

PAKURIKÄÄVÄN BIOAKTIIVISET YHDISTEET

Miika Niemeläinen
Luonnontieteiden kandidaatin tutkielma
Biolääketieteen koulutusohjelma
Turun yliopisto
Lääketieteellinen tiedekunta
Biolääketieteen laitos
huhtikuu 2019

Avainsanat: pakurikääpä, bioaktiiviset yhdisteet, terapeutinen käyttö, uuttoliuotin

Tiivistelmä

Pakurikääpä eli pakuri on sieni, jota on vuosisatoja käytetty lukuisiin terapeuttisiin tarkoituksiin. Pakurin käytön suosio ei ole aikojen saatossa hiipunut, mikä tekee siitä yhä ajankohtaisen aiheen. Pakurin bioaktiivisista ominaisuuksista on saatu paljon viitteitä erilaisten soluviljely- ja hiirimallien kautta, mutta kliinisten kokeiden puuttuessa lääkinnällisen käytön todellinen hyöty kiistanalaista. Tämän tutkielman kirjallisuuskatsauksessa keskitytään siihen, mitä kaikkea tiedetään pakurin mahdollisista terapeuttisista yhdisteistä, sekä arvioidaan niiden terapeuttista arvoa.

Tutkielman kokeellisessa osuudessa tutkittiin pakurin erilaisia uuttamismenetelmiä analysoimalla näytteiden sisältämien yhdisteiden kokonaispitoisuuksia, antioksidanttisuusarvoja sekä fenolisten yhdisteiden määrää. Yhdisteiden kokonaispitoisuuksia mitattaessa vesi osoittautui ylivoimaisesti parhaaksi uuttoliuottimeksi. Uuttoliuottimella (vesi, 80 % etanoli tai 80 % aseton) ei ollut juuri vaikutusta uutteen antioksidanttisuusarvoihin, mutta uuttolämpötilan nousu oli yhteydessä antioksidanttisuusarvojen kohoamiseen. Vesi oli paras uuttoliuotin myös fenolisia yhdisteitä uuttaessa. Vesiliukoisten yhdisteiden ohella pakurikäävältä on tunnistettu lukuisia mahdollisesti terapeuttisia yhdisteitä, jotka ovat steroidirunkoisia ja rasvaliukoisia. Osa pakurikäävän terapeuttisesta potentiaalista jää siis hyödyntämättä vesiuutoksia valmistettaessa.

Pakurin tärkeimpiä mahdollisesti terapeuttisia yhdisteitä ovat betuliinirunkoiset yhdisteet, inotodioli, inotolaktonit A ja B, trametenolihappo, erilaiset polyfenolit, beeta-1,6-D-glukaanit sekä polysakkariidiyhdisteet. Nämä yhdisteet liukenevat hyvin eri tavalla erilaisiin uuttoliuottimiin, minkä takia uuttoliuottimella on keskeinen vaikutus pakurin mahdollista terapeuttista käyttöä arvioidessa.

Tutkimusten perusteella pakurin bioaktiivisten yhdisteiden pitoisuuksien on usein havaittu jäävän kovin alhaisiksi, kun kyseessä on perinteinen vesi- tai alkoholiuutos. Yksittäisiä terapeuttisia käyttökohteita on kuitenkin tunnistettavissa myös pakurin perinteisellä käytöllä esim. pakuriteen tai -tinktuuran muodossa. Pakuriteen tai -tinktuuran hyötykäyttö ei silti ole useinkaan perusteltua erilaisten sairaudellisten tilojen hoidossa. Pakuri voi kuitenkin teoriassa mahdollistaa laajemmankin terapeuttisen käytön useiden oireiden/sairaudellisten tilojen hoidossa. Tämän mahdollisen määränpään saavuttaminen saattaisi kuitenkin vaatia sen, että pakurin bioaktiiviset yhdisteet eristetään ja konsentroidaan sekä mahdollisesti jatkojalostetaan sen perinteisestä käytöstä poiketen.

Kokeellisen osuuden tärkein tulos on käytetyn uuttomenetelmän keskeinen vaikutus erityisesti tulehduksellisten tilojen mahdollisessa hoidossa pakurikäävällä. Perehtymällä pakurikäävältä julkaistuihin artikkeleihin, raportteihin ja kirjoihin saatiin kokonaisuudessaan selvennettyä pakurin yhdistekoostumuksen ja mahdollisen terapeuttisen käytön välistä yhteyttä.

Sisällys

1	Johdanto	4
2	Pakurikäätä	
2.1	Biologia	5
2.2	Uutteet ja niiden käyttökohteet.....	6
2.3	Historiallinen käyttö	8
2.4	Käyttö rohdoslääkkeenä	8
3	Yhdisteet	
3.1	Luokittelu ja yleistä	9
3.2	Terapeuttinen käyttö	
3.2.1	Tulehduksen hillitseminen.....	13
3.2.2	Immunitettä aktivoiva vaikutus	17
3.2.3	Antitumoraaliset vaikutukset syöpäsoluissa	18
3.2.4	Antimikrobiset vaikutukset.....	19
3.2.5	Sokeri- ja rasva-aineenvaihdunnan säätely.....	21
3.2.6	Muut vaikutukset	22
3.3	Muut yhdisteet.....	24
3.4	Mahdolliset haittavaikutukset.....	25
4	Kokeellinen osuus: erilaisten pakuriutteiden yhdistekoostumukset	
4.1	Uuttamismenetelmät ja menetelmät.....	26
4.2	Tulokset.....	28
5	Yhteenveto ja johtopäätökset	32
6	Kiitokset	35
7	Lähteet ja liitteet	
7.1	Kuvat ja taulukot	36
7.2	Lähteet	36

1 JOHDANTO

Pakurikäpää (**Inonotus obliquus**; englanniksi **Chaga mushroom**; ruotsiksi **Sprängticka**) on yleinen lehtipuiden lahottajasieni, jota esiintyy boreaalisella havumetsävyöhykkeellä. Pakuri on erityisesti viime aikoina saanut huomiota sen lukuisten erilaisten väitettyjen terveysvaikutusten ja sairauksia hoitavien ominaisuuksien vuoksi. Pakurikäpää kuuluu niin sanottuihin lääkinällisiin sieniin, ja sillä on raportoitu olevan lukuisia antimikrobisia, immuniteettia stimuloivia, tulehdusta hillitseviä, kipua lievittäviä ja syöpäsoluja tuhoavia vaikutuksia. Näiden lisäksi pakurilla on väitetty olevan positiivisia vaikutuksia veren glukoosipitoisuuden säätelyyn.

Yleisesti ottaen sienten lääkinällisessä käytössä eli fungiterapiassa nähdään paljon mahdollisuuksia. Sienistä on löydetty lukuisia farmakologisesti aktiivisia molekyylijä, ja osa yleisesti käytetyistä lääkkeistä onkin alun perin eristetty sienistä. Esimerkkeinä näistä ovat antibiootit penisilliini, erytromysiini ja griseofulviini sekä elinsiirtojen jälkeisissä hyljintäreaktioissa käytetty siklosporiini. Merkittävä osa erityisesti mikrobilääkkeistä ja solunsalpaajista on sieniperäisiä. Nykyisin tunnemme noin 700 eri sienilajiketta, joista noin 400 lajikkeella on arvioitu olevan lääkinällisiä vaikutuksia ¹.

Sienten bioaktiiviset yhdisteet ovat kemialliselta koostumukseltaan pääsääntöisesti polysakkarideja, steroideja (mm. triterpeenit) ², glykoproteiineja (proteiineja, joihin on liitetty hiilihydraattiryhmiä) ³ tai fenolisia yhdisteitä (kuten erilaiset tanniiniyhdisteet) ⁴. Miljoonien vuosien evoluution aikana sienet ovat kehittäneet mikrobeja vastaan lukuisia erilaisia puolustusmekanismeja, joita me ihmiset nykyisin hyödynnämme mm. erilaisina antimikrobisesti vaikuttavina molekyyleinä.

Tässä tutkielmassa keskitytään pakurikäävän yhdisteiden lääketieteellisiin vaikutuksiin ja toimintamekanismeihin, sekä pohditaan niiden mahdollisia terapeuttisia käyttökohteita ihmisellä. Esille nostetaan pohdintoja siitä, mitkä yhdisteistä voisivat olla tärkeimpiä terapeuttisesta näkökulmasta. Samalla tuodaan esille ne yhdisteet, jotka eivät todennäköisesti sovellu ihmiselle käytettäväksi huolimatta lupaavista vasteista, joita nämä yhdisteet ovat aikaansaaneet soluviljely- ja hiirimalleissa. Lopuksi kokeellisessa osuudessa esitetään pakurikäävälle eri lämpötiloissa tehtyjen vesi-, alkoholi- ja asetoniuuttomenetelmien yhdistekoostumukset ja pohditaan eri uuttomenetelmien hyviä ja huonoja puolia terapeuttisesta näkökulmasta.

2 PAKURIKÄÄPÄ

2.1 Biologia

Pakurikäpä on ulkomuodoltaan poltetun hiilen näköinen pullistuma, jonka voi löytää lehtipuiden (yleisimmin koivun) rungosta ulospäin työntyneenä. Se ei kuitenkaan itsessään ole käpä, vaan pikemminkin koivun rungon kasvannainen. Sen pintarakenne on kova ja helposti mureneva. Pikimustan ulkokuoren alta paljastuu selvästi vaaleampi oranssinkanelimaisen värinen sisäosa (Kuva 2), joka on koostumukseltaan pehmeämpi ja korkkimainen. Pakurikäpä on osa koivua, ja se syntyy koivun yrittäessä puolustautua pakurin aiheuttamaa sieni-infektiota vastaan kemiallisesti puun rungon sisäosissa. Pakurin aiheuttama infektio synnyttää käytännössä aina yllä kuvatun mustan kyhmyä koivun runkoon. Vuosia jatkuva kemiallinen taistelu päättyy käytännössä aina isäntäpuun kuolemaan. Isäntäpuun kuoltua sen sisällä oleva sieni jatkaa eloaan, kunnes se aiheuttaa lopulta pakurikäävän ympärillä olevan kuoren repeämisen, ja alta paljastuu sienien itiöemä, josta uudet itiöt pääsevät tuulen mukana edelleen tartuttamaan uusia lehtipuita. Itiöt eivät kykene tunkeutumaan ehjän puun kuoren läpi, vaan kohdepuun kuoren tulee olla vaurioitunut, jotta uusi infektio olisi mahdollinen.

Pakurikäpä itsessään koostuu sekä pakurisienen soluista että puun omista kasvisoluista. Nämä kahdentyyppiset solukot ovat pakurikäävässä sekalaisesti jakautuneena. Pakurikäävän ja puun välillä vallitsee eloonjäämiskamppailun omainen kilpailutilanne, jossa pakuri yrittää tuhota uhrinsa eli kohdepuun ja puu yrittää puolestaan hillitä pakurin kasvua ja tuhota sen. Pakurikäpä-puu-vastakkainasettelun seurauksena pakurikäpään syntyy lukuisia erilaisia yhdisteitä kahden lajin välisen kemiallisen taistelun kautta. Pakurin sieniperäiset yhdisteet ovat peräisin pakurin puuhun aiheuttamasta kemiallisesta manipulaatiosta, joiden avulla pakuri yrittää mm. vaimentaa puun puolustuskykyä, levitä syvemmälle puuhun sekä kasvattaa mustan hiilimäisen kasvaimen puun rungon kohdalle. Esimerkiksi ergosteroliperoksidi on pakurisienestä peräisin oleva yhdiste (Kuva 3). Kasvipäiset yhdisteet ovat puolestaan peräisin puun kemiallisesta puolustuksesta pakuria vastaan, joilla puu pyrkii mm. hillitsemään pakurin kasvua ja leviämistä sekä tuhoamaan pakurin soluja. Esimerkiksi betuliini (Kuva 4) on puusta peräisin oleva yhdiste, jolla se pyrkii hillitsemään sienien kasvua.

