



**TURUN
YLIOPISTO**

**Korkean suorituskyvyn menetelmän luonti
luonnonyhdisteiden antibioottiaktiivisuuden
selvittämiseksi**

Pro gradu -tutkielma
Tommi Lehto
Turun yliopisto
Kemian laitos, Biolääketieteen laitos
Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä
15.05.2023

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

LEHTO, TOMMI: Korkean suorituskyvyn menetelmän luonti luonnonyhdisteiden antibioottiaktiivisuuden selvittämiseksi

Pro gradu -tutkielma, s. 32

Kemia

Toukokuu 2023

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Antimikrobiresistenssi on maailmanlaajuinen ongelma ja vaikka antimikrobilääkkeiden teho Suomessa on edelleen hyvä, on maailmanlaajuisesti tilanne pahenemassa. Kamppailaksemme tätä vastaan on tärkeää tutkia ja löytää uusia yhdisteitä, jotka voisivat joko toimia itse antibiootteina tai voisivat toimia apureina nykyisten antibioottien tehokkuuden lisäämiseksi. Kasvikunta sisältää tuhansia potentiaalisia yhdisteitä, joiden antimikrobikapasiteettia ei vielä tunneta. On siis tärkeää, että luodaan korkean suorituskyvyn menetelmiä tämän tutkimiseksi, jotta datan keruu toimisi nopeasti ja tehokkaasti. Kasvikunnasta löytyvät yhdisteet soveltuvat erinomaisesti tällaisen menetelmän luomiseen, käyttöön ja kehittämiseen. Luodaksemme menetelmän, valitsimme antimikrobiresistenssin suhteen keskeisiä bakteereja sekä biologiselta aktiivisuudeltaan tunnettuja malliyhdisteitä, joiden avulla oli mahdollista optimoida menetelmäolosuhteita.

Antibioottiherkkyyttä testataan pääosin kahdella tavalla, agardiffuusio kiekkomenetelmällä sekä kasvatusliuoksen laimennusmenetelmällä. Agardiffuusiossa inhibiittori diffundoituu kasvatusmaljalla sille ympäytyyn bakteeriliuokseen osoittaen inhibition kasvunestovyöhykkeenä. Kasvatusliuoksen laimennusmenetelmällä inhibiittori lisätään suoraan bakteeriliuokseen ja tästä laimennoksesta voidaan selvittää minimi-inhibitiioon vaadittava inhibiittorikonsentraatio. Työn tarkoituksena oli tutkia kasviyhdisteiden antibioottipotentiaaleja ja luoda tätä varten menetelmiä. Aluksi luotiin agardiffuusio menetelmää muokkaamalla kiekkomenetelmästä kuoppamenetelmä, joka toimi referenssimenetelmänä. Se kertoi luotettavasti ja toistettavasti, inhiboiko yhdiste bakteeria vai ei. Etu kiekkodiffuusioon oli inhibiittorin suurempi applikointivolyymi kuopan sisään kuin suodatinpaperille. Tämän jälkeen kehitettiin kuoppalevylle soveltuva korkean suorituskyvyn menetelmä, jolla on mahdollista etsiä bakteereita inhiboivaa aktiivisuutta ja määrittää minimi-inhibitiokonsentraatiota eli yhdisteen tehoa. Kuoppalevymenetelmällä pystytään yhdellä analyysillä tarkistamaan 90 kombinaatiota.

Kehitetty menetelmä mahdollistaa kemiallisesti osittain tuntemattomien (suomalaiset kasvilajit) ja kemiallisesti täysin tuntemattomien lajien (trooppiset lajit) antibakteeriominaisuuksien laajan testauksen ja vertailun. Menetelmää hyödyntäen onnistuttiin toteamaan monien erilaisten kasvinäytteiden osoittavan inhibitiopotentiaalia 24 h seurannassa. Onnistuttiin myös toteamaan, että jotkin yhdisteet olivat täysin tehotomia tiettyjä bakteereita vastaan mutta tehosivat erinomaisesti toisiin. Tämän vuoksi yhdisteiden ja kasvinäytteiden antimikrobivaikutuksia on tärkeä tutkia useiden mallibakteerien avulla.

Avainsanat: Antimikrobiaktiivisuus, menetelmänkehitys, metabolomiikka

Sisällysluettelo

Sisällysluettelo	3
1. Johdanto.....	4
1.1. Bakteerityypit	4
1.2. Kasveista löytyvät luonnonyhdisteet	6
1.3. Agardiffuusio kiekkomenetelmällä	8
1.4. Kasvatusliuoksen laimennusmenetelmä.....	9
2. Materiaalit ja menetelmät	10
2.1. Puhdasaineet, kasviuutteet ja bakteerit	10
2.2. Agardiffuusiomenetelmä kiekolla/ -kuopalla.....	11
2.2.1. Olosuhdekokeet.....	12
2.2.2. Referenssimenetelmä.....	13
2.3. Kuoppalevymenetelmä	13
2.3.1. Liuotinkoe	14
2.3.2. Kompleksinmuodostuskoe.....	14
2.3.3. Kokeet kasviuutteilla	15
3. Tulokset ja niiden tarkastelu.....	15
3.1. Agardiffuusiomenetelmä kiekolla/ -kuopalla	15
3.1.1. Olosuhdekokeet.....	16
3.1.2. Referenssimenetelmä	19
3.2. Kuoppalevymenetelmä	21
3.2.1. Kompleksinmuodostuskokeet.....	21
3.2.2. Kokeet kasvinäytteillä	21
4. Päätelmät.....	24
Lähteet.....	25

1. Johdanto

Antimikrobiresistenssi (AMR) on maailmanlaajuinen ongelma. AMR:llä tarkoitetaan mikro-organismien kykyä vastustaa antimikrobeja (Campion ja Morrissey, 2013). Mikro-organismeja ovat muun muassa erilaiset bakteerit, virukset sekä sienet. AMR on mikro-organismille täysin luonnollinen selviytymiskeino, joka voi esiintyä monin eri tavoin. Yleisimpiä tapoja, joilla mikro-organismi puolustautuu antimikrobeja vastaan, on antimikrobin solukalvon läpäisyn estäminen, antimikrobin ulospumppaus ennen sen kiinnittymistä antimikrobin kohteeseen, antimikrobin tuhoaminen organismin sisäisin entsyymein, antimikrobin kohteen muodon muuttaminen tai sen hyödyttömäksi tekeminen. Tällöin organismi mutatoituu siten, että se pystyy toimimaan, vaikka antimikrobi kiinnittyisikin kohteeseensa. AMR:stä seuraa, ettei organismille tarkoitettua antimikrobia voida enää käyttää sen aiheuttamien tautien hoitoon (Prestinaci, Pezzotti ja Pantosti, 2015). Mikäli AMR yleistyy, voivat ihmiset kuolla aivan tavanomaisiin infektioihin, kuten keuhkokuumeeseen tai leikkausalueen infektiin. Tällä hetkellä on arvioitu että Euroopassa kuolee noin 540000 ihmistä vuosittain infektioihin, joihin tutkitut antimikrobit eivät enää tehoa (de Kraker, Stewardson ja Harbarth, 2016; de Kraker ja Lipsitch, 2021; Hassoun-Kheir ja Harbarth, 2022). Bakteereille tyypillisistä antimikrobeista puhutaan yleisemmin antibiootteina. Antibiootit ovat yksi tärkeimpiä kamppailukeinoja bakteereista johtuvia tartuntatauteja vastaan. Ensimmäiset antibioottihavainnot on tehty jo 1920 – luvulla, kun Alexander Fleming havaitsi streptokokkeja sisältävällä maljalla homepesäkkeen aiheuttaman estovyöhykkeen tehdessään homekokeita (Tamim, Pätäri-Sampo ja Kantele-Häkkinen, 2023). Torjuaksemme AMR:a on tärkeää löytää uusia antibiootteja. Yksi potentiaalinen kohde tähän voisi löytyä maapallomme kasvikunnasta, jotka sisältävät suuria määriä erilaisia luonnonyhdisteitä, joita ei vielä ole pystytty tai ehditty testaamaan niiden antimikrobipotentiaalin selvittämiseksi.

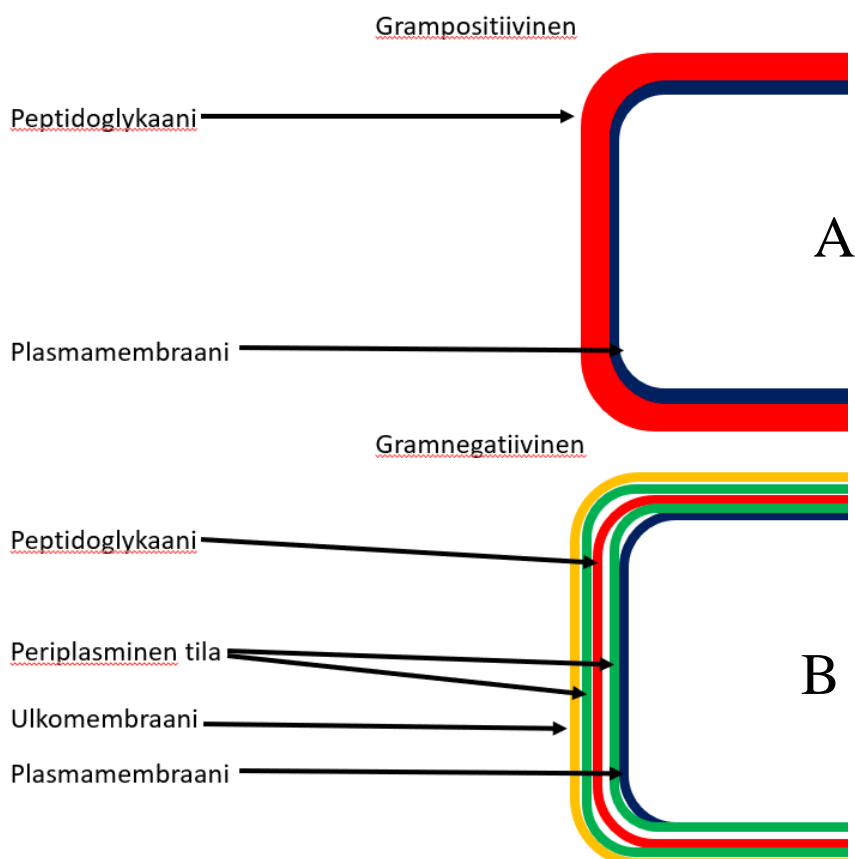
1.1. Bakteerityypit

Eri bakteerit omaavat eri kriittisyysasteen mitä tulee niiden antimikrobiresistenssiin. Näitä bakteereita voidaan luokitella niiden resistenttiyksien mukaan, esimerkiksi jos bakteeri on resistentti useammalle kuin yhdelle tunnetulle antimikrobille puhutaan sen olevan multiresistentti ja mikäli bakteeri on resistentti kaikille tunnetuille antimikrobeille, sanotaan sen olevan pan-resistentti. Maailman terveysjärjestö WHO luokittelee kriittisiä bakteereja niiden aiheuttamien tautien paikkojen mukaan, kuten hengitysteihin vaikuttavat sekä suolistoon vaikuttavat bakteerit. WHO listaa vuosittain kaikki kriittisimmät bakteerikannat, joiden antimikrobiresistenssi on sillä tasolla, että ne saattavat aiheuttaa tuhoja ihmiskunnalle

(Mancuso *et al.*, 2021). Kuitenkin selkein bakteerien aktiivisuuteen liittyvä luokittelu tapahtuu niiden rakenteiden perusteella. Bakteerit voivat olla joko gram-positiivisia tai gram-negatiivisia.

