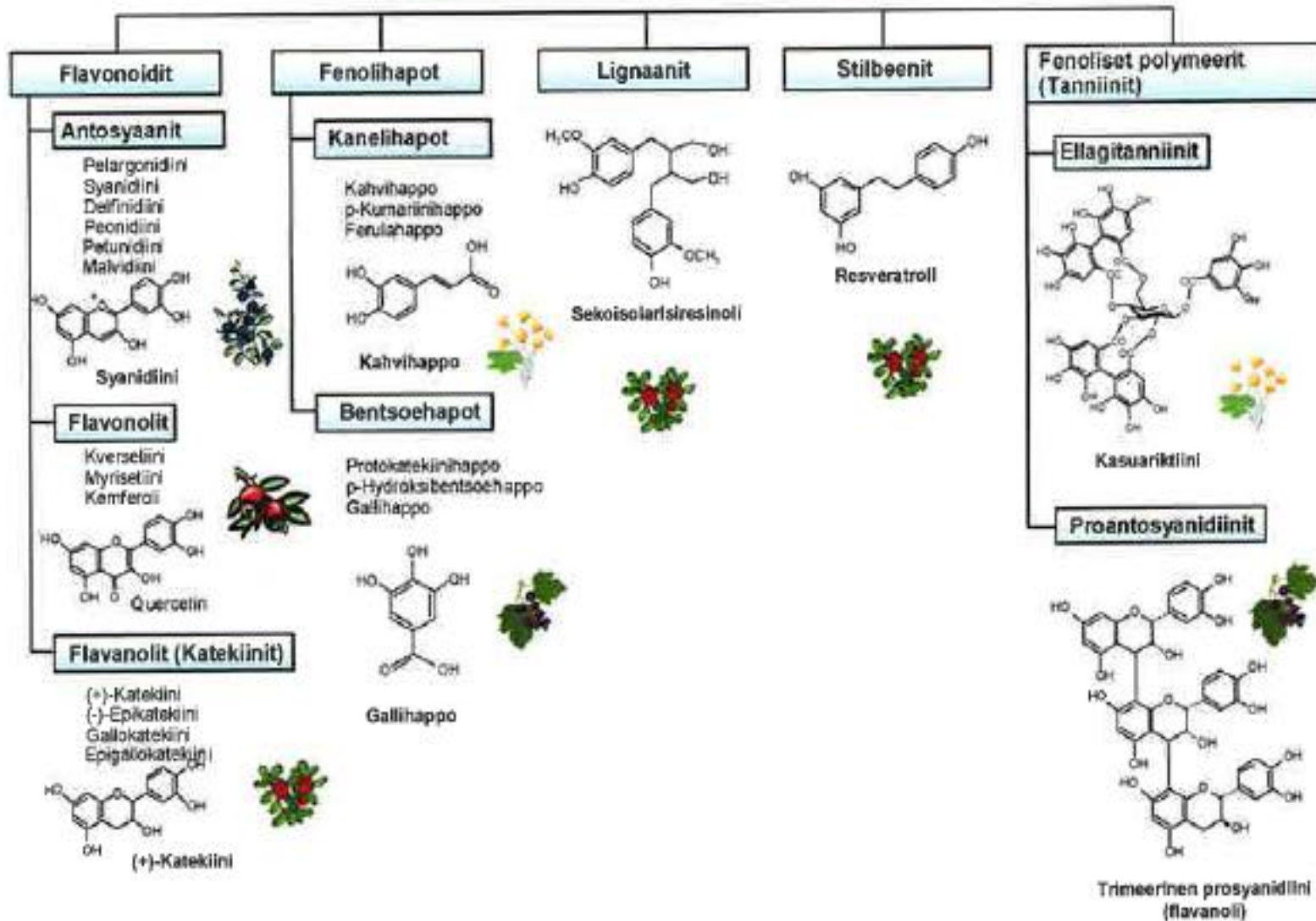


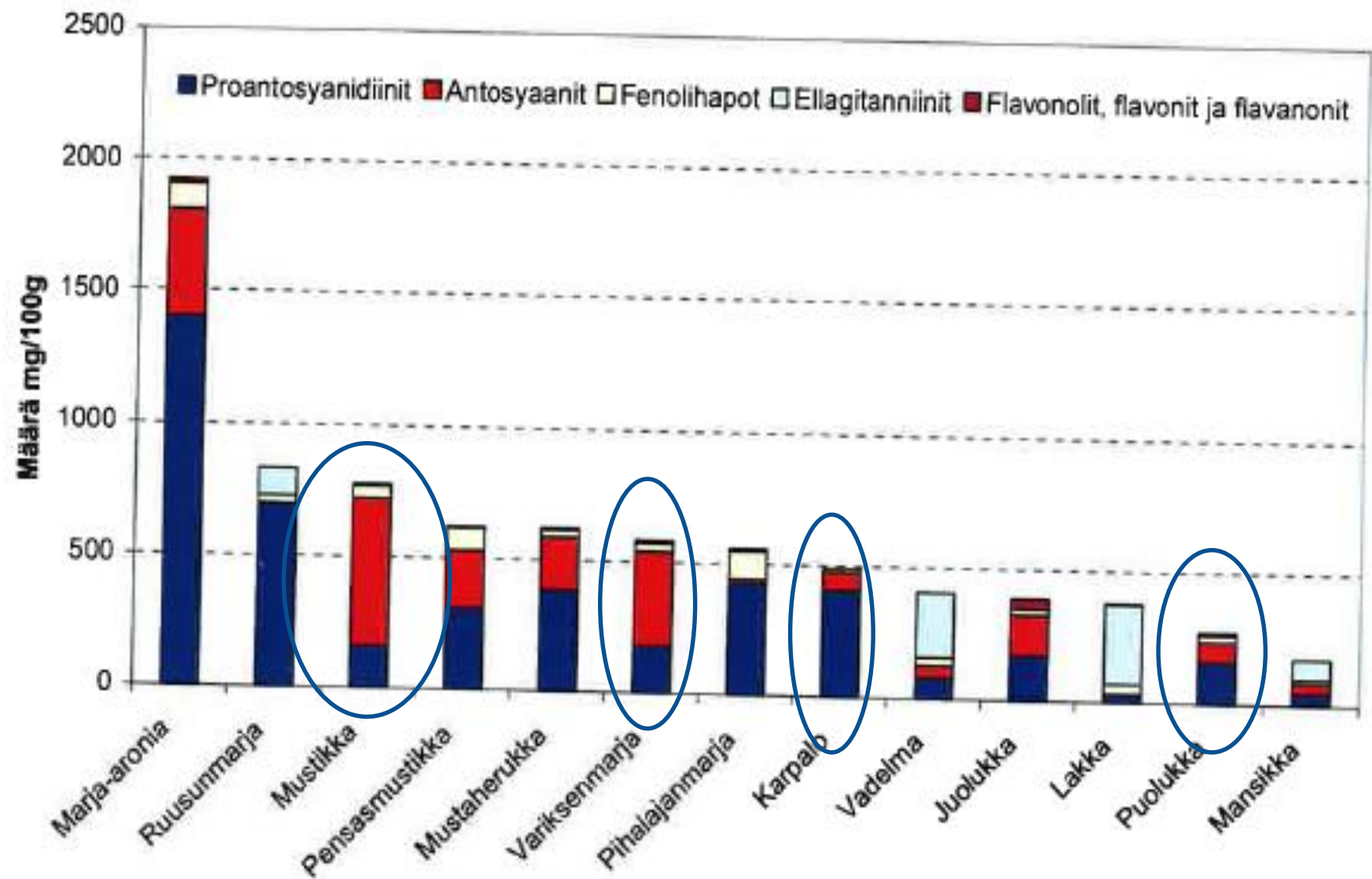
Marjat sisältävät



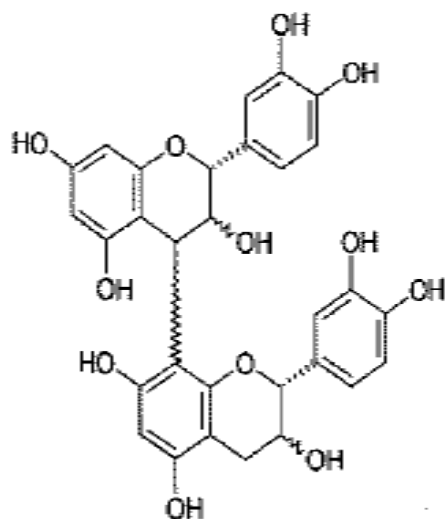
- Vettä 80-90%
- Kuitua (enemmän kuin hedelmissä)
- Vitamiinit: C, E, A
- Kivennäisaineet: Ca, Mg, Fe, Se, P, K
- Rasvahapot (mm. n-3,n-6)
- Luonnon väriaineet - fenoliyhdisteet
- Aromit
- Orgaaniset hapot