Pakuri aiheuttaa mustan hiilimäisen muodostuman puun rungon ulkopinnalle kemiallisen manipulaation kautta. Turun yliopiston biodiversiteetti- ja ympäristötutkimuksen professori emeritus Pekka Niemelän arvioiden mukaan pakurin musta ulkokuori saattaa auttaa sienien kasvua kahdella erilaisella teoreettisella tavalla. Ensinnäkin musta kuori kerää lämpöä auringon valossa, mikä mahdollisesti helpottaa pakurin kasvua ja leviämistä. Erityisesti keväällä tällä saattaa olla hyvinkin suuri merkitys, sillä pakurin musta kuori kerää enemmän lämpöä esim. koivun valkeaan runko-osaan verrattuna. Näin

ollen voidaan sanoa, että kesä koittaa pakurille infektoitunutta puuta nopeammin, jolloin pakurin kasvukausi alkaa aikaisemmin. Tämä johtaa luonnollisesti kilpailuetuun. Mustan kuoren toinen kilpailuetu johtunee lämpölaajenemisesta. Auringon lämmittäessä pakurin mustaa kuorta, se kuumenee ja laajenee oleellisesti enemmän puun vaaleaan osaan verrattuna. Lämpölaajenemisesta aiheutuva ero puun valkean ja mustan osan välillä synnyttää rasisitusta, mikä saattaa aiheuttaa vaurioita puun solu-koille ja erityisesti pakurikasvaimen ympärillä olevalle vaalean ja mustan rajapinnan alueelle. Puun solukon vauriot edelleen helpottaisivat pakurin infektion etenemistä.

2.2 Uutteet ja niiden käyttökohteet

Ehdottomasti yleisin tapa hyödyntää pakurikäypää on valmistaa siitä vesiuutos (toisin sanoen valmistaa siitä teetä). Sen makua voisi kuvailla kitkerähkön sienimäiseksi, jossa on hienohko maaperän viivahteinen sivumaku. Toiseksi yleisin tapa on alkoholiuutoksen eli tinktuuran valmistaminen. Joissain lähteissä mainitaan myös pakurin fermentoimisesta, mutta sen käyttö ei ole vakiintunut. Pakuria käytetään ruuanlaitossa esim. yhtenä smoothien raaka-aineista, mutta pakurikäyvän solukkoa ympäröivän kovan kitiinikerroksen vuoksi sen sisältämät ravinteet imeytyvät heikosti elimistöön sellaisenaan jauheena nautittuna tai ruuan sekaan pikaisesti lisättynä. Sen vuoksi on järkevämpää uuttaa pakuria pitkään, jotta sen yhdisteet pääsisivät liukoiseen muotoon. Tehokkain tapa hyödyntää mahdollisimman suuri osa pakurin yhdisteistä on sen pitkäaikainen uuttaminen nestemäisessä uuttoliuottimessa, joka on yleensä joko vesi tai alkoholi. Vedellä uutettaessa esim. 80 °C:ssa uuttoaajat voivat olla tunteja ja tinktuuroiden valmistuksessa huoneenlämmössä viikkoja. Eräs kaupallisesti saatava tuote pyrkii maksimoimaan molemmista uutoksista saatavat hyödyt. Kyseessä on kaksoisuute-niminen valmiste, jossa on yhdistetty sekä vesi- että alkoholiuutokset. Näitä on olemassa sekä valmiina uutteenä että kuivattuna jauheena (johon lisätään ensin vettä ja sitten juodaan). Kaksoisuutoksella valmistetut tuotteet voisivat ainakin teoriassa mahdollistaa laaja-alaisemman terapeuttisen käytön, sillä siihen on liuenneena sekä vesi- että rasvaliukoisia bioaktiivisia yhdisteitä.

Pakuria saa kaupoista myös raakaa pakurijauhetta sisältävinä kapseleina. Näiden käytöstä ei todennäköisesti ole mitään merkittävää käytännön hyötyä johtuen pakurin solujen kovasta kitiinikuoresta, joka ei normaalisti hajoa ruuansulatuskanavassa. Tällöin kitiinikuoren sisällä olevat yhdisteet eivät luonnollisesti pääse ruuansulatuskanavaa pidemmälle. Toisaalta kaupasta saatavat kaksoisuuttomenetelmällä valmistetut jauhetta sisältävät kapselit ovat käyttökelpoisempia, sillä niiden sisältämät yhdisteet ovat vapaana, eivätkä sitoutuneena kitiinikuorellisten solujen sisälle.

Pakuria voidaan myös uuttaa öljyyn ja sitä on saatavilla esimerkiksi ihovoiteena ja öljytippoina. Öljyyn liukenevat vain rasvaliukoiset yhdisteet, jotka voivat edelleen vaikuttaa fysiologisesti omalla tavallaan vesiliukoisiin yhdisteisiin verrattuna. Esimerkiksi pakurin monenlaiset eeteriset öljyt ja

muut rasvaliukoiset steroidiyhdisteet, kuten betuliini, voivat tarjota terapeuttisen vaikutuksen mm. ihovoiteena. Rasvaliukoiset yhdisteet imeytyvät yleisesti ottaen vesiliukoisia yhdisteitä paremmin ihon läpi, ja näin ollen niiden toisena merkittävänä antoreittinä voi sisäisen käytön lisäksi toimia iho. Toisaalta vesiliukoisiakin yhdisteitä on mahdollista imeyttää ihon läpi apuaineiden, kuten emulsiogeelin, avulla. Pakuritee soveltuu käytännössä ainoastaan suun kautta nautittavaksi, sillä siihen on liuenneena pääasiassa vesiliukoisia yhdisteitä, kun taas öljyutteen voisivat ainakin teoriassa soveltua paikallisesti iholla käytettäväksi. Tällöin ei pyritä systeemiseen vaikutukseen vaan paikalliseen tehoon iholla. Tinktuurin lisääminen suoraan iholle voi myös teoriassa tarjota terapeuttisen vaikutuksen, mutta alkoholin nopea haihtuminen iholta saattaa jättää jälkeensä huomattavan osan liukenemattomia yhdisteitä ihon pinnalle, jotka eivät koskaan pääse imeytymään ihon läpi.



Kuva 1. Pakurikäävän ulko-osa



Kuva 2. Pakurikäävän halkaistu sisäosa

2.3 Historiallinen käyttö

Vaikka pakurikäätä on taloudellisesti haitallinen sienilaji metsänhoidon kannalta, on sillä havaittu jo vuosisatojen ajan olevan lukuisia erilaisia käyttökohteita. Muinaiset Lapin samaanit käyttivät sitä samaanirumpujen pohjina hyvien kaikuominaisuuksien vuoksi. Suutarit ja räätälit ovat saattaneet entisaikaan hyödyntää pakurin korkkimaista ja pehmeämpää sisäosaa neulatyynynä. Taulakäävän tavoin pakurilla tiedetään olevan hyvät palamis- ja kytemisominaisuudet, minkä vuoksi sitä on käytetty myös tulen varastointiin ja sytyttämiseen. Tumman värinsä vuoksi pakurikäätää on käytetty lisäksi värjäämiseen. Joissain yhteyksissä sitä on tietävästi hyödynnetty myös sytykkeenä ja suitsukkeena mm. erilaisissa rituaaleissa ⁵.

Vaikka pakurikäätää voidaan käyttää monipuolisesti, sen merkittävin käyttökohte on kuitenkin lääketieteen alalla. Pakurin terapeuttinen käyttö on maailmanlaajuisesti keskittynyt selvästi vahvimmiten Venäjän alueelle. Pakuria on yrtilääkinnässä ja kansanlääkinnässä käytetty vuosisatoja mm. syöpien, kiputilojen, tulehduksen, tuberkuloosin, diabeteksen, ulkoisten haavojen ja vatsahaavojen hoitoon. Muina käyttökohteina ovat olleet suonikohjujen, psoriaksen, atooppisen ihottuman, nivelvaivojen ja ihon kutinan hoito. Kansankertomuksissa pakurilla väitetään olevan vaikutuksia yleisen vireystilan parantamiseen, sydän- ja maksasairauksiin sekä elimistön sisäiseen puhdistamiseen. Venäjällä pakurikäävästä on puolestaan kirjattu lukuisia anekdotaalisia tapauksia, joiden mukaan sen avulla on hoidettu tai jopa kokonaan parannettu syöpiä. Venäjällä asiassa on menty asian suhteen niin pitkälle, että vuonna 1955 Neuvostoliiton Kasvitieteellisen Akatemian kehittämä Befungin-niminen uute (sisältää pakurin lisäksi kobolttikloridia) hyväksyttiin käytettäväksi virallisena syöpälääkkeenä ⁶. Viimeaikaisten tutkimusten valossa pakurilla onkin todettu monia syöpäsoluja hillitseviä ja tuhoavia vaikutuksia soluviljelmissä. Kuitenkin vaikuttavien yhdisteiden eristäminen ja tehon osoittaminen vaativat vielä paljon lisätutkimuksia.

2.4 Käyttö rohdoslääkkeenä

Pakurikäävän monista tunnetuista yhdisteistä osalla on havaittu olevan bioaktiivisia vaikutuksia, mikä luo pohjan sille oletukselle, että pakurikäävällä saattaa olla edullisia vaikutuksia erilaisten tautien oireiden hoidossa. Kymmenet tutkimukset erilaisilla soluviljelymalleilla ovat osoittaneet näiden bioaktiivisten yhdisteiden välittävän monia erilaisia fysiologisia vaikutuksia. Ei-kliinisistä kokeista saatujen tulosten perusteella tehdyt johtopäätökset ovat tuoneet jonkinlaista näyttöä pakurin mahdollisista terapeuttisista käyttömahdollisuuksista. Vaikutusten on väitetty ilmenevän veren korkean virtsahappopitoisuuden laskuna, syövän kasvun hillitsemisenä ja syöpäsolujen tuhoutumisena, rasva-aineen vaihdunnan aktivoitumisena, verensokerin tasapainottumisena sekä solujen parantuneena stres-

sinsietokykyä. Muut vaikutukset ovat väitetyksi ilmenneet vähentyneenä altistumisena mutageenisille tekijöille, immuunipuolustuksen stimuloimisena ja hillitsemisenä, tulehdusta ja kipua lieventävinä vaikutuksina, antimikrobisina vaikutuksina, ihon melaniinitasojen stimuloimisena eli ruskettumisena ja mikrobiflooran tasapainottumisena. Näitä väitteitä tarkastellaan tieteellisestä näkökulmasta yksityiskohtaisesti tutkielman 3.2.-luvussa.

Soluviljely- ja koe-eläinmalleilla päästään kuitenkin vain suuntaa-antaviin tuloksiin varsinaisten ihmiskokeiden ollessa hyvin harvassa. Yksittäisiä kliinisiä kokeita on tehty Venäjällä, mutta ne ovat olleet luonteeltaan epätarkkoja ja epävirallisia. Kokeisiin liittyvät raportoinnit ovat keskittyneet yleisesti ottaen syövän, tulehduksellisten maha-suolistokanavan oireiden, tyyppin 2 diabeteksen ja ihosairauksien hoitoon. Luonteeltaan tällaiset raportoinnit ovat olleet erilaisia potilaskertomuksia sekä pienimuotoisia, pääosin kontrolloimattomia tutkimuksia. Ne ovat antaneet osittain erittäin lupaavia tuloksia. Esimerkiksi yhdessä kokeessa ihmisten suolistollista tulehdustilaa saatiin lievitettyä pakurin avulla huomattavasti. Ihotauti psoriasis saatiin puolestaan hoidettua kokonaan yli 75 %:lla kokeessa olleista ihmisistä ⁷. Tutkimukseen osallistui 50 ihmistä, mikä on tutkimuksen luotettavuuden kannalta riittämätön lukumäärä. Diabetespotilailla taas raportoitiin verensokerin tasapainottumista ja parantunutta endoteelifunktiota. Kokeeseen osallistui yhteensä 20 tervettä ja 20 diabeetikkoa ⁸. Muutamien kliinisten kokeiden mukaan pakurista tehtyjen kuumavesiuutteiden on raportoitu pehmentäneen ja pienentäneen kovia kasvaimia sekä lievittäneen niistä aiheutuvia kipuja ⁹.