Gram-positiivisuus tai -negatiivisuus määritellään bakteereille suunnitellulla gram-väriainetestillä, jossa positiivinen bakteeri värjäytyy siniseksi tai violetiksi, kun taas negatiiviset värjäytyvät pinkeiksi tai punaisiksi. Tämä johtuu bakteerien rakenne-eroista. Gram-positiivisilla bakteereilla on soluseinässä vain yksi kalvo (Kuva 1A) joka koostuu pääasiassa peptidoglykaanista. Peptidoglykaani on paksumpi kuin gram-negatiivisella eikä sillä ole suojaavaa ulkokalvoa. Ne ovat muodoltaan usein pallo- tai tankomaisia. Esimerkkejä kriittisistä gram-positiivisista bakteereista ovat erilaiset stafylokokit, enterokokit sekä streptokokit.

Gram-negatiivisten bakteerien soluseinä koostuu sisäkalvosta, ulkokalvosta ja niiden väliin jäävästä periplasmisesta tilasta, joka koostuu peptidoglykaanista. (Kuva 1B) Ne ovat muodoltaan usein pyöreitä, tankoja tai spiraalimaisia. Esimerkkeinä kriittisistä gram-negatiivisista bakteereista ovat *Escherichia coli* ja salmonella bakteerit (Lloyd, 2022).



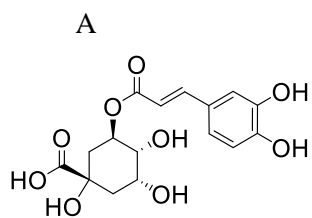
Kuva 1. Yksinkertaistetut kuvat gram-positiivisen (A) sekä gram-negatiivisen (B) bakteerin rakenteesta. Suurin ero bakteerien välillä on niiden peptidoglykaanikuoren paksuus ja gram-negatiivisilla bakteereilla oleva ulkomembraani, joka puuttuu gram-positiivisilta. Mukailtu artikkelista (Liu *et al.*, 2012)

1.2. Kasveista löytyvät luonnonyhdisteet

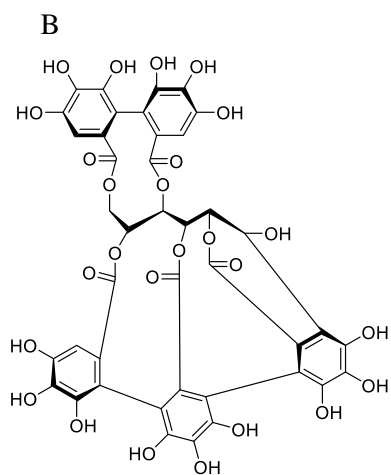
Kasvit tuottavat suuria määriä erilaisia erikoistuneita metaboliitteja selviytyäkseen ja lisääntyäkseen. Nämä erikoistuneet metaboliitit voivat esimerkiksi olla alkaloideja, terpenoideja, flavonoideja tai yksinkertaisia fenolisia yhdisteitä (Kim *et al.*, 2018, 2020). Esimerkkejä erilaisista erikoistuneista metaboliiteista on esitelty kuvassa 2. Erityisesti fenoliset yhdisteet ovat tärkeä osa kasvien kemian, sillä ne ovat yleisiä kaikille kasviheimoilta ja kasvit muodostavat niistä pigmenttejä UV-säteilyn vaikutuksia vastaan (Appel, 1993; Cheynier *et al.*, 2013).

Yksinkertaiset fenoliset hapot sisältävät yhden fenolirenkaan (Kuva 2A), kun taas polyfenoliset kaksi tai useamman. Hydrolysoituvasta tanniinista (HT) puhutaan silloin, kun galloyyliryhmä ympäröi sokerialkoholia eli polyolia, josta esimerkkinä pentagalloyyliglukoosi (PGG, Kuva 2D). Ellagitanniinit (ET) sekä gallotanniinit (GT) kuuluvat myös hydrolysoituvien tanniinien ryhmään (Kim, 2020). ET (Kuva 2B, 2C, 2F) on todettu olevan biologisesti aktiivisia yhdisteitä (Moilanen, Koskinen and Salminen, 2015) ja niillä on myös osoitettu olevan potentiaalia toimia terveyttä edistävinä yhdisteinä (Heinonen, 2007; Landete, 2011). Flavonoidit tunnistetaan niiden tyypillisestä fenolirungosta $C_6C_3C_6$, ja ryhmä jaetaan eri luokkiin C_3 -ryhmän rakenteen perusteella. Yleisimmät flavonoidiluokat ovat flavonolit ja flavan-3-olit (Kuva 2E) (Kim, 2020).

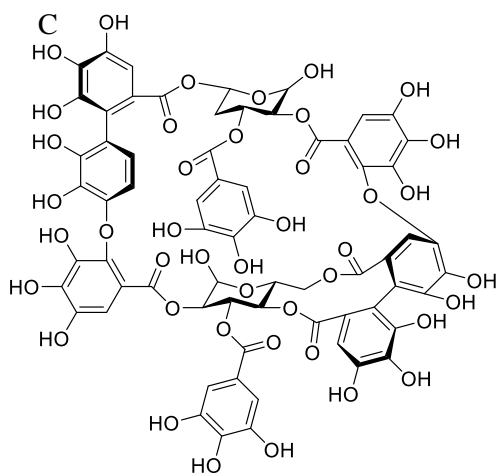
Kasviheimoja on tutkittu jo pitkään niiden luonnonyhdisteprofiilien selvittämiseksi, erityisesti kasviheimoja, joiden lehtiä, marjoja tai hedelmiä on käytetty ruokina tai lääkeaineina (Kähkönen *et al.*, 1999; Kähkönen, Hopia ja Heinonen, 2001; Koponen *et al.*, 2007). Kasviheimon sisälläkin luonnonyhdistekirjot vaihtelevat, mutta on myös pystytty todistamaan, että saman suvun tai heimon sisällä on samanlaiset yleisprofiilit (Salminen, Karonen ja Sinkkonen, 2011; Johnson *et al.*, 2014). Tämä tarkoittaa siis sitä, että mikäli suomalaisista kasveista löydetään aktiivisuuksiltaan mielenkiintoisia yhdisteitä, voidaan saman kasviheimon sisältä löytää myös trooppisempia tai harvinaisempia kasvilajeja, joiden kemian voidaan olettaa olevan samanlaista. Tämän monimuotoisuuden tutkimiseen tarvitaan moderneja tutkimuslaitteita ja uusia tutkimusmenetelmiä.



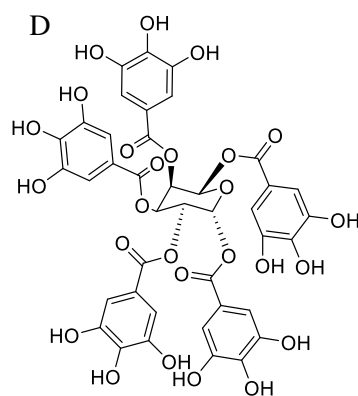
klorogeenihappo



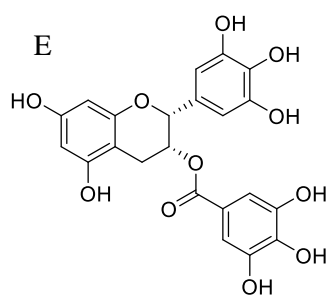
veskalagiini



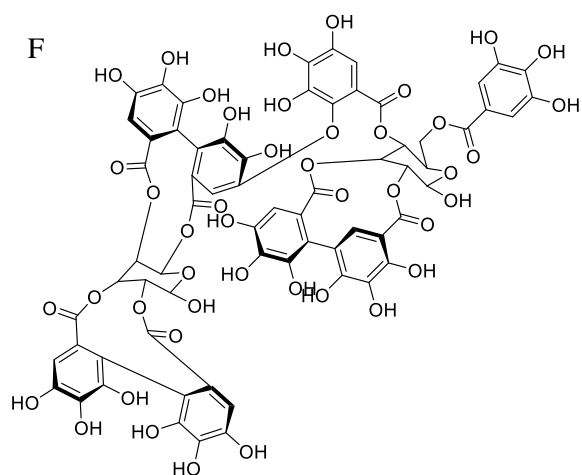
oenotheiini B



pentagalloyylglukoosi



epigallokatekiinigallaatti



medinilliini B

Kuva 2. Esimerkkejä luonnosta löytyvistä yhdisteistä. Luonnosta löytyvät yhdisteet ovat hyvin usein polyfenolisia yhdisteitä. A) klorogeenihappo, esimerkki fenolisesta haposta, B) veskalagiini, avoketjuinen (hydrolysoituva tanniini, HT), C) oenotheiini B, (HT) D) pentagalloyyyliglukoosi (HT), E) epigallokatekiinigallaatti, flavonoidi, F) medilliini B (HT).

1.3. Agardiffuusio kiekkomenetelmällä

Agardiffuusio kiekkomenetelmällä on yksinkertainen ja hyvin standardisoitu menetelmä bakteerien herkkyyden tutkimiseen (Bauer *et al.*, 1966; CLSI, 2018c). Menetelmä perustuu diffuusion eli ilmiöön, jossa yhdisteet pyrkivät siirtymään väkevämmästä pitoisuudesta laimeampaan, tasoittaen konsentraatioeroja ajan myötä. Bakteriliuosta ympätään noin 15 cm halkaisijaltaan olevalle agarmaljalle. Tämän jälkeen maljalle asetetaan pieniä selluloosasta valmistettuja suodatinpaperiekkoja, joiden päälle pipetoidaan tutkittavaa yhdisteliuosta ja annetaan maljan inkuboitua yön yli 35°C lämpötilassa. Inhibition tapahtuessa maljalle syntyy kirkkaita estovyöhykkeitä suodatinpaperiekkojen ympärille, joiden sisällä ei kasva bakteeria. Inhibiittorin tehoa voidaan arvioida sen synnyttämän estovyöhykkeen halkaisijan pituuden mukaan ja suuruus ilmoitetaan millimetreinä. Menetelmän tulokset ovat kvalitatiivisia ja vastaavatkin kysymykseen tapahtuuko inhibitiota vai ei. Herkkyyden määrittäminen tapahtuu testillä sen sijaan että käytettäisiin MIC arvoja. On kuitenkin olemassa alueen lukuinstrumentteja, jotka kykenevät laskemaan ja arvioimaan joidenkin antibioottien MIC arvot käyttäen jo olemassa olevia standardikäyriä (Korgenski ja Daly, 1998; Nijs *et al.*, 2003).

Saatuja tuloksia verrataan Kliinisten ja Laboratoriostandardien Instituutin (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) kriteerien mukaan (CLSI, 2020). Nämä kriteerit on kerätty useista analyyseistä, joista on kerätty kolmen tyyppistä dataa: mikrobiologista dataa, joka sisältää MIC arvojen ja estovyöhykkeiden datan, farmakokineettistä ja farmakodynaamista dataa sekä kliinisistä tutkimuksista saatua dataa (CLSI, 2018b). Näiden tulosten perusteella voidaan määrittää, onko kyseessä antimikrobiherkkä vai antimikrobiresistentti organismi. Antimikrobiherkässä tilanteessa potilaan tulisi reagoida hoitoon tavallisesti, kun taas antimikrobiresistentti tilanteessa potilas ei reagoi hoitoon, tavallisilla annoksilla.