Marjojen fenolijyhdisteet

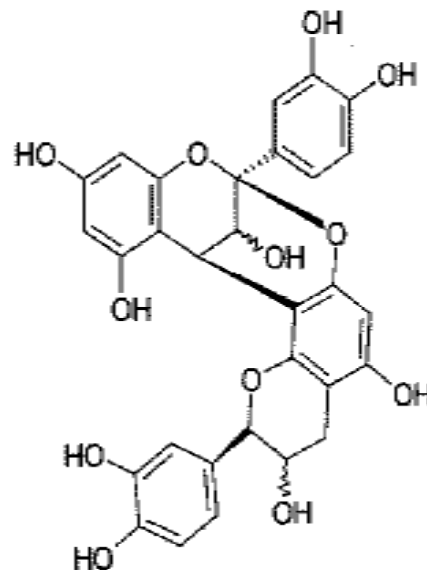




Proantosyanidiinit



Dimer B



Dimer A

Healthy berries

- Consumption of berries about 40 g /day in Finland
- Health impacts with over 100g/per day

- Favorable impact on brain health and anti-aging
- Protective role in cardiovascular diseases
- Favorable to eye health (bilberry)
- Antiviral, antibacterial, antifungal and antiallergenic effects
- Anti-cancer properties



In vitro (laboratorio)tutkimuksia



- Estää haitallisten suolistobakteerien kasvua
 - (lakka, vadelma + monet muut)
- Estää helikobakteerin kasvua ja kiinnittymistä mahan limakalvolle
 - karpalo, mustikat, vadelma, lakka, mansikka, mustaherukka
- Estää syöpäsolujen kasvua
 - mustikka, marja-aronia, lakka + monet muut
- Suurempi antioksidanttivaikutusteho kuin muilla elintarvikkeilla (useimmat marjat)



Koe-eläimillä tehtyjä tutkimuksia



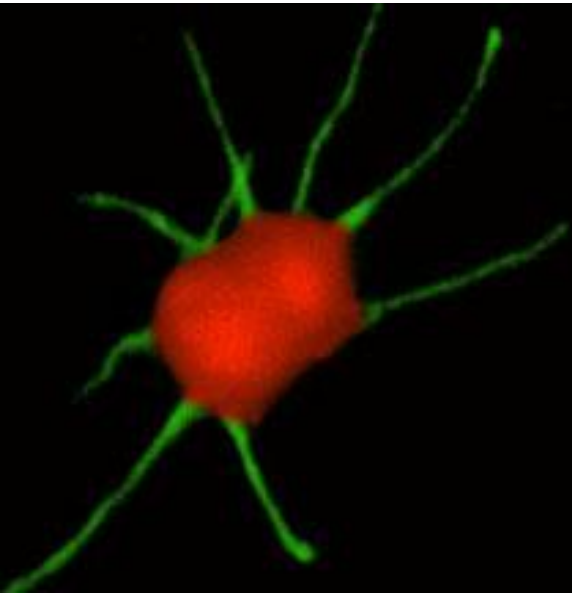
- Estää ikääntymiseen liittyviä muutoksia kognitiivisissa ja motorisissa toiminnoissa (mustikka)
- Estää kasvainten muodostumista ruokatorvessa (mansikka, mustavadelma, karhunvatukka)
- Vähentää kasvainten muodostumista paksusuolella (mustikka, marja-aronia)
- Estää ja parantaa mahahaavaa (tyrniöljy)
- Lievittää tulehdusta ja kipua (tyrniöljy)

Ihmisillä tehtyjä tutkimuksia



- Suojaa virtsatietulehduksilta (karpalo, karpalo-puolukka)
- Vähentää kariesta aiheuttavia bakteereja (karpalosuuvesi)
- Suurentaa hieman aterianjälkeistä antioksidanttikapasiteettia
- Parantaa hämärässä näkemistä (mustikka, mustaherukka)
- Alentaa hieman LDL-kolesterolia (mustaherukka), ja nostaa HDL-kolesterolia (tyrniöljy)
- Lievittää atooppista ihottumaa (tyrnin ja taikinamarjan öljy)
- Voimistaa veren hyytymistä estävien lääkkeiden tehoa (karpalo)

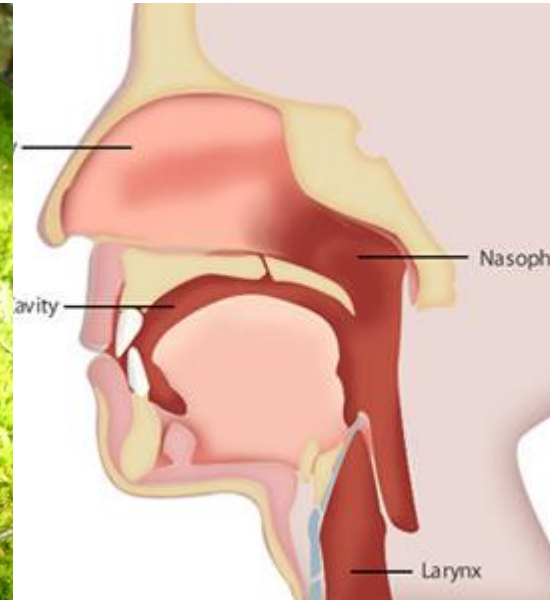
Oma tutkimus: BerryTherapy projekti



Inserm U570, Paris



M. Toivanen



Marjat

Vaccinium marjat

- Puolukka (*V. vitis-idaea*)
- Mustikka (*V. myrtillus*)
- Karpalo (*V. oxycoccos*)

Variksenmarja

(*Empetrum nigrum*)

Mustaherukka

(*Ribes nigrum*)