Nämä raportoidut tulokset ovat kuitenkin perustuneet lähinnä ihmisten omiin raportointeihin osastoilla eivätkä ollenkaan varsinaisiin systemaattisesti rakennettujen tutkimusten tuloksiin. Näin ollen johtopäätösten vetäminen edellä mainituista kliinisistä havainnoista on mahdotonta. On tärkeää tiedostaa pakurin terapeuttisesta käytöstä olevan runsaasti vailla näyttöpohjaa olevia aineistoja, minkä vuoksi moniin yllä mainittuihin positiivisiin vaikutuksiin tulee suhtautua varauksella. Myös suomalaiset pakurinkäyttäjät ovat raportoineet havaitsemistaan terapeuttisista vaikutuksista.

3 YHDISTEET

3.1 Luokittelu ja yleistä

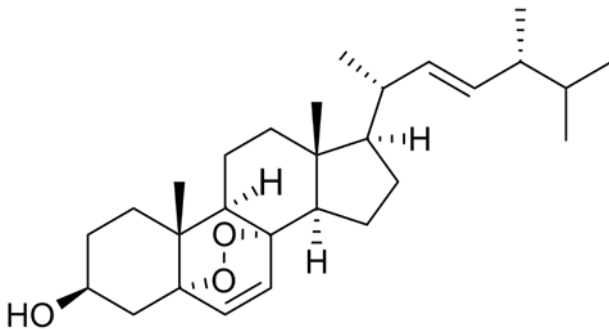
Pakurikäävässä tiedetään olevan yli 200 erilaista yhdistettä, joista kymmenien on osoitettu vaikuttavan biologisesti aktiivisesti. Bioaktiivinen yhdiste ei itsessään kuitenkaan välttämättä tarkoita terapeuttista yhdistettä. Kaikki terapeuttiset yhdisteet ovat bioaktiivisia, mutta kaikki bioaktiiviset yhdisteet eivät ole terapeuttisia. Pakurin mahdollisia terapeuttisia vaikutuksia ymmärtäessä on tärkeää ha-

vaita pakurin terapeuttisten vasteiden mahdollisesti välittyvän osittain lukuisten erilaisten yhdisteiden, kuten melaniini- ja fenoliyhdisteiden sekä proteiini-polysakkaridikompleksien yhteisvaikutusten kautta^{3,10}. Tämä saattaa monimutkaistaa pakurin yksittäisten yhdisteiden terapeuttista arviointia.

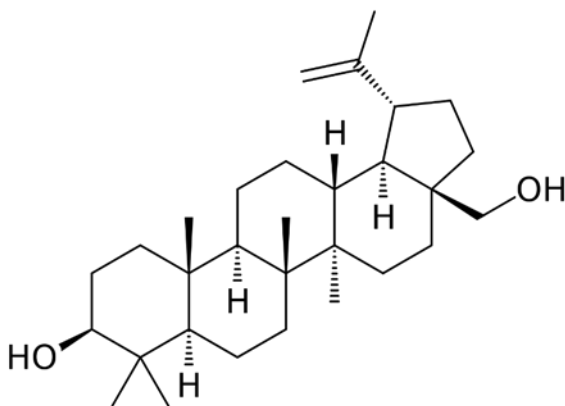
Pakurin bioaktiivisia yhdisteitä ovat mm. oksaalihappo, kanelihappo, hispoloni, heteroglukaanit, glykoproteiinit sekä erilaiset ketoni-, triterpeeni-, ligniini- ja fenoliyhdisteet. Näiden lisäksi pakurista on löydetty mm. eteerisiä öljyjä. Tutkimuksissa osalle näistä yhdisteistä on jo saatu selvitettyä vaikutusmekanismeja, mutta suurin osa näiden molekyylien tarkoista vaikutusmekanismeista on tällä hetkellä lähinnä valistuneiden arvailujen varassa.

Pakuria on myös pidetty erittäin antioksidanttisena. Pakurin antioksidanttisia yhdisteitä ovat lukuisten polysakkaridi- ja fenoliyhdisteiden lisäksi superoksididismutaasi (SOD), eumelaniini-, allomelaniini- sekä melano-glukaaniyhdisteet ja styrylpyrooni-tyyppiset polyfenoliset pigmentit.

Seuraavaksi tuodaan esille pakurin paremmin tunnettuja yhdisteitä ja selvitetään niiden välittämät fysiologiset vasteet ja näiden vasteiden takana piilevät vaikutusmekanismit yksityiskohtaisesti (Taulukko 1 ja 2). Lopuksi arvioidaan niiden mahdollista terapeuttista käyttöä ihmisellä imeytymisen, vaikuttavien pitoisuuksien ja antoreittien suhteen.



Kuva 3. Ergosteroli peroksidin rakenne (pakurin sieniperäinen yhdiste)



Kuva 4. Betuliinin rakenne (pakurin puuperäinen yhdiste)

Taulukko 1. Pakurin mahdollisesti terapeuttiset rasvaliukoiset yhdisteet. Taulukossa arvioidaan yhdisteiden ominaisuuksia sekä mahdollista terapeuttista käyttöä. Yhdisteet on luokiteltu ylhäältä alas siten, että ylhäällä on arvion mukaisesti terapeuttisesti merkittävien ja alhaalla merkityksettömien yhdiste.

Yhdiste	Väitetyt terapeuttiset vaikutukset	Vaikutusmekanismit	Imeytyminen	Terapeuttisen käytön arviointi ihmisellä
Betuliini	Hillitsee, mutta toisaalta myös aktivoi immuniteettia tilanteesta riippuen, stimuloi ihon solujen kasvua, vähentää melaniinin synteesiä (ihon vaalennus?), estää virtsahapon synteesiä (kihdin hoito?)	Immuneetin hillitseminen välittyy pääasiassa NF-κB:n (inflammatorinen transkriptiotekijä) inhiboinnin ja sytokiinien synteessin eston kautta, inhiboi tyrosinaasi-entsyymin toimintaa (melaniinin tuotto estyy), inhiboi ksantiinioksidaasi-entsyymin toimintaa (virtsahapon tuotto estyy)	Rasvaliukoinen, ei imeydy käytännössä sisäisesti nautittuna, imeytyy todennäköisesti suhteellisen hyvin ihon kautta	Suuri pitoisuus. Iholla mahdollista käyttää haavojen parantamisessa/tulehdustilojen hillitsemisessä. Ihon vaalennuksessa betuliinin hyötykäyttö on epätodennäköinen. Sisäisen käytön hyöty on epätodennäköinen huonon imeytyvyyden takia. Kuitenkin esim. nanopartikkeleihin pakattuna käyttö voisi olla mahdollinen myös sisäisesti nautittuna
Betuliinihappo	Syöpäsolujen tuhoutuminen, immuneetin hillitseminen, mutta myös immuniteetin aktivoiminen	Keräytyy syöpäsoluihin aiheuttaen apoptoosin erityisesti melanoomasoluissa. Estää mm. antiapoptoottisen <i>bcl-2</i> -geenin toimintaa ja lisää apoptoottisen <i>bax</i> -geenin ilmentymistä, inhiboi NF-κB:tä, estää sytokiinien synteesiä, aktivoi makrofageja ja lisää sytokiinien tuottoa	Rasvaliukoinen, ei käytännössä imeydy sisäisesti nautittuna. Iholta imeytyminen mahdollinen	Suuri pitoisuus. Terapeuttinen käyttöpotentiaali iholla mahdollinen paikallisesti, heikko imeytyminen sisäisesti nautittuna. Kuitenkin esim. nanopartikkeleihin pakattuna käyttö voisi olla mahdollinen myös sisäisesti nautittuna.
Lupeoli	Tulehduksen vaimentaminen (voi toisaalta aktivoi immuniteettia ja siten lisätä tulehdusta)	Immuneetin hillitseminen välittyy pääasiassa NF-κB:n inhiboinnin ja sytokiinien synteessin eston kautta	Rasvaliukoinen, ei käytännössä imeydy sisäisesti. Iholta imeytyminen mahdollinen	Suuri pitoisuus. Terapeuttinen käyttöpotentiaali iholla mahdollinen, todennäköisesti heikko sisäisesti nautittuna. Kuitenkin esim. nanopartikkeleihin pakattuna käyttö voisi olla mahdollinen myös sisäisesti nautittuna
Inotodioli	Allergisten oireiden lievittäminen, syöpäsolujen tuhoaminen, lisää melaniinin synteesiä (ihon rusketus?)	Hillitsee mast-solujen aktiivisuutta lieventäen immuunivastetta, aktivoi kaspaasi 3-välitteisen apoptoosin aiheuttaen syöpäsolujen kuoleman (leukemiassa), tyrosinaasin toiminnan esto	Rasvaliukoinen, imeytyy	Pitoisuus riittävän suuri. Terapeuttiset pitoisuudet allergiassa ja syövässä teoriassa mahdollisia ihmisellä. Mahdollisuus ihon ruskettajana epätodennäköinen
Inotolaktonit A ja B	Verensokerin tasapainottuminen (erityisesti diabeteksen hoidossa)	Estää α-glukosidaasi-entsyymin toimintaa hidastaen hiilihydraattien imeytymistä suolistosta. Tämä hillitsee verensokeritason suuria muutoksia	Rasvaliukoisia, ei tarvitse imeytymistä, sillä vaikuttaa jo suolistossa	Todella pieni pitoisuus. Terapeuttisesti voisi olla mahdollinen. Tarvitaan suuri määrä pakuria terapeuttisen määrän eristämiseksi
Trametenolihappo	Tulehduksen hillitseminen, syöpäsolujen kasvun hillitseminen, vähentää melaniinin synteesiä (ihon vaalennus?)	Mahdollisesti NO:n ja prostaglandiinien tuoton esto, tyrosinaasin toiminnan esto (melaniinin synteesi estyy)	Rasvaliukoinen, voi imeytyä	Pitoisuus todella pieni. Ei terapeuttista vaikutusta normaalilla käytöllä, teoriassa mahdollinen paikallisen tulehduksen hillitsemisessä, ihon vaalentajana epätodennäköinen

Ergosteroli peroksidi	Tulehduksen hillitseminen, syöpäsolujen (karsinooma) kasvun hillitseminen	Mahdollisesti NO:n ja prostaglandiinin tuoton esto tulehduksessa, β -kateniini-tekijän inhibiointi vähentäen kasvutekijöiden synteesiä ja hidastaen solujen kasvua	Rasvaliukoinen, voi imeytyä	Pitoisuus todella pieni. Ei terapeutista vaikutusta normaalilla käytöllä, teoriassa mahdollinen paikallisen tulehduksen hillitsemisessä
Lanosteroli	Lisää melaniinin synteesiä (ihon rusketus?)	Lisää tyrosinaasin toimintaa	Rasvaliukoinen, voi imeytyä	Terapeuttinen käyttö epätodennäköinen ihon ruskettajana

Taulukko 2. Pakurin mahdollisesti terapeuttiset vesiliukoiset yhdisteet. Taulukossa arvioidaan yhdisteiden ominaisuuksia sekä mahdollista terapeuttista käyttöä. Yhdisteet on luokiteltu ylhäältä alas siten, että ylhäällä on arvion mukaisesti terapeuttisesti merkittävien ja alhaalla merkityksettömien yhdiste.