Menetelmän etuna on sen yksinkertaisuus ja ettei menetelmän suorittamiseen tarvita mitään erikoisia laitteita. Tuloksia on helppo tulkita ja erilaiset diffuusiomaljat luovat osittaista joustavuutta. Agardiffuusio on halvin kaikista herkkyytstesteistä (Jorgensen ja Ferraro, 2009). Heikkouksia menetelmällä on sen mekaanisuus ja automatisoinnin haastavuus. Myöskään kaikkia bakteereita ei pystytä testaamaan tällä menetelmällä, sillä niillä voi olla hyvinkin tarkkoja olosuhteita, joita ei kyetä maljalla ottamaan huomioon.

1.4. Kasvatusliuoksen laimennusmenetelmä

Kasvatusliuoksen laimennusmenetelmä on yksi vanhimmista bakteerien herkkyyttä tutkivista menetelmistä (Ericsson ja Sherris, 1971). Menetelmässä valmistetaan antibiootteja sisältävälle liuokselle laimennossarja, joka lisää bakteeria sisältävään kasvatusliuokseen. Bakteeria sisältävä kasvatusliuos voi olla joko testiputkissa (makrotaso) tai kuoppalevyllä (mikrotaso) (Jorgensen and Ferraro, 2009). Makrotasolla antibioottilaimennossarja annostellaan putkiin ja kasvatetaan yön yli 35 asteen lämpötilassa, jolloin liuoksessa syntyvästä sameudesta voidaan nähdä bakteerien lisääntymisen aiheuttavaa kasvua. Tavoitteena on kuitenkin pitää liuos kirkkaana ja pienimmän antibioottipitoisuuden sisältävä liuos, joka pysy kirkkaana ja näin estää bakteerin kasvua on antibiootin minimi-inhibitiokonsentraatio (MIC, engl. Minimal inhibition concentration.) Menetelmästä on hyötyä muun muassa silloin, kun on tarvetta tietää, kuinka paljon bakteeria tarvitaan analyysin loppuun viemiseksi tai kuinka paljon antibioottia tarvitaan tietyn bakteerimäärän kasvun inhiboimiseen. Menetelmän luotettavuudeksi on arvioitu ± 1 laimennos laimennossarjassa (McKie, 1977). Etuja kasvatusliuoksen laimennusmenetelmällä ovat sen kvantitatiiviset tulokset, sekä menetelmän herkkyys, sillä menetelmä antaa vastauksen inhihoiko yhdiste bakteeria vai ei myös hyvin pienillä ainemäärillä. Heikkouksia menetelmällä on sen suuri työmäärä antibioottilaimennossarjojen valmistuksessa ja suhteellisen suuret määrät reagensseja sekä se että herkkyystestaukseen vaaditaan paljon tilaa.

Mikrotasolla voidaan käyttää eri kokoisia kuoppalevyjä. Kuoppalevyä käytettäessä on mahdollista kerätä kvantitatiivisia tuloksia nopeasti yhdellä analyysillä (Jorgensen ja Ferraro, 2009). Menetelmällä on esimerkiksi mahdollista kerätä 12 eri antibiootin vaikutukset kahdeksassa eri laimennoksessa yhdellä bakteeriliuoksella (CLSI, 2018a). Kuoppalevyjä on mahdollista valmistaa ennakoon, niitä voidaan pakastaa tai ostaa valmiina, jolloin päästään eroon käyttäjän tekemästä mahdollisesta pipetointivirheestä. Etuna tällä menetelmällä on sen toistettavuus ja helppokäyttöisyys MIC:ta kerätessä. Menetelmä on myös vihreämpi, koska reagensseja kuluu vähemmän (Patel *et al.*, 2011). Tulosten tulkintaan on mahdollista luoda automaattisesti tietokoneella raportteja suoraan lukijoista, jotka helpottavat tulosten tulkintaa. Suurimpana heikkoutena menetelmällä on sen suuri työmäärä, jos automaatiota tai kaupallisesti saatavia valmiita kuoppalevyjä ole saatavilla.

2. Materiaalit ja menetelmät

2.1. Puhdasaineet, kasviuutteet ja bakteerit

Työssä käytettiin inhibitiopotentialin selvittämiseksi sekä kasvien puhdasaineita että kasveista eristettyjä uutteita jotka valmistettiin Engström et al. menetelmällä (Engström *et al.*, 2016).

Taulukossa 1 on esitetty kaikki työssä käytetyt puhdasaineet.

Taulukko 1. Lista työssä käytetyistä puhdasaineista. Taulukossa hydroysoituvia tanniineja (HT) ellagitanniineja (ET) ja pienempiä polyfenolisia yhdisteitä. Alkaloideilla niiden derivatiivi on merkitty sulkuihin.

Yhdiste	Yhdisteryhmä	Yhdiste	Yhdisteryhmä
Berberiini	Alkaloidi (Isokinoliini)	Kofeiini	Alkaloidi (Puriini)
Kversetiini	Flavonoli	Kurkumiini	Fenoli happo
Glukobrassikiini	Glukosinolaatti	Beta-karoteeni	Karotenoidi
Pentagalloyyliglukoosi	HT	Sinalbiini	Glukosinolaatti
Oenothiini A	HT	Glucobrassikanapiini	Glukosinolaatti
Sinigrini	Glukosinolaatti	Lupiniini	Alkaloidi (Kinolitsidiini)
Prosyaniidiini B2	Proantosyanidiini	(-)-gallokatekiini	Flavan-3-oli
Kiniini	Alkaloidi (Kinoliini)	Papaveriini	Alkaloidi (Isokinoliini)
Oenothiini B	HT	Akasetiini	Flavoni
Klorogeenihappo	Ellagihappo	Theobromiini	Alkaloidi (Puriini)

Kylmäkuivattuja kasvien osia lisättiin 2 ml eppendorf -putkiin n. 100 mg, jonka jälkeen osia jauhettiin kuulamylyllä. Tämän jälkeen jauheeseen lisättiin 1400 µl 80/20 asetoni-vesiliuosta, niitä vorteksoitiin 10 minuuttia, jonka jälkeen ne jätettiin maseroitumaan yön yli kylmähuoneeseen. Seuraavana päivänä maseroituneita näytteitä ravisteltiin tasoravistimessa 4 h ajan, jonka jälkeen putket sentrifugoitiin ja dekantoiitiin uusiin eppendorfputkiin. Nämä vaiheet toistettiin, jonka jälkeen näyteliuokset yhdistettiin ja yhdistetyistä uutteista haihdutettiin orgaaninen liuotin pois eppendorfkonsentraattorilla, kylmäkuivattiin. Tavoitteena oli saada 50 mg kylmäkuivattua jauhetta. Taulukossa 2 on esitelty kaikki kasvinäytteet, joita työssä käytettiin ja niiden massat.

Taulukko 2. Lista työssä käytetyistä kasvinäytteistä.

Kasvi (osa)	Latinankielinen	Päähdiste	Massa kylmäkuivauksen jälkeen (mg)
Mansikkaguava (Lehti)	<i>Psidium cattleianum</i>	Avoketjuiset ellagitanniinit	116,8
Maorihehkupuu (Lehti)	<i>Metrosideros excelsa</i>	Oligomeeriset ellagitanniinit	29,9
Medinilla (Lehti)	<i>Medinilla magnifica</i>	Oligomeeriset ellagitanniinit	53,95
Teepensas (Lehti)	<i>Camellia sinensis</i>	Flavan-3-olit	36,95
Manteliketapani (Lehti)	<i>Terminalia catappa</i>	Monomeeriset ellagitanniinit	57,25
Hullukaali (Lehti)	<i>Hyoscyamus niger</i>	Alkaloidit (Terpenoidit)	14,5
Hullukaali (Kukka)	<i>Hyoscyamus niger</i>	Alkaloidit (Terpenoidit)	46,3
Keltamo (Lehti)	<i>Chelidonium majus</i>	Alkaloidit (Isokinoliinit)	11,65
Keltamo (Kukka)	<i>Chelidonium majus</i>	Alkaloidit (Isokinoliinit)	13,45

Työssä käytetyt bakteerit valittiin niiden antimikrobiresistenssin kriittisyyden sekä saatavuuden perusteella. Kaikki bakteerit ja niiden bakteerityypit on listattu taulukossa 3.

Taulukko 3. Työssä käytetyt bakteerit ja niiden bakteerityypit.

Bakteeri	Gram-tyyppi	Bakteeri	Gram-Tyyppi
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		

2.2. Agardiffuusiomenetelmä kiekolla/ -kuopalla

Ennen varsinaisen menetelmän suunnittelua piti varmistaa, että kasviyhdisteet oikeasti inhiboivat bakteereja. Tähän käytettiin lähtökohtana agardiffuusiota kiekkomenetelmällä, sen antaman yksinkertaisen kyllä/ei tuloksen vuoksi. Aluksi kokeita varten kaikki puhtasaineet sekä kontrollina käytetty tunnettu antibiootti, kanamysiini, käsiteltiin samalla tavalla seuraavasti: puhtasainetta punnittiin 1 mg, joka liuotettiin 1 ml asetoni/vettä (80/20, v/v) ja sekoitettiin, kunnes kaikki kiinteä aine oli liennut. Tämän jälkeen 5 µl liuosta pipetoitiin bakteeriliuoksella ympätyn maljan päälle asetetuille suodatinpaperiekikoille. Yhdisteiden ja antibioottikontrollin lisäksi lisättiin yhdelle suodatinpaperiekolle liuotinta, jolla seurattiin liuottimen vaikutusta. Näistä kerätyt tulokset antoivat paljon negatiivisia tuloksia, joten

suoritettiin useita olosuhdekokeita. Bakteerien kasvatusliuos käsiteltiin aina kasvatuksen jälkeen samalla tavalla, jolloin liuos sentrifugoitiin 3000 x g, 4°C, 15 min. Tämän jälkeen bakteeriliuos dekantoitiin pois, bakteerisakan jäädessä putken pohjalle. Sakka suspentoitiin puskuriliuokseen ja pestiin samoilla olosuhteilla, jonka jälkeen puskuriliuos dekantoitiin pois ja sakka suspensoitiin jälleen kasvatusliuokseen, jonka jälkeen liuos laimennettiin OD600-arvoon. OD600-arvo tarkastettiin mikrobiologiassa standardina käytettävällä McFarlandin standardilla. McFarland-standardit valmistettiin käyttämällä 1 % bariumkloridia sekä 1 % rikkihappoa. Näiden yhdisteiden seos sakkautuu, joka vastaa bakteeriliuoksen sakkautumista. Tällöin on helppo arvioida bakteerien absorbanssia ja samalla bakteerien määrää liuoksessa (Lahuerta Zamora ja Pérez-Gracia, 2012).