Muita: lakka, vadelma, hapan kirsikka, tomaatti, ananas, verigreippi

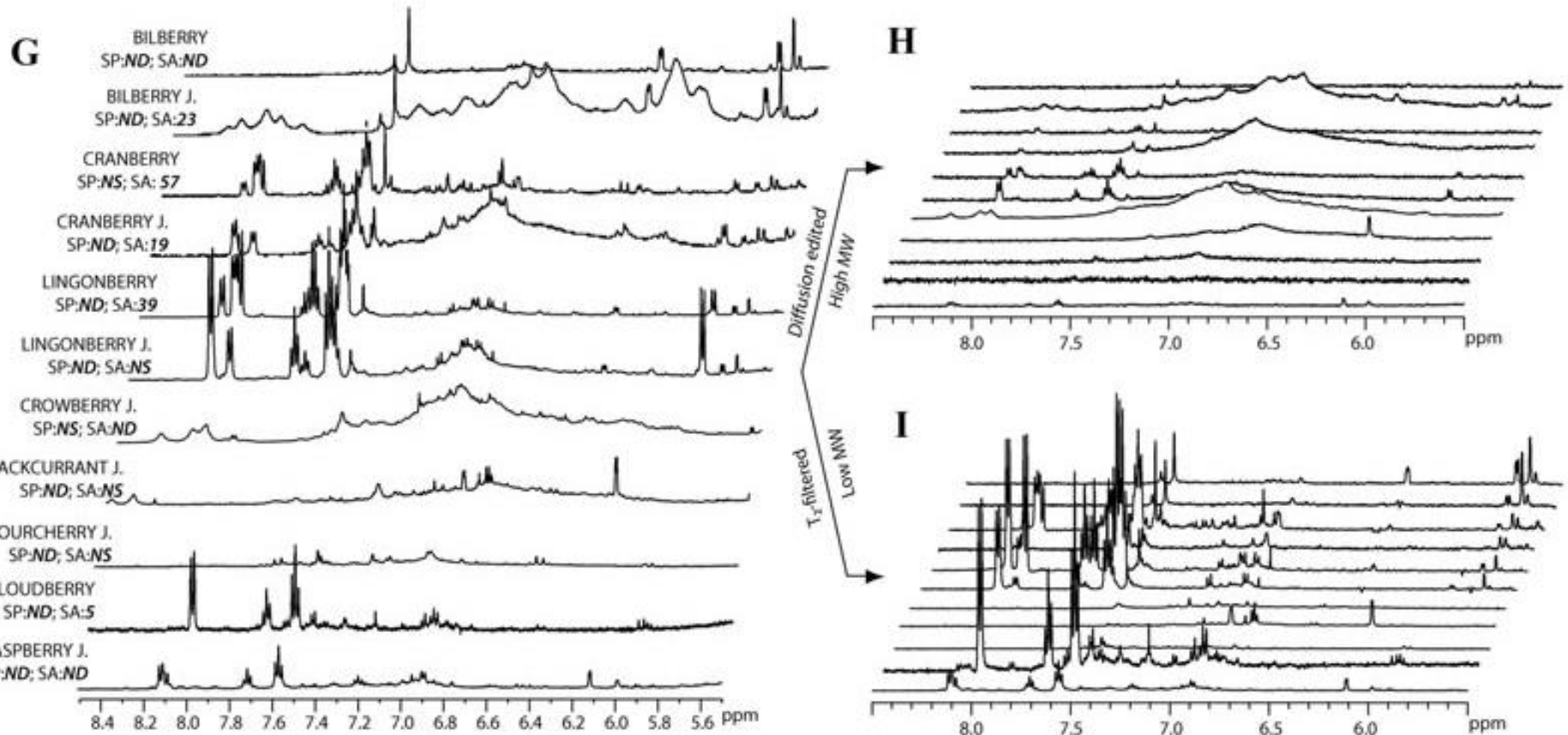


Sokeri-, proantosyanidiini- ja antosyaniini-pitoisuudet (molekyylikoko-)marja- ja hedelmäfraktioissa

product	sugars (mg/mL)			proanthocyanidins (mg/g)			anthocyanins (mg/g)		
	FI	FII	FIII	FI	FII	FIII	FI	FII	FIII
<i>Vaccinium myrtillus</i>									
bilberries	43	35	42	tr	1	1	nd	1	nd
bilberry juice	178	160	204^b	3	6	7	tr	14	39
<i>Vaccinium oxycoccos</i>									
cranberries	21	37	31	tr	3	2	nd	1	tr
cranberry juice	83	104	174	1	10	30	nd	1	4
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>									
lingonberries	42	37	42	1	10	1	nd	1	tr
lingonberry juice	113	187	152	4	22	9	nd	3	1
<i>Empetrum nigrum</i>									
crowberry juice	136	177	232	2	14	27	1	16	38
<i>Ribes nigrum</i>									
black currant juice	96	20	27	1	3	2	1	tr	nd
<i>Citrus paradisi</i>									
red grapefruit juice	124	162	212	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Prunus cerasus</i>									
sour cherry juice	139	151	188	1	6	3	tr	2	1
<i>Malus domestica</i>									
apple juice	188	228	177	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Rubus chamaemorus</i>									
cloudberries	43	36	35	nd	nd	nd	tr	nd	nd
<i>Ananas comosus</i>									
pineapple juice	118	91	258	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Rubus idaeus</i>									
raspberry juice	127	153	166	1	4	2	tr	2	1
<i>Solanum lycopersicum</i>									
tomato juice	50	61	65	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a Abbreviations: FI, <10 kDa fraction; FII, 10–100 kDa fraction; FIII, >100 kDa fraction; tr, traces; nd, not detected. ^b Juice fractions chosen for further analyses based on biological assay are marked in bold.

FIII-marjafraktioiden NMR-spektrit



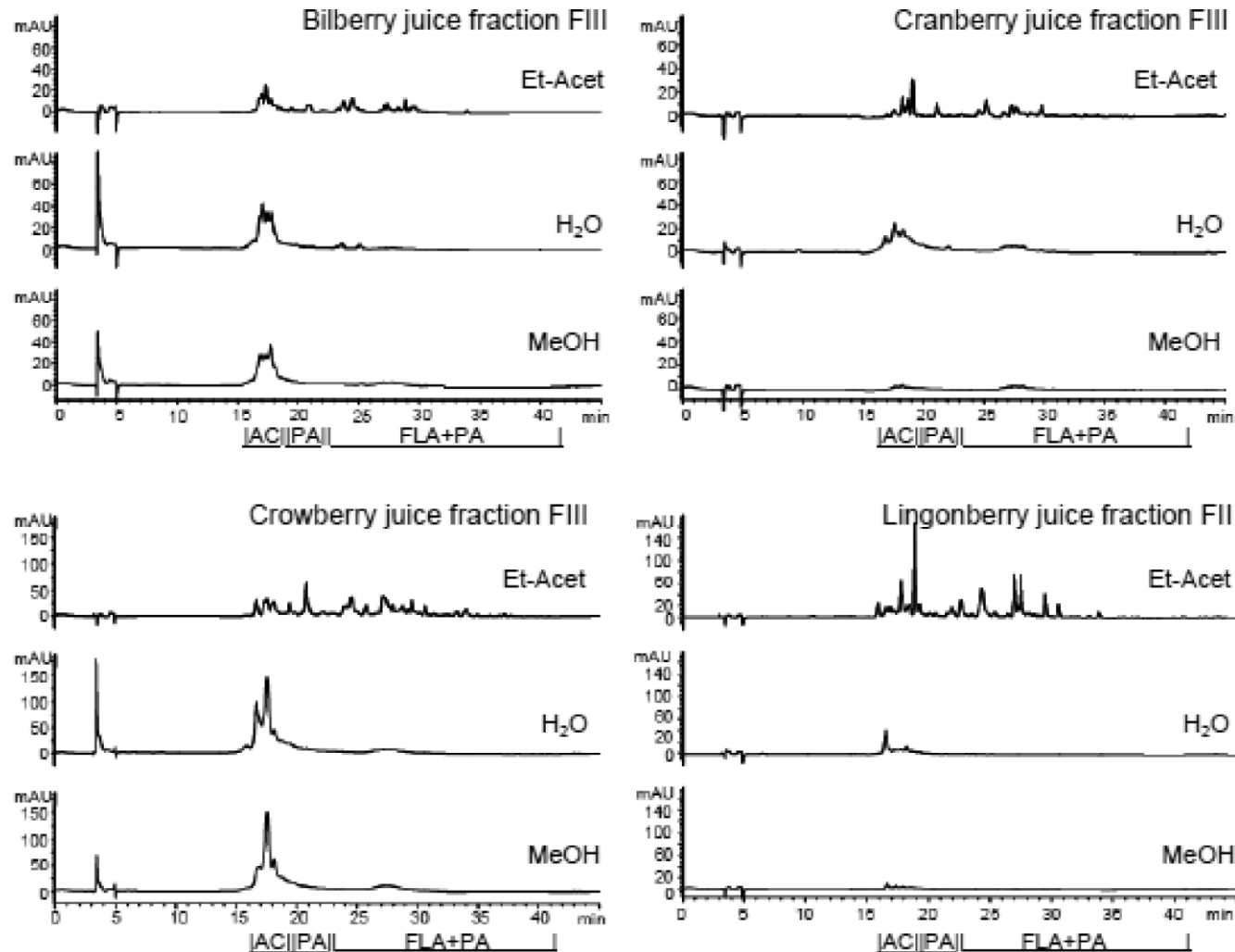
G = standard proton spectra

H = diffusion edited spectra - high MW compounds

I = T₂-filtered spectra - low MW compounds

(Toivanen et al, Phytother.Res 2010a)