Yhdiste	Väitetyt terapeuttiset vaikutukset	Vaikutusmekanismit	Imeytyminen	Terapeuttisen käytön arviointi ihmisellä
Polysakkaridit	Tulehdustilojen lievitäminen, hapettumiselta suojaaminen, verensokerin lasku ja nefropaattisen tilan rauhoittuminen	NF- κ B:n toiminnan esto, antioksidanttinen vaikutus ilmenee hapettavien yhdisteiden kelatoimisen kautta (erityisesti uronihappoyksiköt), glukoneogeneesi-inhibiittori GSK-3:n toiminnan esto aiheuttaen edelleen verensokeriarvojen laskua	Osittain vesiliukoisia, suuret polysakkaridit imeytyvät huonosti, pienet imeytyvät paremmin	Polysakkaridien kokonaismäärä todella suuri. Terapeuttinen käyttö mahdollinen erityisesti suolistossa. Pitoisuudet ovat täysin riittämättömät normaalilla käytöllä GSK-3:n estoon. GSK-3:n esto teoriassa mahdollinen, jos vaikuttavaa yhdistettä eristetään tarpeeksi
beeta-1,6-D-glukaani	Immunitetin aktiivointi	Valkosolujen NO/ROS:n ja TNF- α :n tuoton ja erityksen lisääntyminen, sekä makrofagien lisääntynyt TNF- α :n sisäänotto. Lisää IFN- γ :n ja IL-4:n eritystä ja aktivoi NF- κ B:n tuotantoa lisääviä MAPK:ja	Vesiliukoinen, imeytyy	Pitoisuus todella suuri. Terapeuttisesti mahdollinen.
Keski- ja suurikokoiset polyfenolit	Tulehdusvasteen hillitseminen	Suoliston solujen NF- κ B:n ja MAPK:n signaalireittien aktiivoinnin inhibiointi, antioksidanttiset yhdisteet mahdollisesti vähentävät hapetusstressiä	Osittain vesiliukoisia, yleisesti ottaen imeytyminen on heikkoa	Pitoisuus suuri, terapeuttinen vaste mahdollinen
Pienet polyfenolit (dihydroksibentsaaliasetoni, kahvihappo)	Syövän kasvun hillitseminen	Karsinooma-syöpäsolujen DNA-topoisomeraasi -entsyymin toiminnan esto hilliten edelleen solujen jakautumista	Vesiliukoisia, imeytyminen suhteellisen hyvä	Pitoisuus riittämätön, joskin teoriassa mahdollinen saavuttaa eristämällä
Ligniinit	Tulehdusvasteen lisääminen, HI-viruksen lisääntymisen esto	Makrofagien NO:n tuoton lisääntyminen, HIV:n proteaasin toiminnan esto	Imeytyminen on huonoa	Pitoisuus suuri. Tulehdusvasteen lisääntyminen mahdollinen. HIV:n hoidossa mahdollisen huonon imeytyvyyden takia
Superoksididismutaasi -entsyymi (SOD)	Solustressin vähentäminen, hapetukselta suojaaminen	Hapettavien yhdisteiden, kuten radikaalien entsyymattainen pelkistäminen ja inaktiivointi	Imeytyminen mahdoton SOD:n hajotessa nopeasti entsyymattaisesti suolistossa	Pitoisuus suhteellisen suuri. Terapeuttinen käyttö äärimmäisen epätodennäköinen sisäisesti nautittuna helposti denaturoituvan ominaisuutensa vuoksi. Ihon päällä käytettynä epätodennäköinen samasta syystä

3.2 Terapeuttinen käyttö

3.2.1 Tulehduksen hillitseminen

Pakurilla on todettu kautta sen käyttöhistorian olevan tulehdusta hillitseviä vaikutuksia. Nykyisten tutkimusten valossa tästä on saatu näyttöä, ja on myös löydetty yksittäisiä tulehdusta suoraan hillitseviä yhdisteitä. Pakurista tehdyt tutkimustulokset ovat kuitenkin osittain ristiriidassa, sillä joidenkin tulehdusta hillitsevien yhdisteiden on myös havaittu aktivoivan immuunijärjestelmää. Tämän pitäisi osaltaan lisätä tulehdusta. Tässä luvussa käydään läpi erilaisia osin ristiriitaisia tutkimustuloksia pakurin immunitettiin muuntelevista vaikutuksista tulehduksen hillitsemisen näkökulmasta.

Pakuria sisäisesti nautittaessa sen monet väitetyt terapeuttiset vaikutukset kohdistuvat usein ruuansulatuskanavaan. Syynä tähän on todennäköisesti pakurin yhdisteiden suuri paikallinen pitoisuus suolistossa ennen sen laimentumista yhdisteiden joko hajotessa suolistossa tai jakautuessa muualle elimistöön. Pakurin korkeat antioksidanttisuusarvot voivat osaltaan selittää ruuansulatuskanavan tulehdusta vaimentavaa vastetta. Metabolian seurauksena elimistössä syntyy jatkuvasti radikaalimolekyylejä, jotka ovat merkittävässä roolissa mm. suolistotulehduksellisten tilojen etenemisessä. Radikaalimolekyylit aiheuttavat vahinkoa suoliston pinnalla oleville soluille tuhoamalla niiden toiminnalle tärkeitä molekyylejä. Tämä aiheuttaa soluille stressiä ja voi lopulta laukaista tulehduksellisen reaktion. Kirjallisuuden mukaan pakurin antioksidanttiset yhdisteet ovat pääasiassa vesiliukoisia polyfenoleita, polysakkarideja ja erilaisia proteiini-polysakkaridikomplekseja, sekä joitain rasvaliukoisia yhdisteitä, kuten steroidirakenteiset inotodioli, lanosteroli, ergosterolit, trametenolihappo ja erilaiset melaninipohjaiset yhdisteet³.

Pakurin sisältämien polysakkaridien osalta on havaittu, että niiden antioksidanttisuusarvot ovat huomattavan korkeita, minkä lisäksi polysakkaridimolekyylin suurempi pituus parantaa radikaalien sieppaamiskykyä. Polysakkaridit koostuvat pääasiassa (lähes 99 %:sti) glukoosista, ksyloosista, galaktoosista, ramnoosista, mannoosista ja arabinoosista¹¹. Näiden monosakkaridien lisäksi pakurin polysakkaridien on tunnistettu osittain koostuvan myös uronihappoyksiköistä¹². Sen osuus erään mittauksen mukaan pakurin polysakkaridimolekyyleistä on parhaillaan yli 20 %, ja niiden arvioidaan osallistuvan oleellisesti erilaisten hapettavien yhdisteiden, kuten radikaalien kelatoimiseen ja inaktivointiin. Uronihappoyksiköiden suuri lukumäärän arvio on kuitenkin ristiriidassa ylemmän tutkimuksen kanssa, jossa väitettiin pakurin polysakkaridien koostuvan yli 99 %:sti muista kuin uronihappoyksiköistä¹¹. Näin ollen näihin tuloksiin tulee suhtautua skeptisesti ja enemmänkin suuntaa antavasti.

Polysakkaridit muodostavat erilaisten proteiinien kanssa hiilihydraatti-proteiinikomplekseja (erityisesti ksylo- ja galaktoglukaanien kanssa). Lisäksi joidenkin havaintojen mukaan polysakkarideihin voi olla lisäksi tiukasti kiinnittyneinä myös mm. fenolisia yhdisteitä (esim. ligniini)¹⁰. Yhdessä ne

muodostavat erittäin monimutkaisen molekyylikoostumuksen vaikuttaen kokonaisantioksidanttisuusarvoon. Erään tutkimuksen mukaan pakurin polysakkaridisten yhdisteiden antioksidanttisuuden havaittiin laskeneen melkein puoleen, kun proteiiniyhdisteet suodatettiin pois polysakkarideista. Näin ollen proteiinien voidaan olettaa osallistuvan olennaisesti pakurin antioksidanttiaktiivisuuteen ³.

Pakurin terapeuttinen potentiaali voi siis syntyä radikaalien vaikutusten estämisen kautta erityisesti suolistossa, mikä edelleen vähentää solustressiä ja tulehdusta. Tämän lisäksi antioksidanttisten yhdisteiden on itsessään havaittu inhiboivan NF- κ B -nimisen immuuni- ja tulehdusvasteita välittävän transkriptiotekijän toimintaa, mikä osaltaan voisi selittää tulehduksen vaimenemisen.

Pakurikäävystä tehdyn alkoholiuutteen on havaittu makrofagi-solulinjoissa hillitsevän suoraan useita tulehdustekijöitä, joista merkittävin on NF- κ B:n inhibointi ¹³. NF- κ B saa aikaan soluissa useiden tulehdusvälittäjäaineiden, kuten sytokiinien, tuoton, mikä edelleen saa aikaan tulehdusreaktiolle tyypillisen vasteen. Sen toimintaa estämällä on mahdollista hillitä tulehdusta. Tämän lisäksi pakurikäävystä valmistettu alkoholiuute kykeni samassa tutkimuksessa vaimentamaan typpioksidin (NO) ja prostaglandiinien tuottoa, jotka ovat tärkeitä tulehdusvälittäjäaineita. Tärkeimpien tulehdusta hillitsevien rasvaliukoisten yhdisteiden määritettiin kokeessa olevan steroidirakenteiset ergosteroli, ergosteroli peroksidi ja trametenolihapo ¹³. Tutkimuksessa näiden yhdisteiden pitoisuuksien havaittiin kuitenkin olleen liian korkeita saavuttaakseen terapeuttisen vasteen ihmisellä pakurin perinteisellä käytöllä.

Mahdollisiksi muiksi tulehdusta ja myös kipua lievittäviksi mekanismeiksi arvioitiin eräässä toisessa tutkimuksessa oleellinen indusoituvan typpioksidisyntaasin (iNOS)- ja syklo-oksigenaasi-2 (COX-2)- entsyymien määrän väheneminen NF- κ B:n toiminnan estämisen kautta. Todennäköiseksi vaikutusmekanismiksi havaittiin fosfatidyli-inositoli 3-kinaasi/Akt/I- κ B kaskadin ja JNK-aktivaatioreitin inhibointi ¹⁴.

Betuliinijohdannaisten on havaittu saavan aikaan tulehdusta hillitseviä vaikutuksia. Pakurista betuliinijohdannaisia saadaan betuliini-, betuliinihapo- ja lupeoli-yhdisteinä. Immunitetin hillitseminen välittyy pääasiassa NF- κ B:n inhiboinnin ja sytokiinien synteessin eston kautta ². Pakurin betuliiniperäiset yhdisteet ovat erittäin rasvaliukoisia triterpeenejä, eivätkä ne käytännössä liukene veteen ollenkaan.

Yhdessä koe-eläintutkimuksessa ovalbumiinilla allergisoiduille hiirille annosteltiin pakurista valmistettua vesiuutosta (kokeen verrokkihiiriä ei allergisoitu). Allergisoimattomilla verrokeilla havaittiin vesiuutteen altistumisen myötä IL-4:n laskua ja IFN- γ :n nousua, mikä ei oleellisesti vaikuttanut immuunivasteen suuruuteen. Allergisoiduilla hiirillä tulehdusvaste puolestaan laski vesiuutteen altistuksen myötä selvästi (IL-4-, IFN- γ - ja IL-2-tasot laskivat) T-solujen toiminnan hillitsemisen kautta.