2.2.1. Olosuhdekokeet

Ensimmäisenä kokeiltiin nostaa suodatinpaperille lisättävän liuoksen tilavuutta, joka suodatinpaperikiekoilla oli 5 µl. Suodatinpaperikiekkojen sijaan Agar-maljaan tehtiin kuoppa, johon puhdasainetta lisättiin. Aluksi vertailtiin agardiffuusiota samalla maljalla, samoilla yhdisteillä siten, että agarmalja oli jaettu kahtia. Toiselle puolelle lisättiin suodatinpaperikiekot ja toiselle puolelle tehtiin kuopat, joihin pipetoitiin sama määrä inhibiittoria. Tämän jälkeen, kun tulokset osoittivat, ettei diffuusiosta ole eroa, siirryttiin valmistamaan halkaisijaltaan suurempi kuoppa. Näin liuostilavuutta saatiin kasvatettua ja puhdasaineen määrää maljalla kasvatettua, jolloin oletettavasti inhibition määrä lisääntyy. Kuoppa valmistettiin hyödyntäen ruiskuun yhdistettyä metallikartiota, jonka halkaisija oli noin 3 mm. Metallikartio oli yhdistettynä ruiskuun, jolla ympätty agargeeli saatiin imettyä pois maljalta, jolloin jäljelle jäi siisti pyöreä kuoppa. Inhibiittoria lisättiin kuoppaan sen tilavuuden verran, joka on 60 µl.

Toinen mahdollinen vaikuttava tekijä inhibitioon on puskuriliuos. Puskuriliuoksella ei välttämättä ole vaikutusta bakteerin kasvuun, mutta jotkin yhdisteet saattavat reagoida puskuriliuosten kanssa. Puskuriliuos on tärkeä osa menetelmää, sillä puskuriliuoksella bakteeri pestään ja laimennetaan. Aluksi käytettiin pelkkää fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (engl. phosphate-buffered saline, PBS), mutta on todettu, että PBS:lla on sitovia vaikutuksia polyfenolien kanssa (Zhang *et al.*, 2018). Tätä varten valmistettiin 1 M HEPES ((4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinietaanisulfonihappo)), TRIS (tris(hydroksimetyyli)aminometaani), MOPS (3-(N-morpholiini)propaanisulfonihappo) – puskurit 1 M PBS lisäksi. Tämän lisäksi kokeessa selvitettiin pelkän kasvatusmediumin vaikutusta puhdasaineisiin. Puskuriliuoksia

valmistettiin 250 ml ja niiden pH säädettiin arvoon 7,15. Lopuksi ne laimennettiin 20 mM pitoisuuteen ja liuokseen lisättiin 0,15 M natriumkloridi (NaCl) -liuosta.

Puskuriliuoskoe suoritettiin seuraavasti: yön yli kasvatettu bakteeriliuos sentrifugointiin olosuhteissa (3000 G, 15 min, 4 °C), jonka jälkeen bakteerit suspensoitiin 25 ml PBS puskuria. Bakteerit sisältävä puskuriliuos jaettiin 5 ml:n eriin ja pestiin 3x5ml eri puskuriliuoksilla, pois lukien kasvatusmedium, joka pestiin 3x5 ml HEPES-puskurilla. Tämän jälkeen liuokset laimennettiin OD600 arvoon, jossa kasvatusliuosta oli 4 ml, johon bakteeriliuosta lisättiin 40 µl. Seuraavaksi valmistettiin laimennossarjat kontrollimaljoille, pipetoimalla laimennettua bakteeriliuosta 100 µl. Laimennossarja valmistettiin laimentamalla bakteeriliuosta aina 1/10, jolloin edellistä bakteeriliuosta lisättiin eppendorf-putkeen 10 µl ja vettä 90 µl. Näitä valmistettiin 3 laimennosta ja valmistetut bakteerilaimennokset pipetoitiin agarmaljoille ja ympättiin tasaisesti.

Tämän jälkeen valmistettiin puhtasaineita sisältävät bakteeriliuokset. Pipetoitiin 500 µl bakteeriliuosta 1,5 ml kuuteen eppendorf-putkeen ja lisättiin yhteen putkeen 25 µl yhtä seuraavista puhtasaineista: pentagalloyylylgluukoosi, klorogeenihappo, oenothiini A, oenothiini B, kurkumiini sekä viimeisenä 25 µl pelkkää puskuria. Näitä liuoksia inkuboitiin 37°C lämpökaapissa 3 h.

Inkubaation jälkeen valmistettiin puhtasaineita sisältävistä bakteeriliuoksista 1/10 laimennossarjat siten, että lisättiin puhtasainetta sisältävää liuosta 50 µl ja 450 µl puskuria. Tästä valmistettiin 6 laimennosta. Laimennuksen jälkeen pipetoitiin 100 µl laimennosta agarmaljalle ja ympättiin. Maljauksen jälkeen maljoja inkuboitiin yön yli.

2.2.2. Referenssimenetelmä

Olosuhdekokeiden tuloksista pystyttiin valmistamaan tulevaa korkean suorituskyvyn menetelmää varten referenssimenetelmä. Menetelmässä bakteerit käsitellään kasvatuksen jälkeen normaalisti, mutta pesussa käytettiin puskuriliuoksena PBS sijasta HEPES –puskuria. Pesun ja laimentamisen jälkeen, ympättiin bakteeriliuos maljalle ja valmistettiin metallikartiolla kuopat, joihin pipetoitiin 3x 20 µl puhtasaineita. Maljoja inkuboitiin 37°C lämpökaapissa yön yli.

2.3. Kuoppalevy menetelmä

Kuoppalevy menetelmä perustuu kasvatusliuoksessa tapahtuvan absorbanssin muutokseen. Tavoitteena on tuottaa 96-kaivoiselle kuoppalevyllä sellaiset olosuhteet, että bakteerien kasvu

on mahdollista, sekä kasvun loppumista tai heikentymistä on helppoa seurata. Tätä varten oli tärkeää ajatella, mitkä tekijät vaikuttavat, eivät vain bakteerien, vaan myös yhdisteiden kemiaan kuoppalevyllä. Absorbanssin seurantaan käytettiin PerkinElmerin EnSight Multimode Microplate reader –kuoppalevylukijaa ja kuoppalevyt luettiin 415 nm sekä 600 nm aallonpituuksilla. Tämän lisäksi laite otti valokuvat jokaisesta kuopasta. Tulokset vietiin Exceliin ja analysoitiin tällä ohjelmalla.

2.3.1. Liuotinkoe

Ensimmäiseksi kokeiltiin erilaisten liuottimien vaikutus bakteerien kasvuun. Testattaviksi liuottimiksi päätettiin valita 15 %, 10 % ja 5 % dimetyylisulfoksidi (DMSO), sekä etanoli–vesi liuokset. Koetta varten kasvatettiin vain *E. coli* sekä *S. aureus* bakteereita 5 ml LB –kasvatusliuoksessa ja käsiteltiin ne kuten agaridiffuusiokokeissa. Kuoppalevyille pipetoitiin kaikkia liuotinpitoisuuksia 100µl ja lisättiin sen jälkeen 100 µl bakteeriliuosta ja bakteerien kasvua seurattiin ajan hetkillä 0 h, 2 h, 4 h, 5 h, 7 h, 9 h, 18 h, 24 h. Kontrollina käytettiin 100/100µl vesi/ bakteeriliuosseosta sekä 100 µl/100 µl LB + bakteeriliuosseosta. Saadut tulokset varmistettiin referenssimenetelmää hyödyntäen.

2.3.2. Kompleksinmuodostuskoe

Tanniinit usein kompleksoituvat erilaisten proteiinien ja erilaisten entsyymien kanssa, jotta ne on helpompi hajottaa esimerkiksi ruuansulatuksessa (Hagerman, 1989). Varmistaaksemme, että kuopassa tapahtuvan absorbanssin muutos johtuu bakteerin kasvusta eikä esimerkiksi bakteerin ja tanniinin muodostamasta kompleksista tehtiin tämän varmistava kompleksikoe. Kokeen tarkoituksena oli selvittää, muodostuuko absorbanssiin perustuvaa molekyylikompleksia valittujen bakteerien sekä puhtasaineiden välillä. Kompleksoiviksi yhdisteiksi valittiin PGG sekä oenotheni B, niiden erilaisten liukoisuusominaisuuksien vuoksi. Puhtasaineista valmistettiin 3 mM vahvuiset liuokset 15 % DMSO:ssa. Yhdisteistä valmistettiin myös 1,5 mM, 0,75 mM sekä 0,375 mM vahvuiset laimennokset.

Koetta varten kasvatettiin kaikkia bakteerikantoja yön yli 5 ml kasvatusliuoksissa. Kasvatuksen jälkeen bakteeriliuos käsiteltiin kuten liuotinkokeessa ja ne laimennettiin OD600 arvoon käyttäen 0,5 McFarland -standardia. Tämän jälkeen yhdellä kuoppalevyllä suoritettiin 3 rinnakkaista analyysiä per bakteeri ja yhdiste. Kontrollina käytettiin puhtasta 15 % -DMSO liuotinta. Kompleksin muodostumista seurattiin kuoppalevylukijalla 15 min välein 2 h ajan.

2.3.3. Kokeet kasviuutteilla

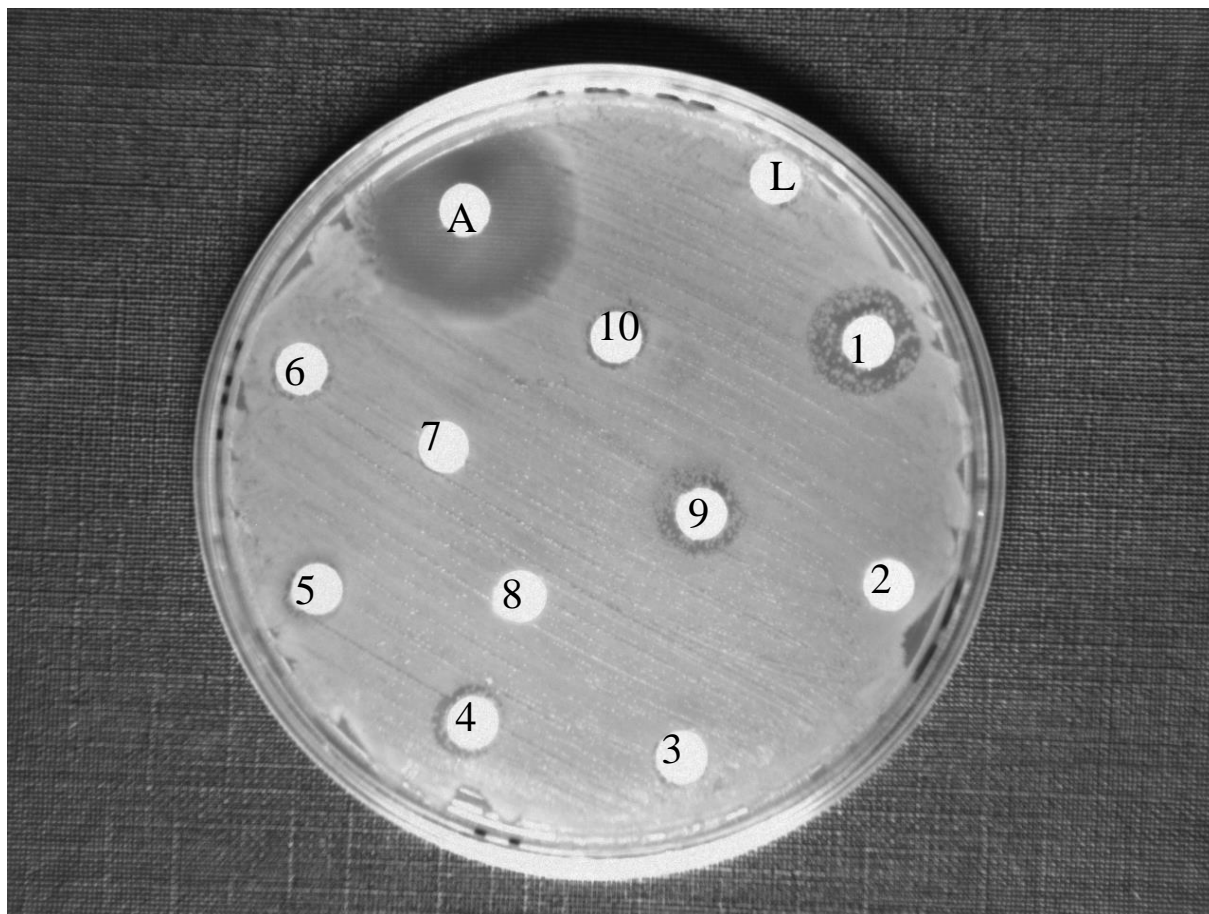
Luotua menetelmää testattiin kasviuutteilla. Uutteista liuotettiin 1 mg kylmäkuivattua jauhetta 1 millilitraan vettä ja sekoitettiin 20 min ajan ja suodatettiin 0,2 µm PTFE suodattimella. Kaikkia bakteereita kasvatettiin yön yli 5 ml ja kasvatuksen jälkeen ne käsiteltiin kuten liuotinkokeessa. Yhdellä kuoppalevyllä analysoitiin jokaisesta yhdistelmästä 3 rinnakkaista näytettä. Kontrollina käytettiin vettä ja bakteeriliuosta. Kasvinäytteen lisäämisen jälkeen absorbanssi mitattiin alkutilanteessa 415 ja 600 nm aallonpituuksilla ja annettiin inkuboitua yön yli. Inkubaation jälkeen absorbanssi mitattiin uudelleen samoilla aallonpituuksilla. Poikkeuksellisesti absorbanssia seurattiin *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* sekä *S. mutans* bakteereilla 2 h välein 24 h ajan ja bakteerit inkuboitiin hiilidioksidikaapissa.