Alafraktioiden RP-HPLC-DAD

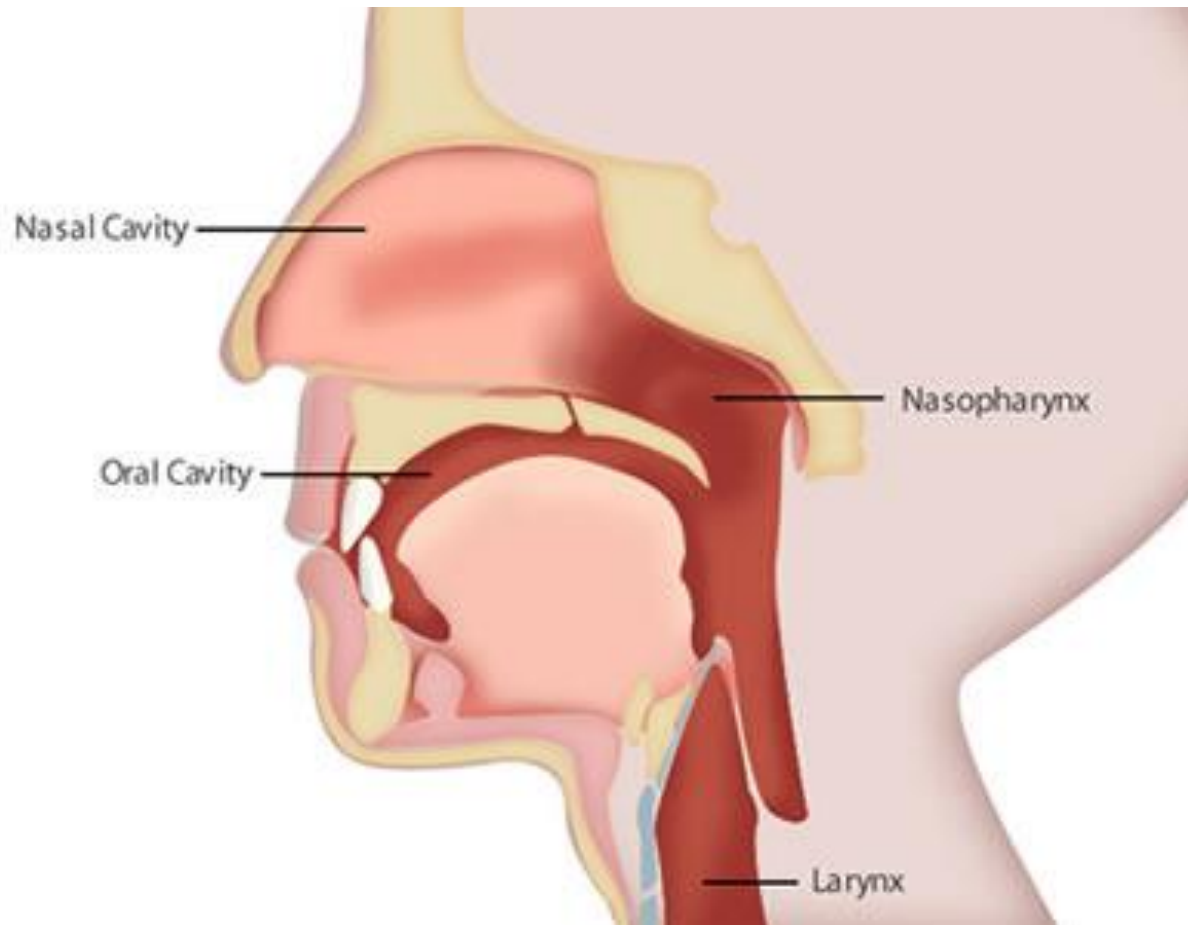


Et-Acet: flavonol glycosides + proanthocyanidins

H₂O: anthocyanins + polymeric proanthocyanidins

MeOH: anthocyanins + polymeric proanthocyanidins

Nenänielun alue tarttumiskohteena



Bakteerit (omassa tutkimuksessamme)

Neisseria meningitidis

- aivokalvontulehdus, sepsis

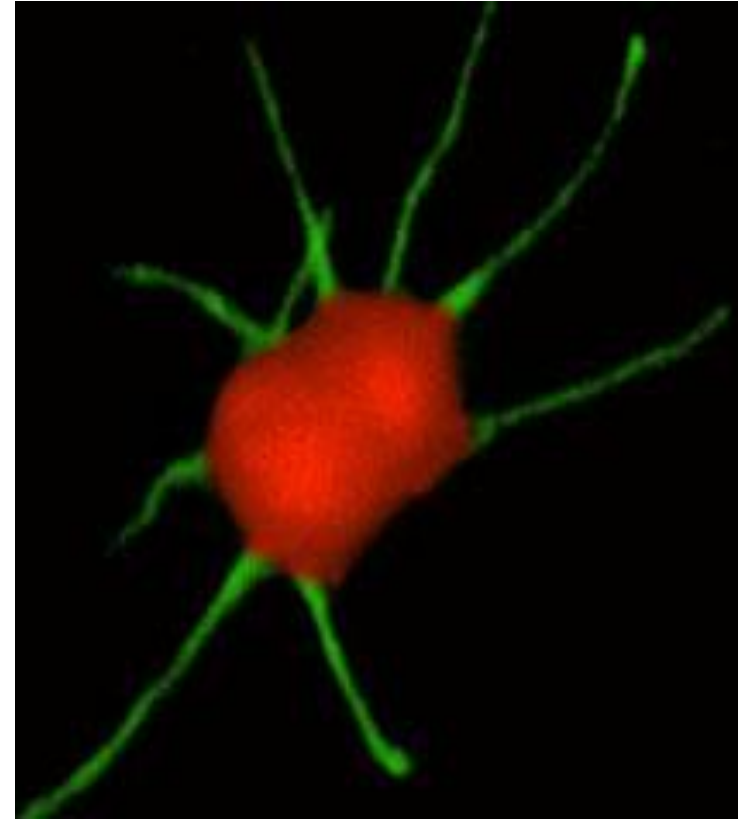
Useat streptokokit mm.