Lisäksi vesiutteen havaittiin vähentäneen NO:n ja tuumorinekroositekijä- α :n (TNF- α) eritystä vaikuttaen kokonaisuudessaan immuunivastetta hillitsevästi. Allergisoiduilla hiirillä havaittiin myös selkeitä laskuja allergisia reaktioita välittävien IgE-vasta-aineiden tasossa, mikä puolestaan oli seurausta T-soluihin kohdistuneesta vaikutuksesta¹⁵. Tämä viestii vähentyneestä vasteesta allergeenia kohtaan ja siten allergisen reaktion lieventymisestä hiirien saatua pakurin vesiutosta.

Kun allergisoituja hiiriä altistettiin eräässä toisessa tutkimuksessa pakurista tehdyille uutoksille, havaittiin alkoholi- ja dikloorimetaaniuutosten (rasvaliukoisia molekyyilejä erottavia liuottimia) lievittävän ruoka-allergian oireita selvästi, mutta vesiutoksella ei ollut huomattavaa allergiaa lievittäviä vaikutuksia. Vaikutusmekanismiksi havaittiin sytokiinien vähentynyt vapautuminen mast-solujen granuloista, sekä T-solujen aiheuttaman allergisen vasteen vähentyminen. Erityisesti triterpeenisen yhdisteen inotodiolin havaittiin erityisen tehokkaasti hillitsevän mast-solujen aktiivisuutta¹⁶.

Kuitenkin vesiutoksilla on usein havaittu myös tulehdusta aktivoivia tulehdusta hillitsevien vaikutusten lisäksi. Erityisesti sieniperäiset vesiliukoiset beetaglukaanit tunnetusti aktivoivat immuunipuolustusta, mikä osaltaan selittää tämän. Kun eräässä kokeessa polysakkaridien immunitteettiä stimuloivia vaikutuksia tutkittiin makrofagi-solulinjoilla, havaittiin polysakkarideilla olevan monia immunitteettiä vahvistavia vaikutusmekanismeja. Pakurista tehty vesiute aiheutti NO/ROS tuoton lisääntymisen, TNF- α -tulehdusvälittäjäaineen erityksen lisääntymisen ja makrofagien lisääntyneen TNF- α :n sisäänoton. Edelleen makrofagien havaittiin aktivoituneen sekä tulehdusvälittäjäaineiden IFN- γ :n ja IL-4:n erityksen lisääntyneen hiiren pernan soluissa. Muina vaikutusmekanismeina vesiute kykeni indusoimaan NF- κ B:n tuotantoa lisäävien MAPK:iden toimintaa, mikä edelleen lisäsi makrofagisten solujen aktivaatiota¹⁷. Tämä tulos on ristiriidassa ovalbumiinilla altistettuja hiiriä tutkittaessa, sillä niiden tulehdustasot päinvastoin laskivat pakurin vesiutoksille altistuessaan¹⁵.

Puolestaan yhdessä hiirikokeessa immuunivajavaisten hiirten immuunivaste palautui takaisin lähes normaalille tasolle niiden juodessa pakurin vesiutetta. Immunitetin voimistamisen lisäksi vesiute kykeni kuitenkin kokeessa myös hillitsemään tulehduksellisia reaktioita. Tulehdusvälittäjäaine IL-6-tasojen havaittiin selvästi kohonneen, kun taas TNF- α :n pitoisuudet laskivat takaisin alkuperäiselle tasolle, mikä toisaalta vastapainona vaimensi tulehdusvastetta¹⁸. Tutkimukset tulokset antavat ristiriitaista viitettä siihen, että pakurin vesiutokset voivat samaan aikaan sekä aktivoida, että hillitä immuunijärjestelmää.

Vesiutoksesta peräisin olevien ligniini-hiilihydraattiyhdisteiden on tunnistettu aktivoivan makrofageja stimuloimalla solujen NO:n tuotantoa huomattavasti, mikä lisäisi edelleen tulehdusvasteen syntymistä¹⁹. Polysakkaridien on havaittu puolestaan aktivoivan immunitteettiä lisäämällä lymfosyyttien määrää ja TNF- α :n synteesiä soluviljelymalleissa ja hiirikokeissa²⁰. Samaan tulokseen on päästy hii-

ren makrofagi- ja dendriittisolulinjoilla tehdyissä kokeissa, missä havaittiin NO:n lisääntynyttä tuottoa immuunireaktioissa ²¹. Nämä tulokset viittaavat vesiuutoksen lisäävän immuunipuolustuksen aktiivisuutta immuniteetin ollessa normaalia tilaa vaimeampi.

Yhdessä kokeessa vesiuutosten on päinvastoin havaittu sisäisesti nautittuna lievittävän hiirien suolistotulehdusta vähentämällä TNF- α :n, IFN- γ :n, NF- κ B:n ja STAT:oiden geneettistä ilmentymistä ²². Toisaalta samassa tutkimuksessa havaittiin immuniteettiä laskevan sytokiini IL-4:n tasojen laskua, minkä kokonaisvaikutuksena pitäisi lisätä tulehdusta. Tutkittujen hiirien tulehdusvaste tuntui kokonaisuudessaan laskeneen hieman mutta ei oleellisesti. Kokeessa tehtiin myös hiirten makrofagien soluviljelymalli. Makrofageille annostellut pitoisuudet olivat todella suuria, joten myös lieviä toksisia vaikutuksia havaittiin. Kokeiden tulokset viittasivat kaiken kaikkiaan pakurin lievittävän tulehduksellisten suolistosairauksien oireita.

Monien vesiliukoisten polyfenolisten yhdisteiden on todettu inhiboivan tulehdusvälitteisten NF- κ B:n ja MAPK:n signaalireittien aktivaatiota suoliston soluissa, mikä myös osaltaan selittää tulehdusvasteen hillitsemistä ²³. Lisäksi fenolisten yhdisteiden korkeat antioksidanttisuusarvot saattavat osaltaan selittää tulehduksen hillitsemisen erityisesti suolistossa. Yleisesti ottaen polysakkaridiyhdisteet (erityisesti beetaglukaanit) vaikuttavat nostavan elimistön immuniteettiä ja sitä kautta saattavat edelleen mahdollisesti tulehdistilaa, kun taas fenoliset yhdisteet tuntuvat hillitsevän sitä. Näiden yhdisteiden määrien välinen tasapaino ratkaisee osittain sen, mikä on lopullinen vaste vesiuutteessa. Tämä osaltaan selittänee ristiriitaiset tulokset vesiuutteiden sekä aktivoissa, että hillitessä immuunijärjestelmää. Näyttö pakurin vesiuutosten käytöstä tulehduksellisten tilojen hoidossa tuntuu olevan kuitenkin puutteellista ja lisäksi vesiuutteet itsessään lisäävät immuniteetin aktiivisuutta ja siten saattavat lisätä tulehduksellista tilaa. Näin ollen sen käyttö esim. suoliston tulehduksellisten tilojen hoidossa ei ole täysin perusteltua. Kokonaisuudessaan vaikuttaa siltä, että pakurin rasvaliukoiset yhdisteet kykenevät hillitsemään tulehdusta selkeästi paremmin vesiliukoisiin yhdisteisiin verrattuna.

Pakurikäävästä on myös tunnistettu yksi erityisen antioksidanttinen yhdiste. Kyseessä on superoksididismutaasi-niminen entsyymi (SOD), joka eliminoi hapettavia yhdisteitä ympäristöstään muuttamalla ne vähemmän reaktiivisiksi. Sen terapeuttisista mahdollisuuksista on puhuttu paljon esim. suolistotulehdusten hoidossa. Kyseisen entsyymin on kuitenkin havaittu hajoavan erittäin nopeasti suolistossa, minkä vuoksi sen hapetukselta suojaava vaikutus jää varsin merkityksettömäksi ²³. Tämän lisäksi entsyymi muuttuu luultavasti inaktiiviseksi jo pakurin kuivaamis- ja uutto-prosessin aikana. Väittämät pakurin korkeasta SOD-pitoisuudesta ovat siis todennäköisesti täysin turhia.

3.2.2 Immuneettia aktivoiva vaikutus

Pakurin immuneettia aktivoiva vaikutus syntyy pääsääntöisesti betuliinihapon ja fungaalisten beeta-glukaanien vaikutuksista. Betuliinihapon on havaittu lisäävän makrofagien aktiivisuutta ja lisäävän tulehdusvastetta sytokiinien lisääntyneen tuoton seurauksena²⁴. Toisaalta betuliinihapon on myös joissakin tutkimuksissa raportoitu hillitsevän tulehdusta, mikä viittaisi immuneetin hillitsemiseen². Tutkimukset betuliinihapon immuneettia muuntelevasta kyvystä ovat osittain ristiriitaisia, mikä vaihtelee tapauskohtaisesti.

Merkittävimpiä immuneettia muuntelevia bioaktiivisia yhdisteitä ovat beeta-D-glukaanirakenteiset polysakkaridiketjut (erityisesti beeta-1,6-glukaanit). Immuneettia aktivoivan vaikutuksensa vuoksi nämä polysakkaridit saattavat itsessään jopa lisätä tulehdusta. Beeta-glukaanit pakurissa on noin 10 %. Niiden on havaittu lisäävän immuunivastetta nostamalla immuneettia stimuloivien sytokiinien ja muiden tulehduksellisten välittäjäaineiden synteesiä ja edelleen aktivoivan lukuisia valkosoluja (mm. NK-, T-, B-soluja ja makrofageja). Beeta-glukaanit sitoutuvat valkosolujen pintareseptoreihin, mikä edelleen saa aikaan valkosolujen aktivoinnin ja sytokiinien tulehduksellisten välittäjäaineiden vapautumisen²⁵. Pakuriuutosten on osittain selitetty tuhoavan syöpäsoluja pakurin yhdisteiden immuneettia aktivoivien vaikutustensa vuoksi²⁶. Näin ollen elimistön olisi mahdollista puolustautua tehokkaammin elimistöä uhkaavia tekijöitä, kuten mikrobeja tai syöpää vastaan. Syövän voidaankin ajatella olevan immunologinen tauti, sillä syöpäsolujen kasvu ja hillitsemätön lisääntyminen johtuu osaltaan immuunipuolustuksen kyvyttömyydestä tunnistaa näitä elimistön toiminnalle haitallisia soluja, mikä edelleen estää niiden tuhoamisen elimistöstä. Pakurin käytöstä syöpäsolujen kasvun hillitsemisessä ja jopa tuhoamisessa on jo olemassa suhteellisen hyvä näyttö soluviljely- ja eläinkokeissa, mutta lisätutkimuksia tarvitaan selvittääkseen tarkat vaikutukset ihmisissä. Toisaalta joidenkin yksittäisten raporttien mukaan pakurin hoitavia vaikutuksia syöpäpotilaille on havaittu, mutta tämän tieteellinen näyttö/todistaminen on vielä toistaiseksi heikkoa.

Betuliinipohjaiset yhdisteet ovat rasvaliukoisia, kun taas beeta-glukaanit ovat vesiliukoisia. Näin ollen uuttamismenetelmällä on keskeinen vaikutus näiden yhdisteiden aiheuttamaan lopulliseen mahdolliseen terapeuttiseen vasteeseen. Paras vaste olisi ainakin teoriassa mahdollista saada tekemällä kaksoisuutos, ja eristämällä nämä kaksi yhdistettä samaan annokseen. Toisaalta kääntöpuolena voi olla hypoteettinen riski autoimmuunioireiden oireiden ilmaantumiseen immuunijärjestelmän aktivoituessa liiallisesti.