3. Tulokset ja niiden tarkastelu

3.1. Agardiffusiomenetelmä kiekolla/ -kuopalla

Ensimmäisistä agardiffuusiokokeista huomattiin, että menetelmällä on mahdollista nähdä puhtasaineen inhibitio (Kuva 3). Kuitenkin koetta toistettaessa saatiin risteäviä tuloksia. Kuvasta nähdään, että PGG (näyte 5) ei osoittanut vahvaa inhibitiota lainkaan, kun taas berberiini (näyte 1), sekä glukobrassikiini (näyte 4) näin tekivät, ja kun koe toistettiin, oli berberiinin sekä glukobrassikiinin inhibitio kadonnut ja PGG osoitti inhibitiota alueella suodatinkiekon ympärillä. Tämä alue syntyi lähes aina niin PGG:lla kuin oenothiineilla, jotka ovat suurikokoisia hydrolysoituvia tanniineja. Tämä voisi kertoa siitä, että inhibitiota on tapahtunut mutta ajan myötä bakteerit pääsevät kasvamaan uudestaan inhibitioalueella, kuten on huomattu esimerkiksi *Pseudomonas aeruginosan* tapauksessa aikaisemmissa tutkimuksissa (Høiby *et al.*, 2019). PGG osoitti uudelleenkasvaneen inhibitiovyöhykkeen kaikilla tutkituilla bakteereilla. Oenothiini B osoitti myös uudelleenkasvaneen vyöhykkeen kaikilla tutkituilla bakteereilla, mutta vyöhykkeen koko oli huomattavasti pienempi, kuin PGG:lla. oenothiini A sen sijaan käyttäytyi kuten oenothiini B, pois lukien *E. colilla*, jolla inhibitiota ei tapahtunut.

Tulosten risteävyyden vuoksi piti selvittää, miten saataisiin luotettavampia ja toistettavampia tuloksia.



Kuva 3. A=kanamysiini, antibiottikontrolli. L = liuotinkontrolli. 1) berberiini 2) kversetiini 3) sinigriini 4) glukobrassikiini 5) pentagalloyyliglukoosi 6) prosyanidiini 7) oenotheini A 8) kiniini 9) oenotheini B 10) klorogeenihappo. *E. coli*-bakteerin agardiffuusiomenetelmällä kiekolla. A inhibiiovyöhyke 13 mm, 1:n inhibiiovyöhyke 8 mm, 4 inhibiiovyöhyke 4 mm, oenotheini B inhibiiovyöhyke 4 mm. Muilla ei inhibitiota.

3.1.1. Olosuhdekokeet

Agarmaljalle lisättävän tilavuuden kasvattamisen vuoksi kokeiltiin tehdä kuoppa maljalle ja sitä verrattiin suodatinkiekkolla tapahtuvaan diffuusioon. Kuvasta 4 huomataan, ettei eroa diffuusiosta ole, kun kuoppaan lisätään sama tilavuus puhtasaineita. Koetta varten valittiin aikaisempien tulosten pohjalta 5 puhtasainetta, joiden risteävien tulosten vuoksi ne valikoituivat malliyhdisteiksi. Nämä yhdisteet ovat berberiini (näyte 1), PGG (näyte 2), oenotheini A (näyte 3), oenotheini B (näyte 4) sekä klorogeenihappo (näyte 5). Tulosten perusteella kyettiin korvaamaan suodatinpaperiekko maljalle tehtävällä kuopalla, jolloin

kuoppaa suurentamalla pystyttiin kasvattamaan maljalle päätyvän yhdisteliuoksen tilavuutta ja samalla päästään eroon suodatinpaperikiekosta.

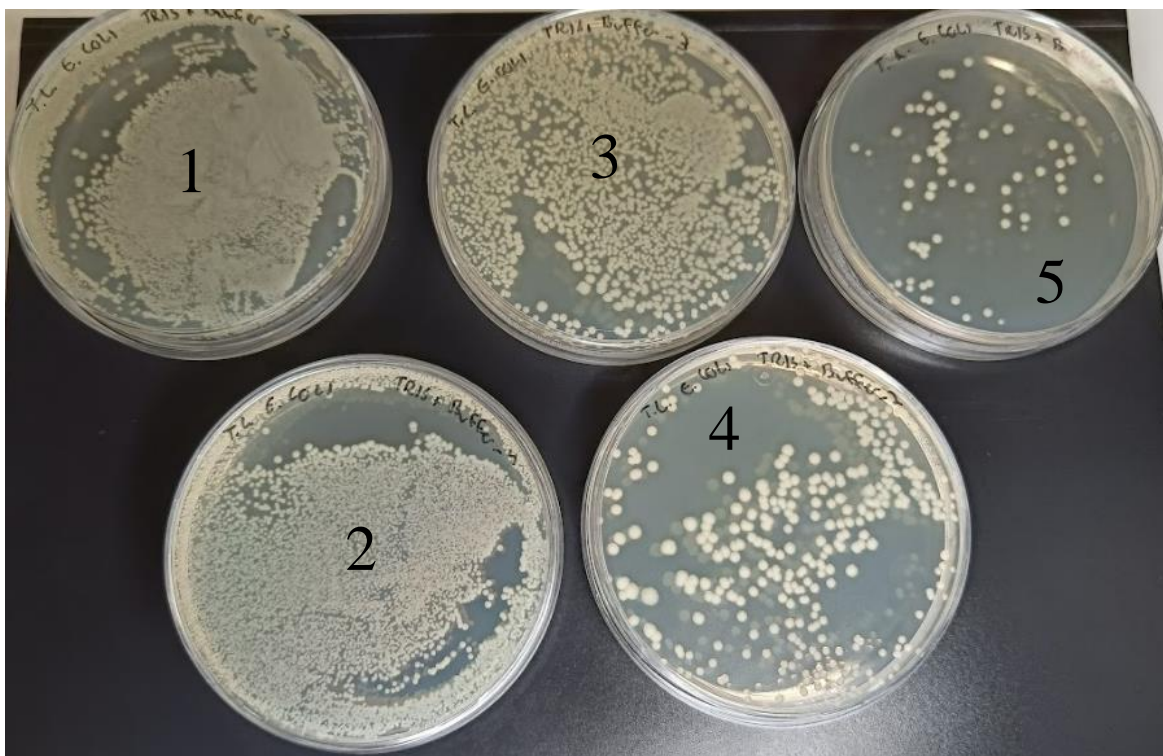
Suodatinpaperikiekosta eroon pääseminen osoittaa luotettavuutta siitä, ettei yhdisteliuoksesta sitoudu suodatinpaperille yhdisteitä. Kuvan 4 berberiinin suodatinkiekkovaihtaa väriä valkoisesta oranssinruskeaksi puhtasaineliuoksen värin takia. Suodatinpaperista luopumalla päästään eroon siitä riskistä, että jotkin yhdisteet eivät kykenisi diffuusoitumaan maljalla koska ne ovat sitoutuneena suodatinpaperiin.



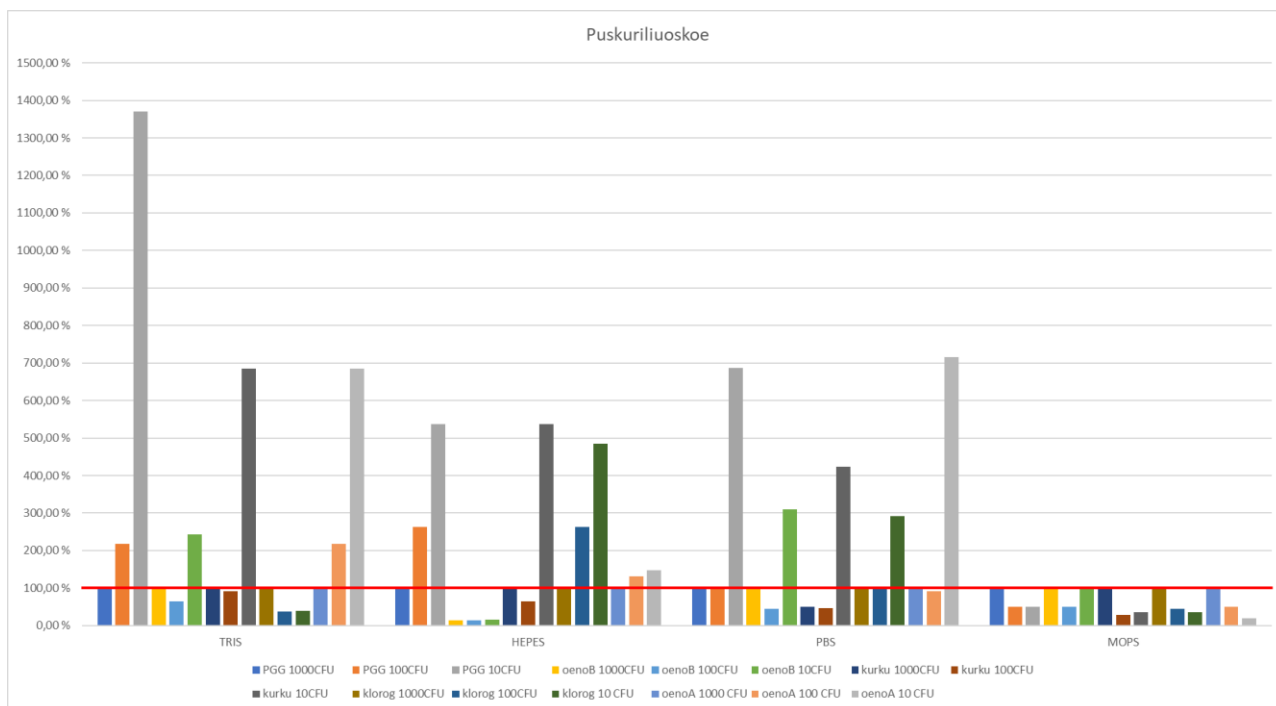
Kuva 4. Agardiffuusiomenetelmän testausta niin kuopassa, kuin kiekolla. Kokeessa haluttiin selvittää, onko suodatinpaperin ja agariin tehdyn kuopan välisessä diffuusiossa eroa ja nähdään, että näin ei ole. Yhdisteet valittiin aikaisempien risteävien tuloksien vuoksi. Malliyhdisteet ovat berberiini (1), PGG (2), oenothiini A (3), oenothiini B (4) sekä klorogeenihappo (5).