Streptococcus pneumoniae

- keuhkokuume
- hengitystieinfektiot

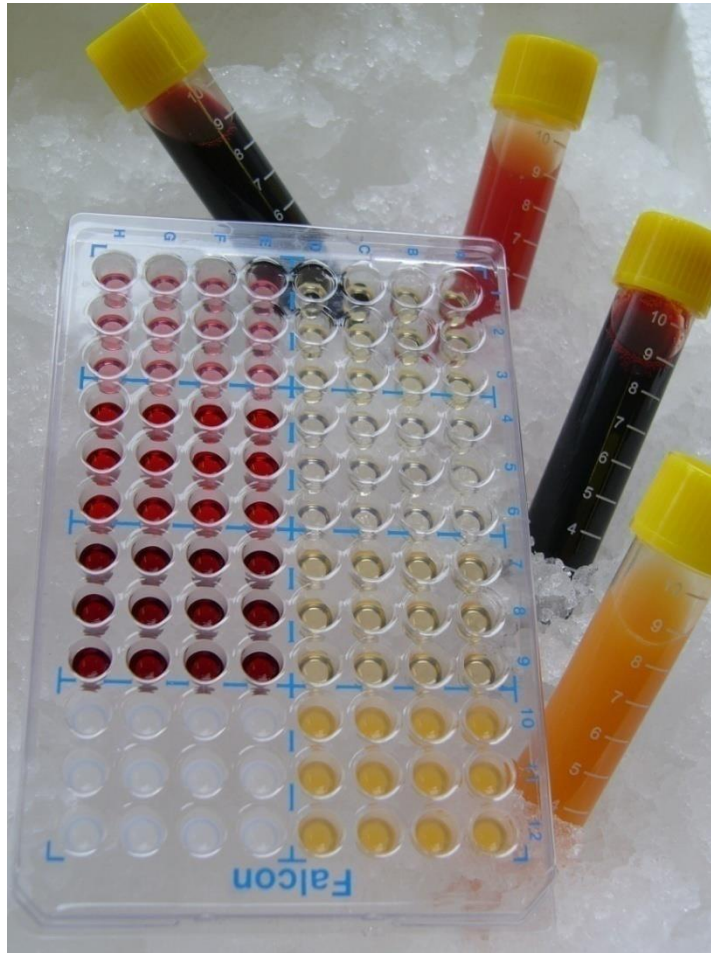
Suun patogeenit

- hammaskariekseen liittyvät



Inserm U570, Paris

Mikrotiitterikuoppalevykoe



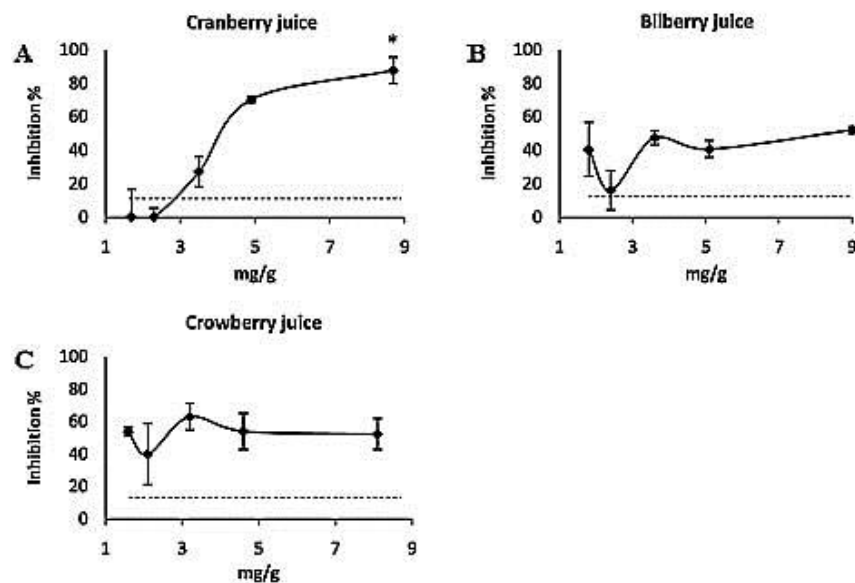
M. Toivanen

Streptococcus pneumoniae

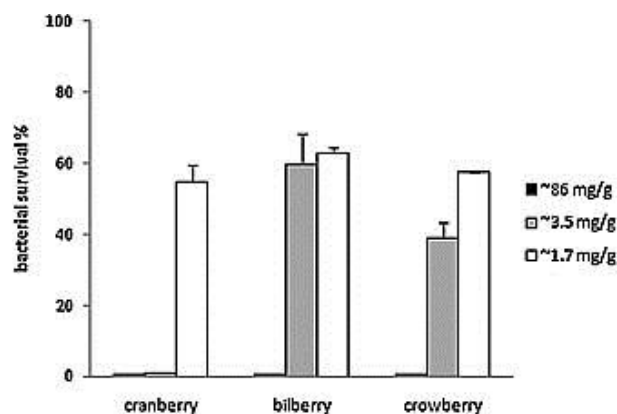
Omia tutkimustuloksia



Inhibition Activity of Wild Berry Juice Fractions against *Streptococcus pneumoniae* Binding to Human Bronchial Cells



Antimicrobial Activity of Wild Berry Juice Fractions against *Streptococcus pneumoniae*



Bioaktiiviset marjat tässä tutkimuksessa (kaikki tutkitut bakteerit)

Vaccinium marjat

- Puolukka (*V. vitis-idaea*)
- Mustikka (*V. myrtillus*)
- Karpalo (*V. oxycoccos*)

Variksenmarja

(*Empetrum nigrum*)

Mustaherukka

(*Ribes nigrum*)



Kliiniset kokeet

- Tutkittiin mustikan ja puolukan fenolisia yhdisteitä sisältäviä tuotteita
- 2 pilot-koetta tehty
 - Eettisen toimikunnan puoltava lausunto
 - Lääkärin valvonnassa
 - Kaksoisokko-, plasebo-kontrolloituja
- Yhteistyö elintarviketeollisuuden kanssa (tuotteiden valmistus)

1) Mustikan ja puolukan polyfenoleja sisältävä pastilli hammasbakteereja vastaan

2) Mustikkamehututkimus hengitysinfektioita vastaan ja vaikutus nenänielu-kantajuuteen

Kliiniset kokeet

- Teknisesti onnistuneita
- Ongelmat:
- Tutkittavien rekrytointi ja sitoutuminen (terveet aikuiset)
- Tuotteen maku, suun värjäytyminen
- Kontrollituotteen valmistus vaativaa elintarvikkeella, jotta ei erotu tutkimustuotteesta (väri, maku)
- Tarvittavan tutkimustuotteen ja kontrollituotteen (mehu) määrä suuri
- Pitkäaikainen seuranta
- Pieni otos ja lyhyt aika pilottikokeissa, ei tilastollista merkittävyyttä – tarvitaan laajempi koe

Honey

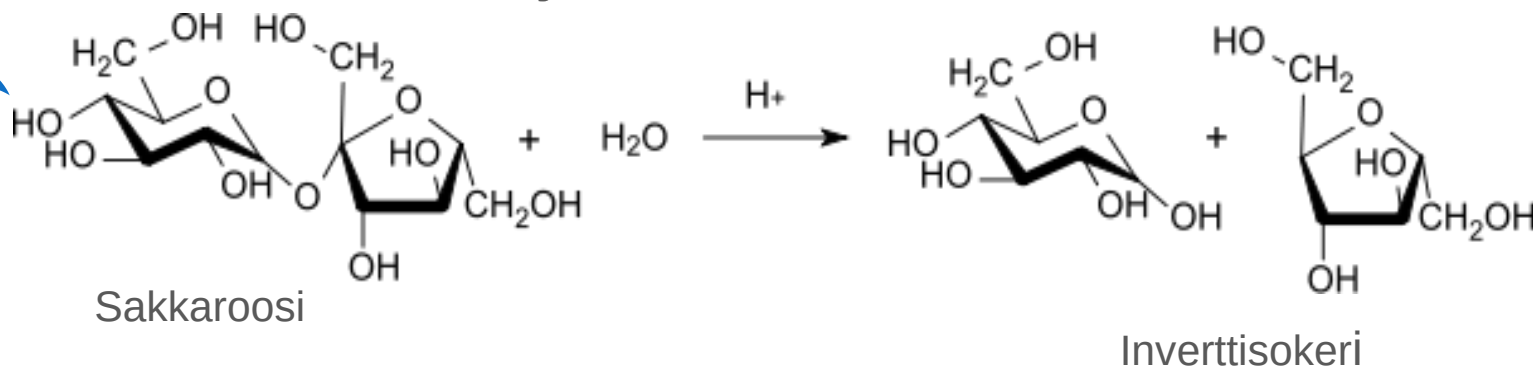


- Honey bees are the oldest social insects in the world (over 120 million years).
- Honey as antimicrobial is under intensive research: PubMed; 27 articles (2016) and over 1000 in total (honey and antimicrobial)





Hunajan koostumus



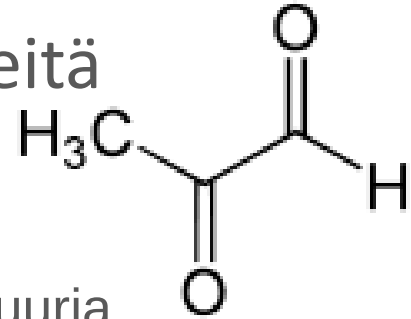
- Hunaja sisältää **70-80% inverttisokeria**, joka on glukoosin ja fruktoosin seos. Siinä on pieni määrä sakkaroosia (n. 1%). Hunajassa on myös maltoosia (n. 7%) sekä suurempia sokereita (n. 1-2%).
- Hunaja sisältää lisäksi vettä (n.17%) sekä vähäisiä määriä **proteiineja**, orgaanisia happoja, asetyylikoliinia, haihtuvaa öljyä, mineraalisuoloja ja **fenolisia yhdisteitä ja siinä muodostuu laimennettaessa vetyperoksidia**.
- Hunaja sisältää **aldonihappoa**, joka antaa hunajalle **happaman reaktion** (pH 3,3-4,9)

OMA TUTKIMUS



- I Muut suomalaiset hunajat kuin sertifioitua luomuhunajat
 - Yksikukkahunajat Suomen Mehiläishoitajain liitolta
 - Horsma-, kanerva-, lakka, puolukka- ja tattarihunajat
 - Sanna Huttunen, Kaisu Riihinen, Jussi Kauhanen & Carina Tikkanen-Kaukanen. Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. APMIS 2013, 121:827-234;
- II Suomalaiset ja ulkomaiset sertifioitua luomuhunajat
 - Monikukkahunajia paikallisilta mehiläishoitajilta / kaupasta 6 kpl
 - Djamila Oinaala, Ulrike Lyhs, Marjatta Lehesvaara & Carina Tikkanen-Kaukanen. Antimicrobial activity of organic honeys against food pathogenic bacterium *Clostridium perfringens*. Organic Agriculture 2015, 5: 153-159

Muita hunajan antimikrobisia yhdisteitä



- Antibakteerista **metyyliglyoksaalia** on löydetty suuria pitoisuuksia uusi-seelantilaisesta **Manuka-hunajasta** (100-1000 mg/kg vert. 1-10 mg/kg muut hunajat)(Adams et al 2008, Carbohydrate Res; Mavric et al 2008, Mol Nutr Food Res).
- Antibakteerinen kaikkia tunnettuja haavainfektioita aiheuttavia bakteereja vastaan
- Tehoa myös biofilmeihin
- **Mehiläisten hunajaan erittämä antimikrobinen defensin-1-proteiini** on löydetty Revamil medical grade -hunajasta Hollannissa (Kwakman et al 2010, FASEB J)
 - Aikaisemmin löydettiin mehiläisperäisestä kuningatarhyytelöstä (Fujiwara et al 1990, J Biol Chem).