3.2.3 Antitumoraaliset vaikutukset syöpäsoluissa

Pakurikäävästä tehdyillä uutteilla on monissa hiiri- ja soluviljelykokeissa havaittu syöpäsolujen kasvua hillitseviä vaikutuksia. Vaikutukset eivät ole aina jääneet vain syöpäsolujen kasvun hillitsemiseen, vaan joissain kokeissa pakurikäävästä valmistettujen uutteen on havaittu jopa tuhoavan syöpäsoluja ilman erityisen haitallisia sivuvaikutuksia normaaleille soluille. Vaikuttaviksi yhdisteiksi on listattu erilaisia polysakkaridimolekyylejä, betuliinipohjaisia yhdisteitä, triterpeenisiä steroidirakenteisia molekyylejä sekä polyfenolisia yhdisteitä⁴. Erityisesti pienikokoisten polyfenolisten yhdisteiden on havaittu inhiboivan karsinoomasyöpäsolujen DNA-topoisomeraasi -entsyymin toimintaa, mikä häiritsee lopulta solujen jakaantumista. Pienikokoisista polyfenolisista yhdisteistä dihydroksibentsaaliasetoni ja kahvihappo toimivat karsinoomasolujen jakaantumisen estossa hyvin.

Havaintojen mukaan toinen syöpäsolujen kasvua hillitsevä yhdiste on ergosteroliperoksidi. Ergosteroli peroksidi saa soluissa aikaan β -kateniini-nimisen proteiinin inhibition, minkä on hiirten paksusuolen syövässä todettu johtavan vähentyneeseen kasvutekijöitä koodaavien geenien transkriptioon sekä solujen kasvun estymiseen ja lopulta jopa solukuolemaan eli apoptoosiin^{27, 28}. Terapeuttisen ergosteroli peroksidi -pitoisuuden eristäminen pakurista oli kokeessa kuitenkin todella haasteellista sen pienen pitoisuuden takia, minkä vuoksi sillä ei vaikuta olevan minkään näköistä terapeuttista vaikutusta pakuria perinteisesti käytettäessä.

Muita vaikuttavia yhdisteitä ovat tulehdusta lievittävät ergosteroli, ergosteroli peroksidi ja tramentolihappo, joista kaksi viimeistä estivät kokeessa karsinoomasolujen kasvua. Terapeuttisia pitoisuuksia on kuitenkin mahdotonta saavuttaa pakuria perinteisesti käyttämällä¹³.

Inotodioli estää solujen kasvua ja indusoi solukuoleman vaikuttamalla lukuisiin erilaisiin apoptoottisiin solujen säätelymekanismeihin. Inotodiolin on havaittu mm. aktivoivan kaspasi 3-välitteisen apoptoosin hiirten leukemiasoluissa²⁹. Inotodiolin vaikuttaviin pitoisuuksiin ($> 10 \mu\text{M}$) olisi teoriassa mahdollista päästä myös ihmisillä. Inotodioli on erittäin rasvaliukoinen yhdiste.

Tärkeimmät pakurin antitumoraalisesti vaikuttavat yhdisteet ovat betuliinipohjaisia. Erityisesti betuliinihapon on havaittu aiheuttavan lukuisissa eri luokan syöpäsoluissa apoptoosia ja estävän niiden kasvua. Nykyisten tutkimusten valossa betuliinihapon on havaittu muuttavan oleellisesti lukuisten eri proteiinien tuottoa ja tarkemman analyysin valossa erityisen huomattavaa on apoptoosin estävän proteiinia koodaavan *bcl-2*-geenin toiminnan esto, apoptoosin aiheuttavan *bax*-geenin ilmentymisen samalla lisääntyessä. Tämä edelleen johtaa lisääntyneeseen solukuolemaan. Tutkimuksessa löydettiin kokonaisuudessaan kuusi proteiinia, joiden synteesi oli lisääntynyt, kun taas kolmenkymmenen proteiinin pitoisuudet olivat vähentyneet syöpäsoluissa. Betuliinihapon on havaittu tuhoavan erityisen tehokkaasti melanoomasoluja, kun taas normaaliin solujen sytotoksiset vaikutukset betuliinihapolle

altistuttaessa ovat vähäisiä. Osittain tätä on selitetty betuliinihapon kertymisellä erityisesti syöpäsoluihin johtuen niiden lisääntyneen aineenvaihdunnan (jolloin syöpäsolut ottavat betuliinihappoa sisäänsa muita soluja tehokkaammin) lisäksi syöpäsolujen alhaisemmasta pH:sta. Betuliinihapon on havaittu olevan vaikutuksiltaan aktiivisempi matalassa pH:ssa³⁰. Betuliiniyhdisteet ovat erittäin rasvaliukoisia ja siten todennäköisesti myös ihoon hyvin imeytyviä, joten betuliiniyhdisteet voisivat teoreettisesti tarjota terapeutista potentiaalia pinnallisten ja vain ihon alueelle levinneiden ihosyöpien hoidossa.

Eräässä hiirikokeessa pakurista tehtyjen uutteen on todettu vähentävän sarkoomasta johtuvien tuumorien kasvua vajaalla kolmanneksella³¹. Yhdisteiden pitoisuudet olivat kuitenkin liian suuria, jotta terapeutista vastetta olisi mahdollista saavuttaa ihmisellä.

Pakurin on huomattu pienentävän hiirillä syöpien kasvua jo kolmen viikon käytön aikana 60 % ja vähentävän metastaasien määrää 25 % niiden nauttiessa vesiuutteita määrinä, jotka vastasivat tutkimuksen mukaan japanilaisen pakurinkäyttäjän päivittäisiä pakuritee-annoksia (6 mg uuttamisen jälkeen kuivattua pakuria/painokiloa kohden/päivä). Tutkimuksessa arvioitiin päivittäinen pakurikäävästä tehdyn vesiuutteen kulutus yläkanttiin, sillä tutkimuksessa hiirille annostellun pakurin määrä vastaa ihmisellä kymmenen gramman annosta kuivattua pakuria veteen uutettuna. Tämä vastaa kahden litran normaalin pakuriteen juomista (oletusreseptinä 5 g kuivaa pakuria/1 litra vettä).

Toisessa hiirikokeessa havaittiin pakurista tehtyjen vesiuutteiden polysakkaridien lisäävän immuunivastetta syöpäsoluja vastaan lisäämällä lymfosyyttien proliferaatiota ja TNF- α -tulehdusvälittäjäaineen synteesiä. Tutkimuksessa jouduttiin kuitenkin käyttämään valtavan suuria annosmääriä (75 mg vaikuttavaa ainetta/painokiloa kohden), jotta syöpäsolujen kasvua saatiin hillittyä puolella²⁰.

Lopputuloksena voimme kuitenkin todeta, että pakurin käytössä osana syöpähoitoja on teoriassa mahdollisesti potentiaalia, mikäli annokset ovat riittävän suuria. Sen antitumoraaliset vasteet vaikuttavat kuitenkin enemmänkin hillitseviltä ja lievittäviltä, kuin sairautta täysin parantavilta.

3.2.4 Antimikrobiset vaikutukset

Pakurista tehdyssä vesiuutteessa olevan suuren ligniinijohdannaisen on havaittu suoraan inhihoivan HI-viruksen proteaasin toimintaa viidennekseen viljelymaljalla³². Teorian tasolla pakuriteetä juo-
dessa olisi mahdollista päästä merkittäviin HIV:n proteaasia inhihoiviin pitoisuuksiin, jolloin HI-viruksen aktiivisuus elimistössä voisi laskea jonkin verran. Kuitenkin suuret polyfenoliset ligniinipohjaiset molekyylit eivät juurikaan imeydy tai ne metaboloitaneen suolessa inaktiiviseen muotoon ennen elimistöön pääsemistä³³. Näin ollen vesiuutoksen antiviraaliset vasteet vaikuttavat olevan täysin merkityksettömiä ihmisen systeemisen HIV-infektion hoidossa.

Pakurikäävän vesi- ja alkoholiuutteiden on havaittu hillitsevän bakteeri- ja sieneliöiden kasvua, kun taas suuremmat pitoisuudet vaikuttavat niihin tuhoavasti. Kasvua hillitsevät vaikutukset ilmenevät molemmilla uutoksilla jo väkevää pakuriteetä vastaavalla pitoisuudella (Taulukko 3). Bakteereita tuhoaviin vaikutuksiin päästään edelleen noin kaksinkertaisilla pitoisuuksilla tähän verrattuna. Sekä vesi- että alkoholiuutokset näyttävät vaikuttavan bakteereihin yhtä tehokkaasti.

Pakurin vesiuutoksilla on luultavasti vielä tehokkaampi vaikutus sienten kasvuun bakteereiden kasvuun verrattuna. Jo tavallinen pakuritee kykenee hillitsemään sienten kasvua ja ainakin teoriassa jopa tuhoamaan sienisoluja. Alkoholiuutokset osoittautuivat kokeessa heikommiksi vaikutuksiltaan³⁴. Alkoholiuutosten pitoisuuksien tulisi olla lähes kolminkertaisia saavuttaakseen vastaavan vaikutuksen vesiuutokseen verrattuna. Samassa tutkimuksessa havaittiin myös pakuriuutteiden häiritsevän joidenkin bakteerien biofilmien muodostamista³⁴. Käytännössä pakurista valmistetuilla uutteilla ei systeemissä käytössä ole merkitystä, mutta paikallisesti ihon päälle levitettynä erittäin vahva pakuriuute voisi hillitä bakteereiden/sienisolujen kasvua ja tarjota terapeutin käytön estämällä esim. rikkoutuneen ihon tai haavan bakteeri-/sieniperäisen infektion.

Tärkeää on kuitenkin huomioida se, että pakuriuutteet eivät estä kaikkien bakteeri- tai sienilajien kasvua samalla tavalla, vaan lajikohtaisia eroja löytyy. Joihinkin lajeihin pakuriuutteet voivat tehotta muita paremmin. Pakurin käyttö haavojen parantamisessa voi olla potentti käyttökohde myös eräästä toisesta syystä. Nimittäin betuliinin, jota pakuri sisältää runsaasti, on kerrottu stimuloivan terveiden ihosolujen tuotantoa. Tämä edelleen voisi esim. nopeuttaa vaurioituneen ihon umpeenkasvua ja paranemista.

Taulukko 3. Pakurikäävästä valmistettujen vesi- ja alkoholiuutteiden bakteereiden ja sieneliöiden kasvua hillitsevät ja tuhoavat pitoisuudet. Vesiuutoksissa on käytetty seuraavanlaista protokollaa: 25 g kuivattua pakuria uutettiin 80 °C:ssa 0,5 litrassa vettä kahden tunnin ajan. Alkoholiuutosta varten uutettiin 25 g kuivattua pakuria 0,5 litrassa 70 % etanolia 70 °C lämpötilassa yön yli. Vaihteluvälit kuvastavat sellaisia pitoisuuksia pienimmästä suurimpaan, joilla havaitaan joko kasvua hidastava tai soluja tappava vaikutus. Suuri vaihteluväli pitoisuuksissa syntyy osittain eri puolilta maailmaa otettujen pakurinäytteiden kemiallisten koostumusten suurista vaihtelueroista. Oletusreseptinä kuivattua pakuria on noin 5 g/litra vettä. Taulukon tulokset ovat karkeasti laskettuja tutkimustulosten pohjalta³⁴.