Puskuriliuoskokeista tulokset tulkittiin laskemalla pesäkkeitä, joita yön yli kasvaneet bakteerimaljat olivat tuottaneet. Väkevintä (bakteeripitoisuus >10000 CFU (colony forming unit) /ml) bakteeriliuosta sisältäneiltä maljoilta oli mahdotonta erottaa kaikkia pesäkkeitä, joka

on bakteerin kasvun kannalta hyvä asia, sillä puskuriliuoksella ei tällöin ole vaikutusta niiden kasvuun (Kuva 5). Puhdasaineita sisältävät bakteeriliuokset eivät myöskään osoittaneet puskuriliuoksen vaikuttavan bakteerin kasvuun, jolloin voitiin pesäkkeet laskemalla löytää PBS:ta parempi vaihtoehto. Kuvaan 6 on laskettu kaikki pesäkkeet aina tuhanteen saakka ja verrattu puhdasaineen läsnä ollessa puskuriliuoksen inhibiatiovaikutusta. Huomataan, että HEPES-puskuri toimii yhtä hyvin kaikkien bakteerien ja puhdasaineiden kanssa kuin PBS, ilman että polyfenoleilla olisi riskiä sidosefekteistä puskuriliuoksen kanssa. Liitteissä on kuvat kaikista bakteerimaljoista.



Kuva 5. Esimerkki puskuriliuoskokeesta kasvatetuista bakteereista, joista tuloksia vertailtiin laskemalla pesäkkeitä. Kuvassa TRIS-puskurin ja *E. coli* kasvatuksen tulokset. Bakteeriliuoksen väkevyyden maljalla 1 on 100000 CFU/ml, maljalla 2 10000 CFU/ml, maljalla 3 1000 CFU/ml, maljalla 4 100 CFU/ml ja. Maljalla 5 bakteeriliuoksen väkevyyden on 10 CFU/ml.



Kuva 6. Laskettujen *E. coli* pesäkkeiden määrä puskurin ja inhibiittorin liuoksessa verrattuna pelkän puskurin vaikutukseen bakteerin kasvuille. Punainen viiva kuvaa puskuriliuoksen pesäkkeiden tasoa. Puhdasaineina käytettiin pentagalloyyglukoosia (PGG), oenothiini A:ta, kurkumiinia, klorogeenihappoa sekä oenothiini B:tä.

3.1.2. Referenssimenetelmä

Kaikkien olosuhdekokeiden jälkeen saatiin luotua referenssimenetelmä agardiffuusiomenetelmällä kuopilla. Tulokset olivat toistettavia ja vastasivat aiemmin testattuja kokeita. Taulukkoon 5 on koottu referenssimenetelmällä saadut tulokset siten, että '-' -merkillä on kuvattu bakteeri+puhdasaine kombinaatioita, joilla ei tapahtunut inhibitiota ja '+' -merkkejä on annettu kombinaatioille sen mukaan, miten suuri inhibitiovyöhyke syntyy, ja miten selkeää inhibitio on. Edelleen PGG osoitti vahvaa inhibitiopotentialia, kuten myös molemmat oenothiinit. Muita inhiboivia puhdasaineita olivat klorogeenihappo sekä kurkumiini. Kuvat kaikista bakteerimaljoista löytyvät liitteistä.

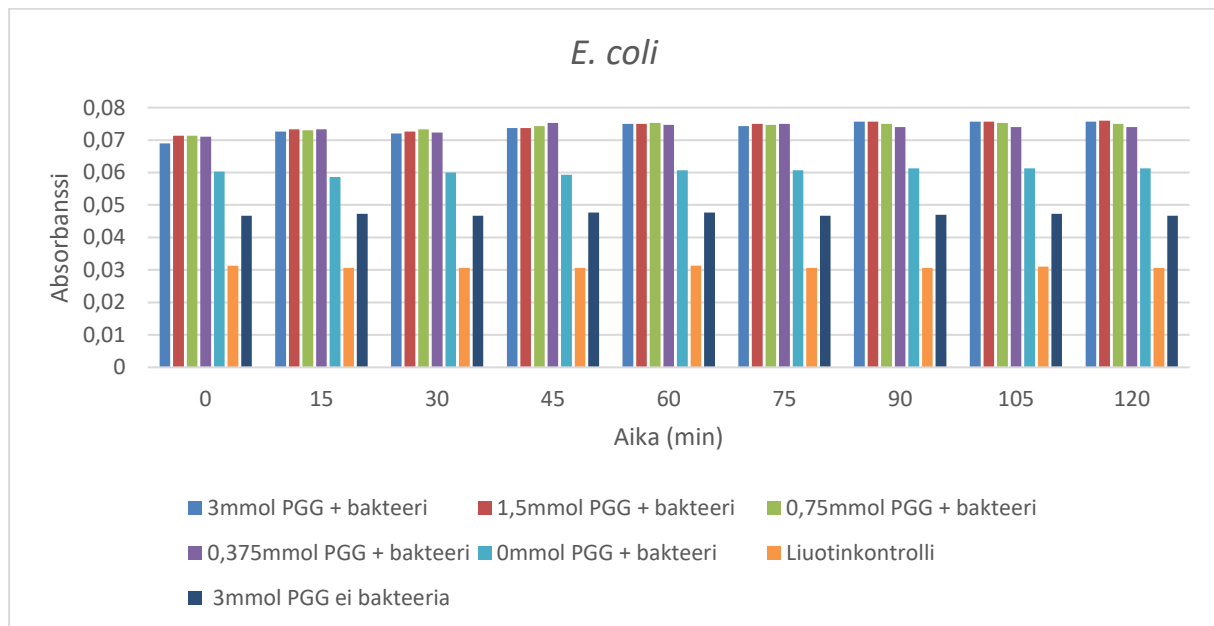
Tulosten perusteella oli mahdollista edetä kuoppalevymenetelmän luomiseen, käyttäen vertailuna referenssimenetelmää tulosten varmistamiseksi.

3.2. Kuoppalevymenetelmä

Kuoppalevymenetelmä perustuu kasvatusliuoksessa tapahtuvaan absorbanssin muutoksen seurantaan. Tämä mahdollistaa sen, että menetelmää voidaan hyödyntää sekä uusien potentiaalisten inhibiitioyhdisteiden löytämiseen että näiden yhdisteiden MIC-arvon määrittämiseksi.

3.2.1. Kompleksinmuodostuskokeet

Kompleksinmuodostusta testattiin liuottamalla PGG:a 15 % DMSO:n ja pipetoitiin kuoppalevylle 100 μ l. Kuvassa 7 nähdään, että kompleksinmuodostumista ei tapahdu. Tämän voi todeta siitä, ettei 2 h seurannan aikana absorbanssin tulokset muutu 0 min aikapisteen tuloksista. Koe toistettiin kaikilla bakteereilla eikä tulokset poikenneet *E. coli* tuloksista. Loput kaaviot on lisätty liitteisiin.

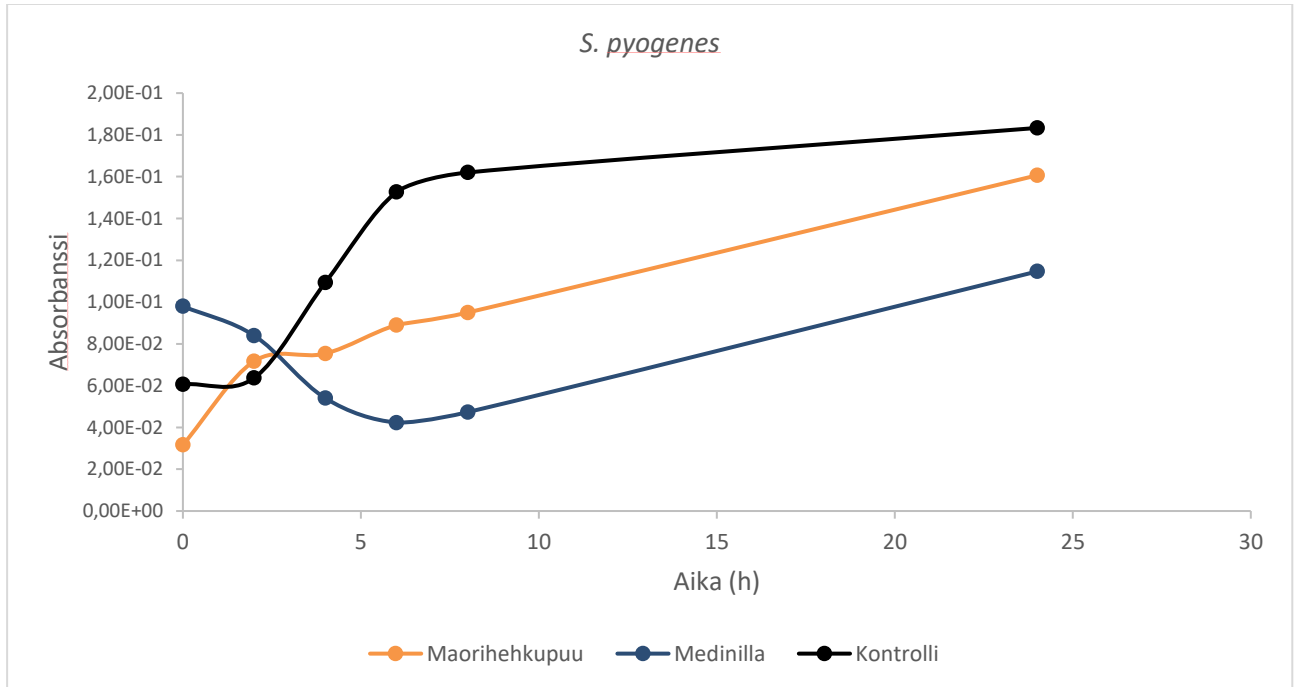


Kuva 7. Kompleksinmuodostuskokeen tulokset *E. coli* bakteerilla ja eri vahvuisilla PGG liuottimilla. Kompleksinmuodostumista seurattiin 15 minuutin välein 2 h ajan, eikä kompleksinmuodostumista tapahdu, koska tulokset pysyvät alun tasolla.