Surgihoney

- Modifioitu hunaja luomuhunajasta (mikä tahansa kukkalähde)

- *Kliinisiä tuloksia:*

- Keisarinleikkausten jälkeiset haavat

Br J of Midwifery 2014, 22:23-27

- Afganistanin sotilaiden haavat (MRSA)

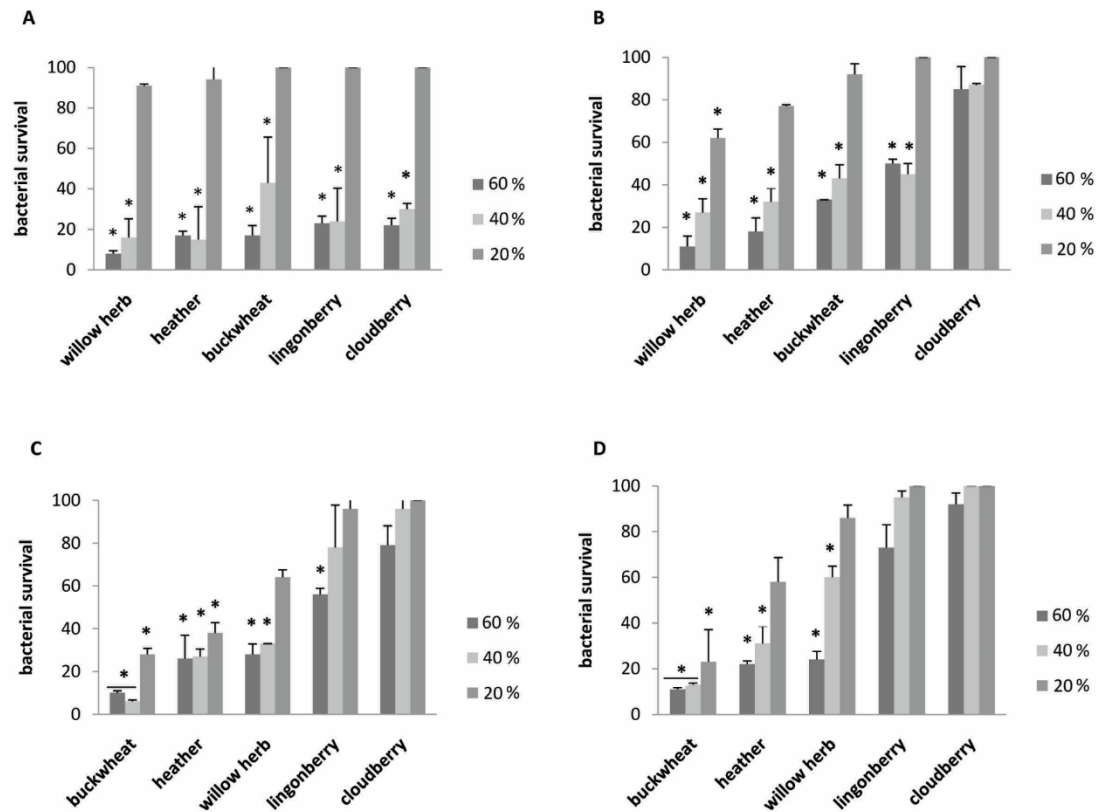
- *Menestys:*

- Helppo säilyttää ja käyttää (ei jääkaappia), halpa

Osasto /
Henkilön
nimi /
Esiteksen
nimi

Antimicrobial activity of Finnish monofloral honeys

Figure 1.



Applications

- Berries and honeys: functional (anti-infective) food
 - healthy consumers
 - for risk groups
 - in developing countries
- Food /animal fodder ingredients against spoilage organisms
- Therapeutic product development to humans /animals
- (eg. Medical grade honey against wound infections)

Special thanks

University of Helsinki. Rurality Institute

Djamila Oinaala, Ulrike Lyhs, AdjProf

University of Eastern Finland, Finland, Dept. of Pharm.
Chemistry,

Marko Toivanen, PhD (Pharm)

Sanna Pyykönen, MSc, doc student

Institute of Public Health and Clinical Nutrition

Jussi Kauhanen, Professor

Riitta Törrönen, AdjProf

Kaisu Riihinen, AdjProf

Pasi Soininen, AdjProf

Reino Laatikainen, Professor

University of Turku, Finland, Dept. Medical Biochemistry and
Molecular Biology

Vuokko Loimaranta, AdjProf

Sauli Haataja, AdjProf

Jukka Finne, Professor

KIITOS!



Kiitos!



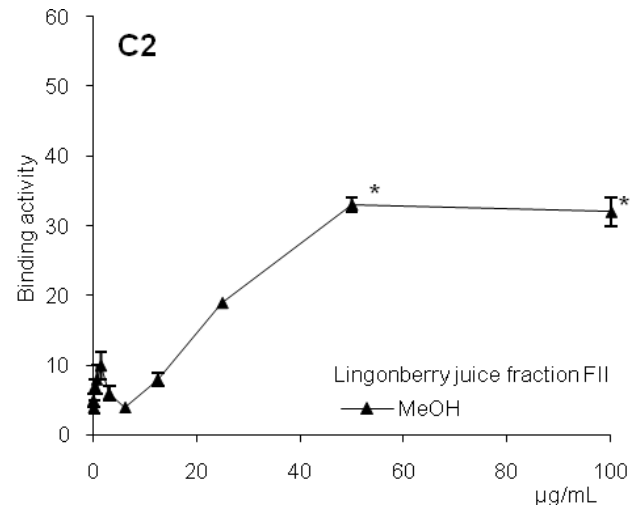
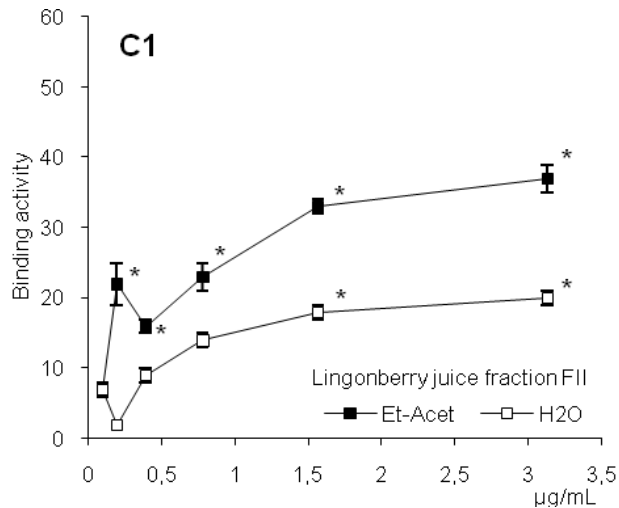
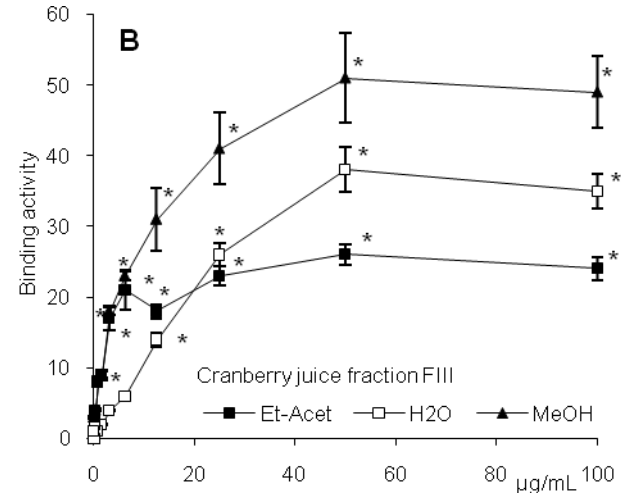
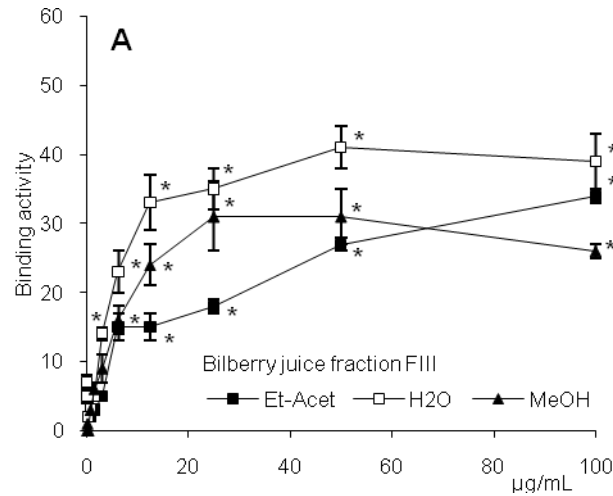
Publications