	Vesiuute	Alkoholiuute
Bakteerin kasvua hillitsevät pitoisuudet	4 – 35 g/litra	5 – 48 g/litra
Bakteereita tuhoavat pitoisuudet	14 – 70 g/litra	12 – 95 g/litra
Sienten kasvua hillitsevät pitoisuudet	2 – 14 g/litra	6 – 24 g/litra
Sienisoluja tuhoavat pitoisuudet	4 – 28 g/litra	12 – 48 g/litra

3.2.5 Sokeri- ja rasva-aineenvaihdunnan säätely

Pakurikäävän kahden lanostaani-tyyppisen terpeenisen yhdisteen inotolaktoni A:n ja B:n (rasvaliukoisia) on soluviljelymalleissa havaittu estävän sokeriaineenvaihdunnan kannalta tärkeiden suolistossa sijaitsevien α -glukosidaasi-entsyymien toimintaa. Normaalisti nämä entsyymit pilkkovat pitkiä sokeriketjuja suolistossa, jotta ne voisivat imeytyä monosakkarideina muualle elimistöön. α -glukosidaasin toiminnan estyminen johtaa sokereiden imeytymisen hidastumiseen, minkä myötä ruokailun jälkeen normaalisti tuleva verensokeripiikki tasoittuu. Näiden kahden terpeenisten yhdisteiden todettiin olevan vaikutukseltaan jopa tehokkaampia kuin yleisenä diabeteslääkkeenä markkinoilla oleva akarboosi (α -glukosidaasin estäjä). Toisaalta pakurin inotolaktoneiden pitoisuuksien havaittiin kuitenkin olevan riittämättömän pieniä, minkä vuoksi niiden terapeuttinen käyttö ei ole mahdollista esim. pakurista tehtyä öljyjuutosta yksistään suun kautta nauttimalla³⁵.

Pakurilla voisi teoriassa hoitaa diabetestä ja rasva-aineenvaihdunnan häiriöitä myös toisen mekanismin kautta. Kun pakurin vesiuutetta nautitaan sisäisesti, useiden rasva-aineenvaihduntaa säätelevien tekijöiden, kuten PPAR- γ :n ja C/EBP- α :n tuotanto voi lisääntyä. Vaikutus GLUT4-transportterin ilmentymiseen solukalvoilla voi myös olla stimuloiva. Tämä edelleen laskisi veren sokeri- ja rasva-arvoja elimistön parantuneen glukoosin sisäänoton myötä. Rasva-aineenvaihduntaa säätelevien geenien ilmentymisen havaittiin soluviljelymalleissa olevan oleellisesti suurentunutta jo saavutettavissa olevilla elimistön pakuriuutteen pitoisuuksilla (10 μ g vesiuutoksesta konsentroitua pakurijauhetta/ml,

mikä olisi mahdollista saavuttaa juomalla pakuriteetä jokunen litra päivässä). Rasva-aineenvaihduntaa edelleen tasapainottamalla olisi mahdollista myös vaikuttaa positiivisesti tyyppin 2 diabetekseen, sillä osa kyseisestä sairaudesta johtuu rasvasolujen insuliiniresistenssistä, jolloin rasvasolujen lisääntynyt erilaistuminen voisi toimia puskurina tätä vastaan. Vesiliukoisista rasva-aineenvaihduntaa moduloivista yhdisteistä ei ole tällä hetkellä tarkempaa tietoa, joten herää kysymys, pääsevätkö vaikuttavat yhdisteet vaikutuspaikkaansa eli rasvasoluihin elimistössä suun kautta nautittuna ollenkaan. Teoriassa tämä voisi kuitenkin olla mahdollista ³⁶.

Näiden lisäksi pakuriuutoksilla on havaittu olevan monia moduloivia vaikutuksia diabeettisilla hiirillä. Kokeessa pakurista valmistetut alkoholiuutteet ja niiden polysakkaridiyhdisteet aiheuttivat lukemattomia stimuloivia vaikutuksia, joiden vuoksi hiirien insuliinitasot nousivat, glykogeneesi parani maksassa ja tulehdusta välittävien tekijöiden, kuten NF- κ B:n ilmentyminen väheni mm. munuaisissa. Näiden ansiosta diabeteksesta aiheutuneet munuaisvauriot ja tulehdustasot laskivat huomattavasti. Osana selittävänä tekijänä oli polysakkaridien korkea antioksidanttisuusarvo. Ruokailun yhteydessä noussut verensokeri laski kolmanneksella tasapainottaen verensokeritasoja. Varsinaiseksi mekanismiksi todettiin joidenkin polysakkaridien kyky estää glykogeneesi-inhibiittori GSK-3:n toimintaa, mikä edelleen lisäsi glykogeenin synteesiä glukoosista maksassa ja laski verensokeriarvoja ³⁷. Suoritettussa kokeessa pakuriuutteen vaikuttavien yhdisteiden pitoisuuksien todettiin kirjallisuuskatsauksessa kuitenkin olleen todella korkeita (50 mg vaikuttavaa ainetta painokiloa kohden), mikä olisi käytännön tasolla mahdotonta saavuttaa ihmisillä esim. alkoholitippoja tai pakuriteetä yksistään nauttimalla.

3.2.6 Muut vaikutukset

Eräässä tutkimuksessa havaittiin trametenolihapon ja betuliinin laskevan melaniinin synteesiin osallistuvan tyrosinaasi-entsyymin aktiivisuutta. Tämä johtaisi edelleen alhaisempiin melaniinipitoisuuksiin ihon melanosyyteissä, mikä näkyisi ihon vaalenemisena. Inotodiolin ja lanosterolin havaittiin puolestaan lisäävän tyrosinaasin toimintaa, mikä voisi edelleen teoriassa ilmetä ihon ruskettumisena ³⁸.

Eräässä kokeessa yllämainitut vaikuttavat yhdisteet eroteltiin toisistaan eetteri-, asetaatti-, butanoli- ja vesiuutoksilla. Kokeen lopputuloksena asetaattiuutos lisäsi tyrosinaasi-entsyymin aktiiviteettiä 60 %, kun taas butanoli- ja eetteriuutteet laskivat tyrosinaasi-entsyymin aktiiviteettiä 60 - 70 % melanosyyteille tehdyssä soluviljelyssä. Molempien uutteen vaikuttavat pitoisuudet olisivat teoriassa mahdollista saavuttaa ihmisellä esim. paikallisesti levitettävän voiteen muodossa. Huomioitavan arvoista on havaita näiden pakurin tyrosinaasi-entsyymiin vaikuttavien yhdisteiden olevan erittäin rasvaliukoisia. Näin ollen vesiuutoksien kautta on turha hakea näitä vaikutuksia. Alkoholiuutoksilla olisi

teoriassa käyttöpotentiaalia, mutta suun kautta nautittuna annosmäärät olisivat aivan liian suuria saadakseen aikaan riittävän pitoisuuden systeemisen vaikutuksen kannalta. Voiteeseen sisällytetty pakuriute voisi teoriassa toimia terapeuttisesti joko ihon vaalentajana tai ruskettajana. Haasteeksi voi kuitenkin tulla se, että elimistölle kehittyy todennäköisesti toleranssia, minkä takia tyrosinaasin toiminta palautuu takaisin lähes normaalille alkuperäiselle tasolle. Näin ollen sen tyrosinaasin toimintaa muuttamalla on vaikea todeta terapeuttista käyttömahdollisuutta ihon vaalentajana tai ruskettajana.

Iholla käytettynä pakurivoide voisi kuitenkin luoda suojaavaan vaikutuksen esim. auringon UV-säteilyltä runsaan melaniinipohjaisten yhdisteiden määrän ja pakurin korkean antioksidanttisuutensa vuoksi. Ihmisten normaalien ihon fibroblastien altistuessa UV-valolle ja hapettaville yhdisteille havaittiin pakuriuutteen selvästi lievittäneen solujen vaurioita ³⁹.

Yhdessä kokeessa annosteltiin alkoholipohjaista pakuriuutetta hiirille, joilla oli korkea veren virtsahappopitoisuus (kihdin aiheuttaja ihmisellä). Kokeessa havaittiin hiirien korkean virtsahappopitoisuuden laskeneen lähes normaalille tasolle. Samassa kokeessa todettiin yhden pakurin yleisimmistä yhdisteistä, betuliinin, inhiboivan suoraan virtsahapon tuotolle olennaisen entsyymin ksantiinioksidasiinin toimintaa tehokkaasti solumaljalla ⁴⁰. Tutkimus tarjosi näin ollen näyttöä pakurin mahdollisesta terapeuttisesta käytöstä esim. kihdin hoidossa korkean virtsahappopitoisuuden madaltajana. Pakurin potentiaalisesti vaikuttavan yhdisteen on kuitenkin havaittu imeytyvän ruuansulatuskanavasta heikosti, joten sen pääseminen muualle elimistöön voi olla este sen terapeuttiselle käytölle. Tarkemmin tarkasteltuna hiirikokeissa annostellut alkoholiuutteiden määrät olivat varsin suuret, mikä todennäköisesti estää varsinaisen käytön ihmisellä. Saavuttaakseen vaikuttavan pitoisuuden, tulisi alkoholiuutosta nauttia suun kautta yli litra päivässä vertailtaessa hiirien terapeuttisia pitoisuuksia. Ei siis puhuta mielekkäistä annosmääristä. Kuitenkin betuliinin imeytyvyyttä parantamalla olisi mahdollista saavuttaa riittävä hoitovaste. Tällöin pakurikäävästä eristetty betuliini voisi tarjota terapeuttisen käyttökohteen pakkaamalla se nanopartikkeleihin, kuten vastaavalle yhdisteelle betuliinihapolle on jo tehty ⁴¹. Tällöin ei kuitenkaan puhuta enää perinteisestä pakurin käytöstä, vaan pitkälle viedystä lääketieteellisestä soveltamisesta.

Muina vaikutuksina pakurilla tehdyllä vesiuutteella on havaittu koehiirillä nefropaattista tilaa (tyypin 2 diabeteksesta johtuva) rauhoittavia vaikutuksia mm. lievittyneen tulehduksen ja solujen parantuneen glukoosin sisäänoton kautta ⁴². Kummassakin kokeessa pakuriuutteita annettiin hiirille muutamman viikon ajan. Vaikuttaviksi aineiksi tunnistettiin pienikokoisia polysakkarideja. Vaikuttavien pitoisuuksien havaittiin kuitenkin olevan melko suuria (300 mg pienikokoisia polysakkarideja / painokilo). Terapeuttinen vaste on näin ollen mahdotonta saavuttaa pakuriteetä juomalla. Terapeuttista potentiaalia voisi normaalipainoinen (65-70 kg) ihminen kuitenkin hakea syömällä huolella eristettyä

polysakkaridijauhoa 20 grammaa päivässä. Päiväannostusta varten tarvittaisiin satoja grammoja kuivattua pakuria. Kaiken kaikkiaan vaikuttaa siltä, ettei pakurilla ole järkevää hoitaa sokeri- tai rasva-aineenvaihduntaan liittyviä sairauksia korkeiden vaadittavien pitoisuuksien vuoksi.

3.3 Muut yhdisteet

Pakurikäypä sisältää monia erilaisia vitamiineja, kivennäis- ja hivenaineita sekä mineraaleja. Pakurin mineraalit sekä kivennäis- ja hivenaineet osittain vaikuttavat pakuriutteiden emäksisyyteen. Pakuri sisältää kohtalaisen määrän erilaisia mineraaleja ja hivenaineita, mutta pakurin päivittäisten annosmäärien ollessa parhaimmillaankin vain yksittäisiä grammoja, ovat mineraaleista ja hivenaineista saatavat hyödyt päivittäiseen ruokavalioon nähden merkityksettömän pieniä (Taulukko 4). Verrataan esimerkiksi mangaania, jota pakuri sisältää eniten suhteutettuna ihmisen tarpeisiin muihin alkuaineisiin verrattuna. Selvityksen tuloksena havaitaan mangaania saatavan keskimäärin vain muutama prosentti päivän suositellusta annoksesta pakuriteetä normaalisti juodessa pari kolme kuppia päivässä (oletuksena pakuritee, jossa on 5 g kuivattua pakuria / litra vettä).