3.2.2. Kokeet kasvinäytteillä

24 tunnin seurannan jälkeen kaikki kasvinäytteet osoittivat vähintään osittaista inhibitiota johonkin bakteerikannoista. Bakteerien kasvua seurattiin ensimmäisillä bakteereilla useammalla aikapisteellä niiden kasvun varmistamiseksi (Kuva 8). Kasvu onnistui, sillä

kontrollikaaviosta nähdään alun logaritminen kasvuvaihe, jonka jälkeen kasvu tasoittuu. *S. pyogenes* tapauksessa näyttäisi kuitenkin siltä, että sekä medinilla että maorihehkupuu inhiboivat bakteerin tavanomaista kasvua, mutta ajan myötä kun vaikuttavan aineen määrä vähenee liuoksessa bakteeri pääsee kuitenkin kasvamaan.



Kuva 8. *S. pyogenes* bakteerin kasvun seuranta-kaavio.

Keltamo (A, kukat; B, lehdet) ja hullukaali (C, kukat; D, lehdet) ovat alkaloidikasveja. Valitettavasti näiden kasvien kaikkia mahdollisia yhdisteitä ei saatu hyödynnettyä. Niissä haasteena on se, että ei voitu käyttää happamia olosuhteita. Tutkimukseen valikoitujen bakteerikantojen happamuuden sietokyky on erittäin heikko eivätkä ne kestä happamia olosuhteita, sillä bakteerin solukalvo hapertuu ja hajoaa happamissa olosuhteissa (Booth, 1985). Ilman happamia olosuhteita ei voida olla varmoja, että kaikki alkaloidit olisivat optimaalisesti liukoisia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on huomattu keltamon osoittavan inhibitiota *S. aureuksen*, kanssa, jota ei kyetty todentamaan tällä tutkimuksella (Zielinska *et al.*, 2018) mutta inhibitiota tapahtui *P. aeruginosa* bakteerilla eli inhibitio oli muutenkin vähäistä. Keltamon pääyhdisteenä ovat isokinoliini-alkaloidit (Zielinska *et al.*, 2019). Hullukaali sisältää pääasiassa tropiini johdannaisia alkaloideja (Jaziri *et al.*, 1988) ja erityisesti hullukaalin juurten on osoitettu aikaisemmin inhiboivan *S. aureus* bakteereja (Dulger, Goncu and Gucin, 2010) ja vaikka tässä tutkimuksessa hyödynnettiin hullukaalin kukintoja sekä lehtiä, näkyi inhibitio tuloksissa.

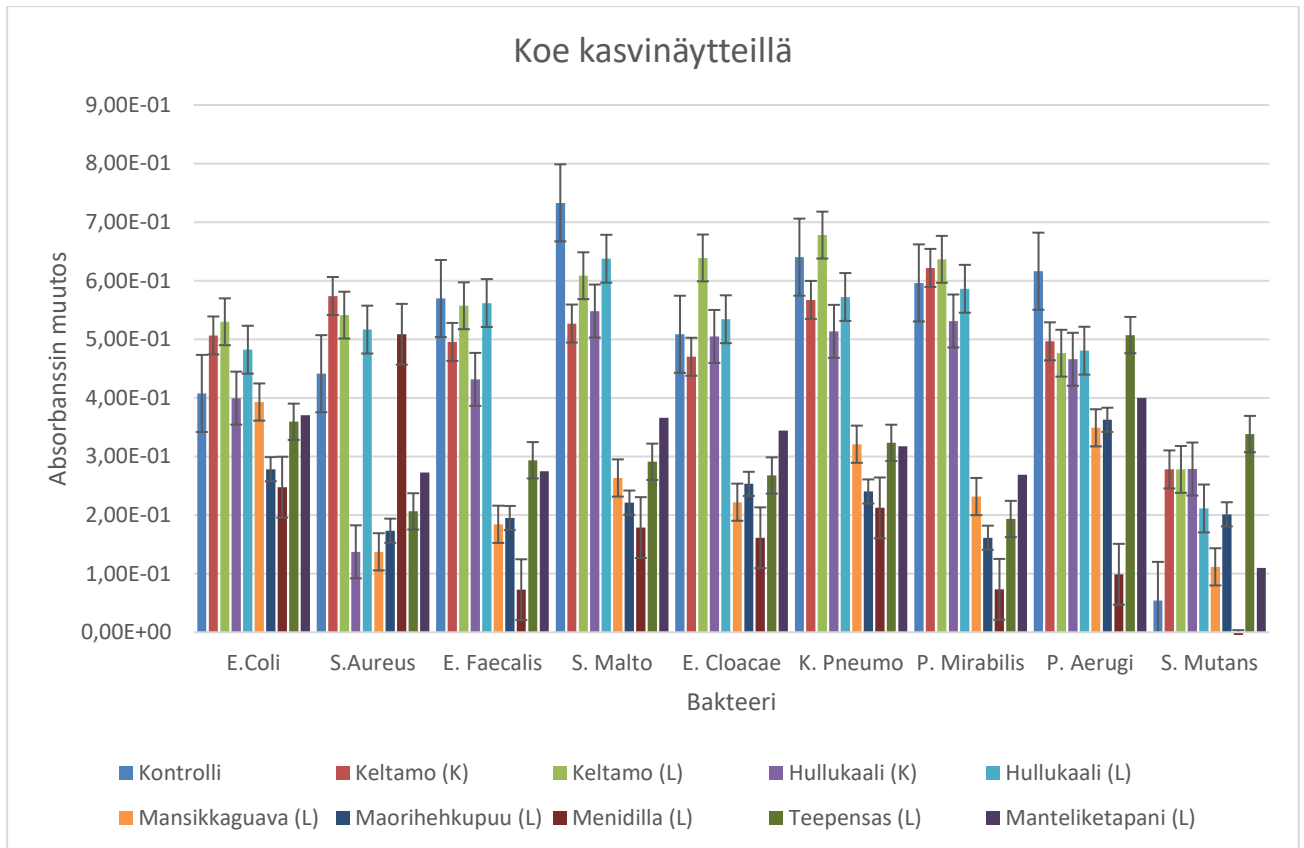
Mansikkaguava (E) sisältää avoketjuisia ellagitanniineja kuten esimerkiksi veskalagiinia ja kastalagiinia, joista osaan on linkittynyt myös flavan-3-oli-ryhmiä (Mallmann *et al.*, 2020). Terpeenejä on havaittu mansikkaguavaa tutkittaessa, joiden on arvioitu inhiboivan

erityisesti *S. aureus* bakteerikantoja (Soliman *et al.*, 2016). On myös osoitettu, että linkittyneillä flavan-3-oleilla, erityisesti epikatekiineilla, on kyky pienentää sydäntautien riskiä ja ne madaltavat verenpainetta (Schroeter *et al.*, 2006; Katalinić *et al.*, 2010). Tuloksista huomataan, että mansikkaguavan yhdisteet inhiboivat aktiivisesti lähes kaikkia bakteerikantoja. Ainoa resistentti bakteeri oli *S. mutans*.

Maorihehkupuun (F) pääyhdisteinä ovat oligomeeriset ellagitanniinit, erityisesti niin sanotut horsmamaiset ja muuntuneet horsmamaiset tanniinit (Mahajan, 2008). Tämä tarkoittaa evolutiivisesti horsmien ellagitanniineista kehittyneitä uusia oligomeereja, kuten esimerkiksi oenothiini A ja oenothiini B. Medinillan (G) pääyhdisteet ovat myös oligomeerisia ellagitanniineja, mutta erilaisia kuin horsmakasveissa, joten niillä on erilaisia ominaisuuksia kuin maorihehkupuusta löytyvillä oligomeerisilla ellagitanniineilla (Robil ja Tolentino, 2015). Esimerkkejä medinillasta löytyvistä yhdisteistä ovat medinilliinit A ja B. Aikaisemmin jo todettiin kiekkodiffuusiokokeella, että oenotheiinit osoittivat inhibitiota ja tulos toistuu myös kuoppalevyllä. Medinillan yhdisteet inhiboivat kaikkia bakteerikantoja. Medinillaa ja medinilliineja ei ole perusteellisesti tutkittu antimikrobiaalisten ominaisuuksien suhteen, joten tulos on mielenkiintoinen. Aikaisemmin medinillin B:tä on tutkittu vain syöpäsolujen kanssa, ja medinilliini B merkittävästi pidensi elinajanodotetta (Miyamoto *et al.*, 1993).

Teepensas (H) pääyhdisteet ovat flavan-3-oleja, kuten esimerkiksi epigallokatekiinigallaatti. Teepensas inhiboi kaikkia bakteerikantoja paitsi *S. mutans* bakteeria. Teepensaankatekiinien on aikaisemminkin osoitettu inhiboivan useita bakteerikantoja (Kumar *et al.*, 2012). Teepensaasta valmistetun teen päivittäisen juomisen on myös sanottu tappavan *S. aureusta* sekä muita haitallisia bakteereita sen antimikrobisten, antiviraalisten ja mutageenisten ominaisuuksien vuoksi (Toda *et al.*, 1991; You, 1993).

Manteliketapani (I) inhiboi myös kaikkia muita bakteerikantoja, paitsi *S. mutansia*. Manteliketapanin pääyhdisteet ovat monomeerisia ellagitanniineja, etenkin punikalagiinia, jonka on osoitettu olevan hyvinkin antimikrobiaktiivinen yhdiste (Rozadi, Oktavia and Fauziah, 2022). Punikalagiinin on osoitettu inhiboivain aikaisemmissa tutkimuksissa ainakin *S. aureus* kantoja (Xu *et al.*, 2017). Manteliketapanin lehtiä ja kaarnaa on aikaisemmin tutkittu erilaisten hiivasieni-infektioiden hoidossa (Terças *et al.*, 2017). Erityisesti manteliketapanista valmistettujen etanoli- sekä vesiliuosten on huomattu inhiboivan näiden sienien kasvua hyvin (Jagessar and Alleyne, 2011).



Kuva 9. Kasvinäytteillä tehdyn kokeen tulokset. Kuvassa vertaillaan absorbanssin muutosta 24 tunnin seurannan aikana. Kontrollina toimi pelkkä bakteerin kasvatusliuos, johon lisättiin vettä.

Yleisesti voidaankin siis todeta, että erityisesti ellagitanniineja sisältävät uutteet toimivat inhibiittoreina kaikille tutkimuksessa mukana olleille bakteereille. Kaikkien kasviuutteiden tulokset on koottu kuvaan 9.

4. Päätelmät

Lopputuloksena onnistuttiin luomaan menetelmä, jolla pystytään nopeasti ja tehokkaasti löytämään bakteerien sekä kasvinäytteiden väliltä kombinaatioita, jotka osoittavat inhibiitiopotentialia. Luotu menetelmä soveltuukin paremmin yhdisteiden seulontaan, kuin syvällisempään tutkimiseen. Useissa aikaisemmissa tutkimuksissa käytetyt menetelmät ovat työlämpiä mutta tutkimuksessa luotu menetelmä on nopea ja sillä kyetään yhden työpäivän aikana valmistaa ja analysoida yli 500 näytettä.

Menetelmää tulee vielä kehittää ja erityisesti menetelmän automatisointi on tärkeä kehityskohta. Esimerkiksi pipetointirobotiikkaa hyödyntäen voidaan kuoppalevyjä valmistaa automatisoidusti, jolloin jää enemmän aikaa tulosten analysoimiselle. Luotu menetelmä antaa mahdollisuuden tulevaisuudessa löytää mahdollisia uusia potentiaalisia lääkeaineita kriittisille bakteereille ja erityisesti polyfenolisista yhdisteistä suuret hydrolysoitavat tanniinit, kuten PGG ja oenothieinit, osoittivat suurta potentiaalia toimia inhibiittoreina tulevaisuudessa.