- Toivanen M, Ryyänänen A, Huttunen S, Duricová J, Riihinen K, Törrönen R, Lapinjoki S and Tikkanen-Kaukanen C (2009) [Binding of *Neisseria meningitidis* pili to berry polyphenolic fractions.](#) J Agric Food Chem. 57:3120-7.
- Toivanen M, Huttunen S, Duricová J, Soininen P, Laatikainen R, Loimaranta V, Haataja S, Finne J, Lapinjoki S and Tikkanen-Kaukanen C (2010) [Screening of binding activity of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus suis* to berries and juices.](#) Phytother Res. (2010) 24:95-101
- Riihinen K, Ryyänänen A, Toivanen M, Könönen E, Törrönen R and Tikkanen-Kaukanen C (2010) Antiaggregation potential of berry fractions against pairs of *Streptococcus mutans* with *Fusobacterium nucleatum* or *Actinomyces naeslundii*. Phytother Res. (2011)25:122-7
- Huttunen S, Toivanen M, Arkko S, Ruponen M and Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. Phytother. Res. (2011) 25:122-7
- Toivanen M, Huttunen S, Lapinjoki S and Tikkanen-Kaukanen C. Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. Phytother. Res. (2011) 25:828832

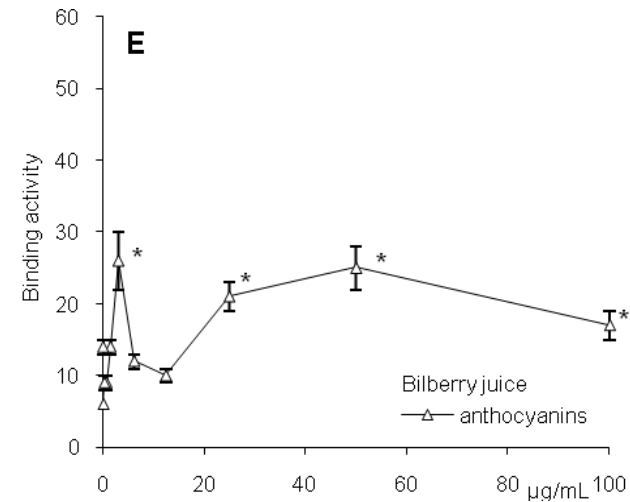
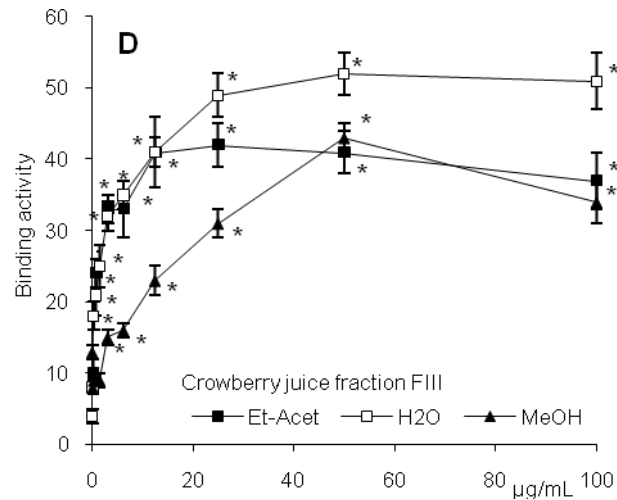
International Collaboration

- INSERM U570 Paris, France
- University of Illinois at Chicago, USA
- University of Baraton, Kenya
- Henan University, China
-

N.meningitidis-pilusten sitoutuminen alafraktioihin

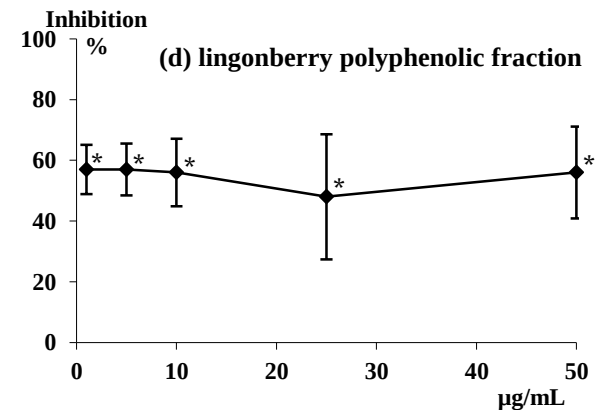
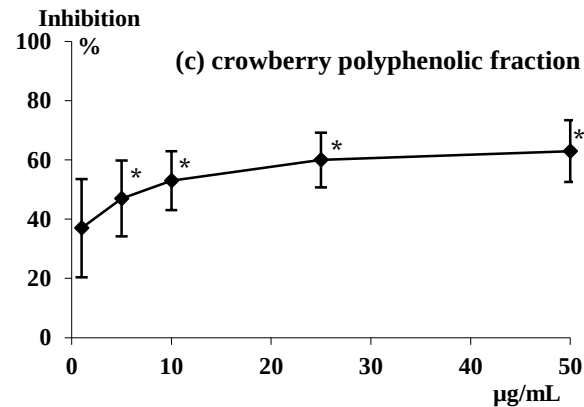
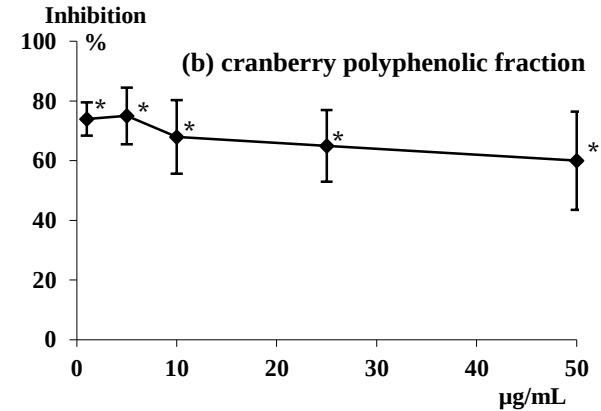
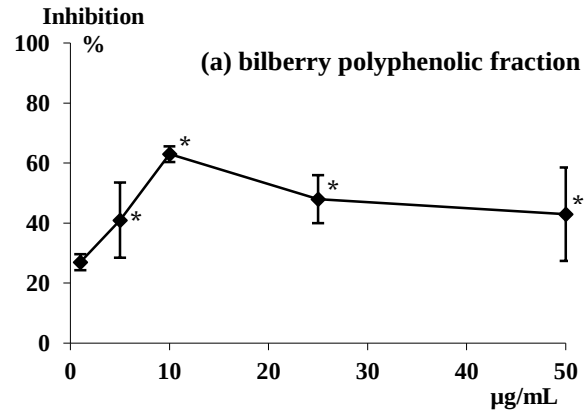


N.meningitidis-pilusten sitoutuminen alafraktioihin



(Toivanen *et al.* JAF 57: 3210-7, 2009)

Sitoutumisen inhibitio epiteelisoluhihin(HEC-1B) alafraktiot vs Nm



Alafraktioiden antimikrobisuus *N. meningitidis*-bakteeria vastaan

Toivanen *et al.* Phytother.Res 2010b

Concentration of polyphenols (µg/ml)	Bilberry juice	Cranberry juice	Crowberry juice	Lingonberry juice
1	90%	85%	≥100%	≥100%
25	100%	90%	100%	100%
50	100%	75%	100%	≥100%