Lähteet

- Appel, H. M. (1993) 'Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation', *Journal of Chemical Ecology*, 19(7), pp. 1521–1552. doi: 10.1007/BF00984895.
- Bauer, A. W. *et al.* (1966) 'Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.', *American journal of clinical pathology*, 45(4), pp. 493–496.
- Booth, I. R. (1985) 'Regulation of cytoplasmic pH in bacteria.', *Microbiological reviews*, 49(4), pp. 359–378. doi: 10.1128/mr.49.4.359-378.1985.
- Campion, E. W. ja Morrissey, S. (2013) 'A Different Model — Medical Care in Cuba', *New England Journal of Medicine*, 368(4), pp. 297–299. doi: 10.1056/nejmp1215226.
- Cheyrier, V. *et al.* (2013) 'Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology.', *Plant physiology and biochemistry : PPB*, 72, pp. 1–20. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
- CLSI (2018a) 'Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard., Approval CDM-A.:', *M07 Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.*, p. 91.
- CLSI (2018b) 'Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters', *CLSI guideline M23*, 5.
- CLSI (2018c) 'Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests', 13.
- CLSI (2020) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing', 30.
- Dulger, B., Goncu, B. S. ja Guçin, F. (2010) 'Antibacterial activity of the seeds of *Hyoscyamus niger* L. (Henbane)', *Asian Journal of Chemistry*, 22(9), pp. 6879–6883.
- Engström, M. T. *et al.* (2016) 'The Oxidative Activity of Ellagitannins Dictates Their Tendency to Form Highly Stabilized Complexes with Bovine Serum Albumin at Increased pH', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(47), pp. 8994–9003. doi: 10.1021/acs.jafc.6b01571.
- Ericsson, H. M. ja Sherris, J. C. (1971) 'Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study.', *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, (Suppl. 217).
- Hagerman, A. E. (1989) 'Chemistry of Tannin-Protein Complexation', in Hemingway, R. W., Karchesy, J. J., and Branham, S. J. (eds) *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Boston, MA: Springer US, pp. 323–333. doi: 10.1007/978-1-4684-7511-1_20.
- Hassoun-Kheir, N. ja Harbarth, S. (2022) 'Estimating antimicrobial resistance burden in Europe—what are the next steps?', *The Lancet Public Health*, 7(11), pp. e886–e887. doi: 10.1016/S2468-2667(22)00250-X.
- Heinonen, M. (2007) 'Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics—a Finnish perspective.', *Molecular nutrition & food research*, 51(6), pp. 684–691. doi: 10.1002/mnfr.200700006.
- Høiby, N. *et al.* (2019) 'Formation of *Pseudomonas aeruginosa* inhibition zone during tobramycin disk diffusion is due to transition from planktonic to biofilm mode of growth', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(5), pp. 564–573. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.12.015.
- Jagessar, R. C. ja Alleyne, R. (2011) 'Antimicrobial potency of the aqueous extract of leaves of

Terminalia catappa', *Academic Research International*, 1(3), pp. 362–371. Available at: www.savap.org.pk/www.journals.savap.org.pk.

Jaziri, M. *et al.* (1988) 'Tropine alkaloids production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyoscyamus niger*', *Phytochemistry*, 27(2), pp. 419–420. doi: 10.1016/0031-9422(88)83111-X.

Johnson, M. T. J. *et al.* (2014) 'Macroevolution of plant defenses against herbivores in the evening primroses', *New Phytologist*, 203(1), pp. 267–279. doi: 10.1111/nph.12763.

Jorgensen, J. H. ja Ferraro, M. J. (2009) 'Antimicrobial susceptibility testing : A review of general principles and contemporary practices and the rationale for performing', 7750, pp. 1749–1755. doi: 10.1086/647952.

Kähkönen, M. P. *et al.* (1999) 'Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), pp. 3954–3962. doi: 10.1021/jf990146l.

Kähkönen, M. P., Hopia, A. I. ja Heinonen, M. (2001) 'Berry phenolics and their antioxidant activity', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), pp. 4076–4082. doi: 10.1021/jf010152t.

Katalinić, V. *et al.* (2010) 'Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia)', *Food Chemistry*, 119(2), pp. 715–723. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.019>.

Kim, J. *et al.* (2018) 'Oxidatively Active Plant Phenolics Detected by UHPLC-DAD-MS after Enzymatic and Alkaline Oxidation.', *Journal of chemical ecology*, 44(5), pp. 483–496. doi: 10.1007/s10886-018-0949-x.

Kim, J. (2020) *Distribution and oxidative activities of phenolic compounds in the plant kingdom.*

Kim, J. *et al.* (2020) 'Distribution of enzymatic and alkaline oxidative activities of phenolic compounds in plants.', *Phytochemistry*, 179, p. 112501. doi: 10.1016/j.phytochem.2020.112501.

Koponen, J. M. *et al.* (2007) 'Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), pp. 1612–1619. doi: 10.1021/jf062897a.

Korgenski, E. K. ja Daly, J. A. (1998) 'Evaluation of the BIOMIC video reader system for determining interpretive categories of isolates on the basis of disk diffusion susceptibility results.', *Journal of clinical microbiology*, 36(1), pp. 302–304. doi: 10.1128/JCM.36.1.302-304.1998.

de Kraker, M. E. A. ja Lipsitch, M. (2021) 'Burden of Antimicrobial Resistance: Compared to What?', *Epidemiologic Reviews*, 43(1), pp. 53–64. doi: 10.1093/epirev/mxab001.

de Kraker, M. E. A., Stewardson, A. J. ja Harbarth, S. (2016) 'Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?', *PLOS Medicine*, 13(11), p. e1002184. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002184>.

Kumar, A. A. A. *et al.* (2012) 'Antibacterial activity of green tea (*Camellia sinensis*) extracts against various bacteria isolated from environmental sources', *Recent Research in Science and Technology*, 4(1), pp. 19–23. Available at: <http://scienceflora.org/journals/index.php/trst/article/view/855>.

Lahuerta Zamora, L. ja Pérez-Gracia, M. T. (2012) 'Using digital photography to implement the McFarland method', *Journal of the Royal Society Interface*, 9(73), pp. 1892–1897. doi: 10.1098/rsif.2011.0809.

Landete, J. M. (2011) 'Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health', *Food Research International*, 44(5), pp. 1150–1160. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>.

- Liu, T.-Y. *et al.* (2012) 'Differentiation of Bacteria Cell Wall Using Raman Scattering Enhanced by Nanoparticle Array', *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12, pp. 5004–5008. doi: 10.1166/jnn.2012.4941.
- Lloyd, W. C. (2022) *What is the difference between Gram-positive and Gram-negative bacteria?*, *Medical News Today*. Available at: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/gram-positive-vs-gram-negative>.
- Mahajan, I. (2008) 'Flavour of wine treated with toasted New Zealand woods', (May), p. 81.
- Mallmann, L. P. *et al.* (2020) 'Comprehensive identification and quantification of unexploited phenolic compounds from red and yellow araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) by LC-DAD-ESI-MS/MS', *Food Research International*, 131(January), p. 108978. doi: 10.1016/j.foodres.2020.108978.
- Mancuso, G. *et al.* (2021) 'Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens.', *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10). doi: 10.3390/pathogens10101310.
- McKie, J. E. (1977) 'Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing', *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 60(3), p. 749. doi: 10.1093/jaoac/60.3.749.
- Miyamoto, K. *et al.* (1993) 'Antitumor Activities of Ellagitannins against Sarcoma-180 in Mice', *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 16(4), pp. 379–387. doi: 10.1248/bpb.16.379.
- Moilanen, J., Koskinen, P. ja Salminen, J. P. (2015) 'Distribution and content of ellagitannins in finnish plant species', *Phytochemistry*, 116(1), pp. 188–197. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.03.002.
- Nijs, A. *et al.* (2003) 'Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory.', *Journal of clinical microbiology*, 41(8), pp. 3627–3630. doi: 10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003.
- Patel, J. B. *et al.* (2011) 'Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods', in *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 1122–1143. doi: <https://doi.org/10.1128/9781555816728.ch68>.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. ja Pantosti, A. (2015) 'Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon.', *Pathogens and global health*, 109(7), pp. 309–318. doi: 10.1179/2047773215Y.0000000030.
- Robil, J. L. M. ja Tolentino, V. S. (2015) 'Histological localization of tannins at different developmental stages of vegetative and reproductive organs in *Medinilla magnifica* (Melastomataceae)', *Flora*, 217, pp. 82–89. doi: 10.1016/j.flora.2015.10.003.
- Rozadi, N., Oktavia, S. ja Fauziah, F. (2022) 'Pharmacological Activities of Punicalagin: A Review', *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 12(2), pp. 148–155. doi: 10.22270/jddt.v12i2.5377.
- Salminen, J. P., Karonen, M. ja Sinkkonen, J. (2011) 'Chemical ecology of tannins: Recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure-activity patterns', *Chemistry - A European Journal*, 17(10), pp. 2806–2816. doi: 10.1002/chem.201002662.
- Schroeter, H. *et al.* (2006) '(%) -Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans', 103(4). doi: 10.1073/pnas.0510168103.
- Soliman, F. M. *et al.* (2016) 'Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L . and *Psidium cattleianum* Sabine leaves', *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 54(2), pp. 219–225. doi: 10.1016/j.bfopcu.2016.06.003.
- Tamim, K., Pätäri-Sampo, A. ja Kantele-Häkkinen, A. (2023) 'Penisilliinit', in *Farmakologia ja toksikologia*. Available at: https://www.oppiportti.fi/op/lft00379/do?p_haku=penisilliini#q=penisilliini.

- Terças, A. G. *et al.* (2017) 'Phytochemical characterization of *Terminalia catappa* Linn. extracts and their antifungal activities against *Candida* spp', *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2017.00595.
- Toda, M. *et al.* (1991) 'The protective activity of tea against infection by *Vibrio cholerae* O1.', *The Journal of applied bacteriology*, 70(2), pp. 109–112. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb04435.x.
- Xu, Y. *et al.* (2017) 'Antimicrobial Activity of Punicalagin Against *Staphylococcus aureus* and Its Effect on Biofilm Formation', *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(5), pp. 282–287. doi: 10.1089/fpd.2016.2226.
- You, S. Q. (1993) '[Study on feasibility of Chinese green tea polyphenols (CTP) for preventing dental caries].', *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*, 28(4), pp. 197-199,254.
- Zhang, T. T. *et al.* (2018) 'Antioxidant and anti-inflammatory effects of polyphenols extracted from: *Ilex latifolia* Thunb', *RSC Advances*, 8(13), pp. 7134–7141. doi: 10.1039/c7ra13569f.
- Zielinska, S. *et al.* (2018) 'Greater celandine's ups and downs-21 centuries of medicinal uses of *Chelidonium majus* from the viewpoint of today's pharmacology', *Frontiers in Pharmacology*, 9(APR). doi: 10.3389/fphar.2018.00299.
- Zielinska, S. *et al.* (2019) 'The activity of isoquinoline alkaloids and extracts from *chelidonium majus* against pathogenic bacteria and *Candida* sp', *Toxins*, 11(7). doi: 10.3390/toxins11070406.