Ampicillin (100 µg/ml): 45%

Scientific Collaboration

- INSERM U570 Paris, France (*Neisseria meningitidis* pathogens)
- Umeå University, Umeå, Sweden (bacterial adhesion)
- University of Illinois at Chicago, USA (NMR analyses, tuberculosis)
- University of Barathon, Kenya (herbal extraction, malaria, other human infectious diseases)
- University of Graz, Austria (berries)
- St. Petersburg State University (human pathogens)

Käytännön sovellukset

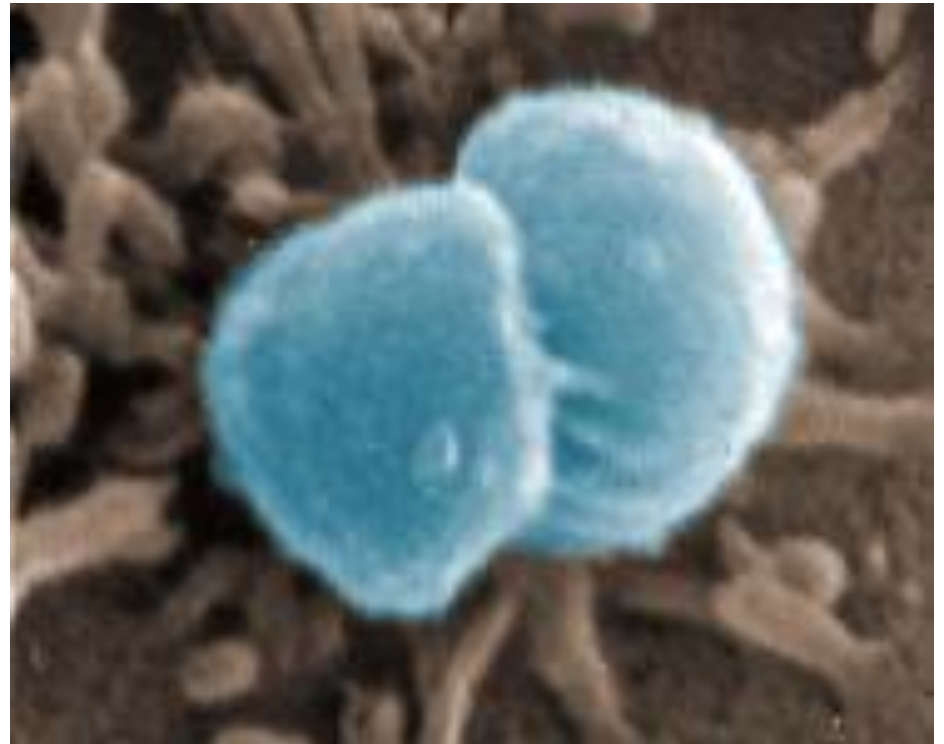
Anti-infektiivinen elintarvike, ravintolisä

- Terveille kuluttajille
- Riskiryhmille (vanhukset, sairaalapotilaat, päiväkotilapset, varusmiehet)

Anti-infektiivinen lääke

Neisseria meningitidis

- Meningiitti
- Sepsis
- Kolonisaatio ihmisen
nenänielun alueelle



Neisseria meningitidis -infektiot

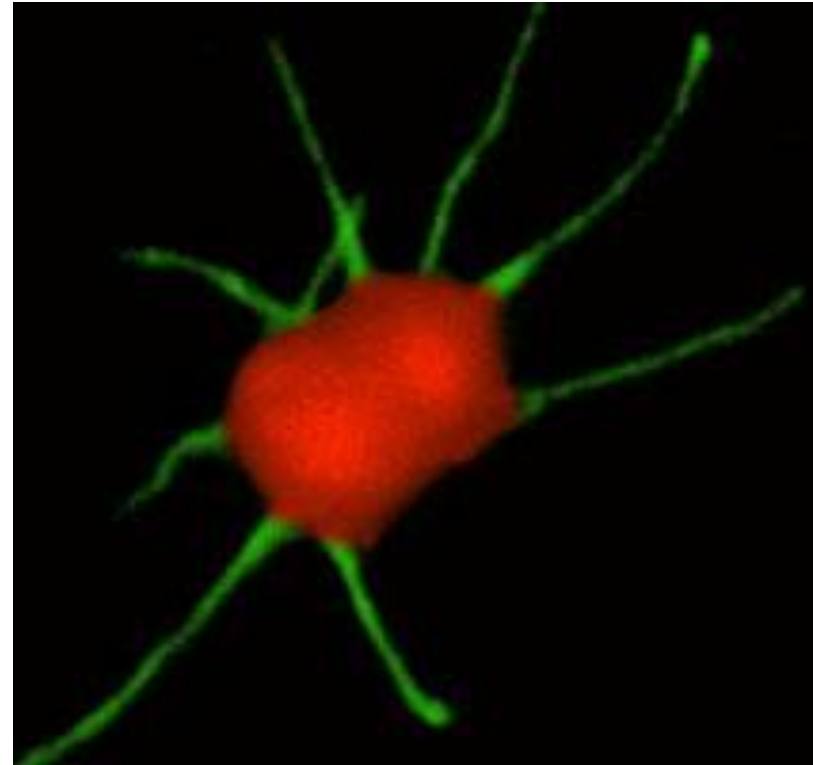
- *N. meningitidis* kolonisoituu nenänieluun
3–30%:lla terveillä ihmisillä.
- Tarttumista välittävät tyyppi IV pilukset. Pilukset ovat pitkiä hiusmaisia rakenteita, jotka välittävät Gram-negatiivisten ja myös joidenkin Gram-positivisten bakteereiden adheesiota.
- *N.meningitidis* voi aiheuttaa meningiittiepidemioita.
Erityisesti Saharan Afrikassa epidemiat ovat merkittävä terveysongelma.

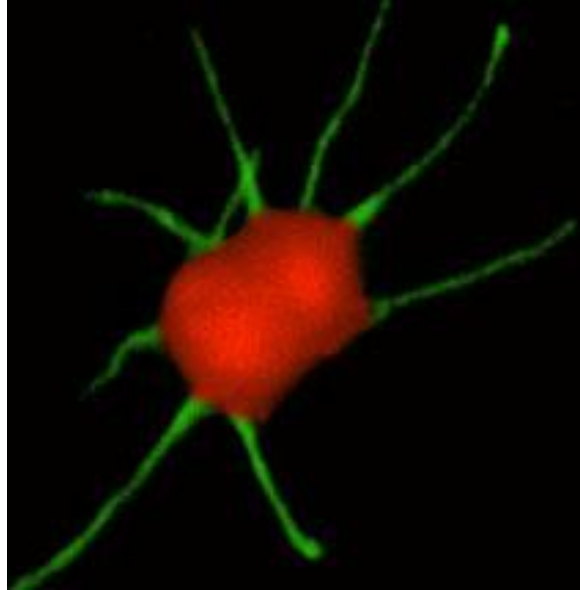
Neisseria meningitidis -infektiot

- 13 erilaista serotyhmiä; joista ryhmät A, B, C, W135 ja Y aiheuttavat 90 % vaikeista meningokokki –infektioista.
- Serotyyppien A, C, Y and W135 aiheuttamat infektiot voidaan estää rokottamalla.
- Serotyyppiä B vastaan tehokasta rokotetta ei vielä ole (kehitteillä/kliinisissä kokeissa)
- Täten uusia ennaltaehkäiseviä menetelmiä tarvitaan meningokokki-infektioita vastaan.

Type IV pilus

- 1000-4000 nm filamentti rakenne
- Kaksi potentiaalia adhesiinia:
 - Pilin osayksikkö (17-21 kDa) muodostavat tyyppi IV piluksen
 - PilC1 on 110 kD – piluksen päässä oleva adhesiini





Inserm U570,
Paris



Merkitys luomussa

Luonnonaineet antiadheesio terapiassa

- Esim. luomueläinlääkintä; pyritään korvamaan antibiootit, joiden käyttö on hyvin rajoitettua
 - (anti-infektiiviset rehut)

Luonnonaineet antimikrobisina yhdisteinä

- Esim. luomuravinnon säilönnässä ruokaa pilaavia bakteereita vastaan
- (lihamarinadit; hedelmien pintojen käsittely; lukuisia käyttömahdollisuuksia)

Antibioottiresistenssin lisääntyminen

Inhibition Activity of Wild Berry Juice Subfractions against *Streptococcus pneumoniae* Binding to Human Bronchial Cells