Pakuri sisältää myös D2-vitamiinia ja erilaisia B-vitamiineja. Pakurin kuivattaminen auringon valossa saa aikaan D2-vitamiinin määrän lisääntyminen moninkertaiseksi D-vitamiinin esiasteesta ergosterolista ⁴³. Vertailemalla siitakesienen D2-vitamiinin huippupitoisuuksia pakurikäyvän pitoisuuksiin auringossa kuivaamisen jälkeen, havaitaan D-vitamiinin annosmäärän jäävän kuitenkin reilusti alle päivittäisestä tarpeesta, vaikka pakuria kuivattaisiin auringon valossa. Tämä karkea arvio pitää paikkansa, mikäli siitakesienen D-vitamiinipitoisuus oletetaan suunnilleen yhtä suureksi pakurin pitoisuuden kanssa. Tarkkaa tietoa pakurin D-vitamiinin pitoisuudesta ei ole olemassa. B-vitamiinien pitoisuudesta ei ole toistaiseksi tietoa saatavissa, vaikka pakurikäävästä on sitä löydetty ⁴³.

Taulukko 4. Pakurikäävästä tunnistetut alkuaineet (joista osa kivennäis- ja hivenaineita) ja vitamiinit. Tulokset on laskettu käyttämällä Jaakko Halmetojan kirjan⁴⁴ pakurin mineraalikoostumuk-
sia ja suhteuttamalla ne näiden mineraalien päivittäisiin suositusannoksiin^{45, 46}.

* Tähdellä on merkittynä yhdisteet, joiden pitoisuus on saatu mitattua yksittäisistä näytteistä. Suluissa on ilmoitettu sellainen määrä kuivattua pakurijauhetta, jonka aikuisen ihmisen tulisi syödä saavut-
taakseen kyseisen hivenaineen päivittäisen suositellun annoksen. Huomaa mitattujen yhdisteiden
suuri vaihteluväli eri näytteiden kesken.

** D2-vitamiinin määrä on moninkertainen, jos sientä kuivatetaan auringonvalossa.

<u>Hiven-, kivennäis- ja alkuaineet:</u>		
Mangaani (6-400 g)*		Fosfori
Kalium (24-1600 g)*		Germanium
Sinkki (70-520 g)*		Jodi
Magnesium (240-700 g)*		Kadmium
Kromi (> 400 g)*		Koboltti
Rauta (440-1300 g)*		Natrium
Kupari (560 g)*		Pii
Boori (1800 g)*		Rikki
Kalsium (2200-5300 g)*		Rubidium
Nikkeli (< 7700 g)*		Strontium
Antimoni		Tina
Barium		Titaani
Cesium		Vismutti
Seeleni		
<u>Vitamiinit:</u>		
B1-vitamiini	B2-vitamiini	B3-vitamiini
B5-vitamiini	B6-vitamiini	D2-vitamiini**

3.4 Mahdolliset haittavaikutukset

Pakuria voi todistetusti käyttää turvallisesti, ainakin lyhytaikaisesti. Maailman terveysjärjestö WHO on ilmoittanut pakurin turvallisiksi ja maailman kauppajärjestö WTO:n mukaisesti se on saanut luokituksen ”lääkinnällinen sieni”. Laboratoriossa mitattujen LD50-arvojen (se annosmäärä pakuria painokiloa kohti, jolla puolet testatuista hiiristä kuolivat haittavaikutusten vuoksi) kokeessa testatuilla hiirillä havaittiin olevan 6,5 g/painokiloa kohden⁴⁷. Jos sama pätyisi ihmiseen, tulisi ihmisen syödä pakuria lähes puoli kiloa kerralla, jotta se alkaisi olemaan toden teolla vaarallista. Suoraa johtopäätöstä ei tästä voida vielä kuitenkaan tehdä. Mittausten ja kokeiden perusteella pystytään kuitenkin tekemään oletus pakurin todella hyvästä siedettävyydestä, kun samalla huomioidaan pakurinkäyttä-

jien erittäin harvoin raportoimat sivuvaikutukset. Yhden haittavaikutuksia kuvailevan potilaskertomuksen mukaan todella runsaalla pitkäaikaisella käytöllä (4-5 lusikallista raakaa pakurijauhetta päivässä puolen vuoden ajan) ja munuais kivien syntymisellä väitettiin kuitenkin olevan yhteys ⁴⁸.

Jotkin sieniallergikot ovat raportoineet saaneensa pakurista sivuvaikutuksia, mikä selittyy elimistön allergisena reaktiona pakurikäävän sientä vastaan. Pakurikääpä voi sisältää mm. raskasmetalleja, sillä sienillä on yleisesti ottaen taipumusta varastoida niitä ympäristöstään. Saastuneilta alueilta kerätyt pakurikäävät saattavat näin ollen sisältää haitallisen määrän erilaisia kemikaaleja tai raskasmetalleja.

Pakurin on havaittu sisältävän lyijyä varsin vähän erilaisten mittausten perusteella. Ihmisen tulisi syödä pakuria monta kiloa päivässä lyijyn toksisten vaikutusten tullessa esiin. Eräessä luonnonvarakeskuksen (Luke) teettämässä hankkeessa tutkittiin mm. pakurinäytteiden raskasmetallipitoisuuksia ⁴⁹. Mitkään kolme analysoitua näytettä eivät ylittäneet raja-arvoja (Taulukko 5). Pakurin säteilymäärä saattaa joissain tilanteissa kuitenkin ylittää sallitut rajat sen säteilymäärän ollessa 220-820 Bq/kg (neljän mittauksen perusteella; Suomen säteilyturvakeskus) ylittäen osittain EU:n komission luontais- tuotteiden myyntiä koskevan enimmäisrajan 600 Bq/kg ⁵⁰.

Taulukko 5. Pakurinäytteiden raskasmetallien pitoisuudet. Taulukko on otettu Luonnonvarakeskuksen (Luke) teettämän tutkielman loppuraportista ⁴⁹.

Näyte	Raskasmetallit					
	Arseni (µg/kg)	Kadmium (µg/kg)	Lyijy (µg/kg)	Koboltti (µg/kg)	Molybdeeni (µg/kg)	Nikkeli (µg/kg)
Pakurikääpä 13/82	14,7	121,7	120	73	352	212
Pakurikääpä 13/83	10,1	89,7	129,7	135,7	106,3	447,3
Kaupallinen tuote	15,3	176	203	160,6	43,3	426

4 Kokeellinen osuus: erilaisten pakuriuutteiden yhdistekoostumukset

4.1 Uttamisen menetelmät ja metodit

Kokeen tavoitteena oli tutkia erilaisia uuttomenetelmiä (muuttujina lämpötilat ja uuttoliuottimet) ja löytää paras uuttomenetelmä uuttoliuottimen (vesi, alkoholi, aseton) ja uuttolämpötilan suhteen. Uuttomenetelmien paremmuutta selvitettiin mittaamalla eri tavoilla valmistettujen uutteen kokonaisfenolipitoisuus- ja antioksidanttiaktiivisuus. Lisäksi tutkittiin uutteen kokonaisfenolipitoisuutta. Oletuksena aseton/vesi (80/20, v/v) oli paras uuttoliuotin ja sitä käytettiin kokeessa vertailu- eli referenssiliuottimena.

Taulukko 6. Koejärjestelyjen erilaiset uuttomenetelmät luokiteltuina liuottimien, lämpötilan ja uuttoaajan suhteen.

Uuttoliuotin:	Lämpötila:	Uuttoaika:	Pakurijauheen massa:
Vesi	Huoneenlämpö	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Vesi	50 °C	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Vesi	78 °C	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Vesi	100 °C	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Etanoli/vesi (80/20, v/v)	Huoneenlämpö	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Etanoli/vesi (80/20, v/v)	50 °C	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Etanoli/vesi (80/20, v/v)	78 °C	2 x 3 h + maserointi	60 mg
Asetoni/vesi (80/20, v/v; referenssi)	Huoneenlämpö	2 x 3 h + maserointi	60 mg

Aluksi alkuperältään Lapista hankittu kaupallinen pakurijauhe hienonnettiin ennen kokeen alkua erittäin hienoksi, minkä jälkeen pakurijauheen määräksi mitattiin 60 mg näytettä jokaista yksittäistä uuttoa varten. Kaikkiin näytteisiin lisättiin uuttoliuotinta 1 ml, minkä jälkeen näytteitä ravisteltiin ja jätettiin yön ajaksi +4 °C:seen maseroitumaan. Maseroinnin jälkeen suoritettiin 3 tunnin uuttoa, minkä jälkeen näytteet sentrifugoitiin (10 min, 14000 rpm), supernatantti poistettiin keräysputkeen, ja uusi uuttoliuotin lisättiin pellettiin. Uusi seos ravisteltiin ja uutettiin 3 tunnin ajan, minkä jälkeen sama toistettiin ja supernatantit yhdistettiin. Lopuksi supernatantit konsentroidtiin, kylmäkuivattiin ja säilytettiin pakastimessa myöhempää analysointia varten. Analysointi tehtiin liuottamalla kylmäkuivattu uute 0,5 ml:aan ultrapuhdasta vettä, suodattamalla (VWR; 0,2 µm PTFE) se ja mittaamalla saadut arvot. Jokainen uuttomenetelmä tehtiin kahteen kertaan eli kaikkiaan suoritettiin 8 x 2 uuttoa = 16 näytettä (Taulukko 6).

Kokeessa pyrittiin jäljittelemään erilaisia uuttolämpötiloja kirjallisuuden perusteella. Eri kirjallisuuden lähteiden mukaan uuttolämpötilat ja -ajat vaihtelevat paljon. Optimaalisiksi lämpötiloiksi arvioitiin kirjallisuuden perusteella mm. 50 °C tai 80 °C³⁷. Tässä kokeessa yhdeksi uuttolämpötilaksi valittiin 78 °C kokeen helpomman toteuttamisen vuoksi. Etanolin kiehumispiste on 78,4 °C, minkä vuoksi se kokeen kulkua hankaloittaen kiehuisi koeputkissa esim. 80 °C:een lämpötilassa. Joidenkin ohjeiden mukaan pakuria ohjeistetaan jopa keittämään^{51,52}. Siksi 100 °C:een lämpötila valittiin yhdeksi uuttolämpötilaksi vedelle mallintaakseen, vaikuttaako pakurikäävän korkea lämpötila yhdisteiden koostumukseen oleellisesti.

Erilaisilla uuttoliuottimilla pyrittiin löytämään eroja erityisesti alkoholilla ja vedellä tehtyihin uuttoihiin verrattuna muiden muuttujien ollessa vakioina. Erilaisilla uuttamislämpötiloilla havainnollistettiin uuttamistehokkuutta sekä yhdistekoostumusta eri lämpötiloissa tehdyillä uutoksilla. Etanolin 80 % -pitoisuus valittiin kirjallisuudesta tehtyjen havaintojen pohjalta, joiden mukaan kyseinen uuttoliuotin on todettu varsin hyväksi uuttaessa fenolisia ja muita orgaanisia yhdisteitä⁵³.

Pakuriuutteiden yhdistekoostumusta sekä uutosten molekyylien kokonaispitoisuuksia mitattiin ultra- korkean suorituskyvyn nestekromatografian yhdistetyllä massaspektrometrillä eli UHPLC-MS:llä.

UHPLC-MS-laitteella analysoitiin suodatettuja (VWR; 0,2 μm PTFE) 100 μl :n vesinäytteitä. UHPLC-MS-laitteella käytettiin näytteiden analysointiin 280 nm aallonpituutta ⁵⁴.

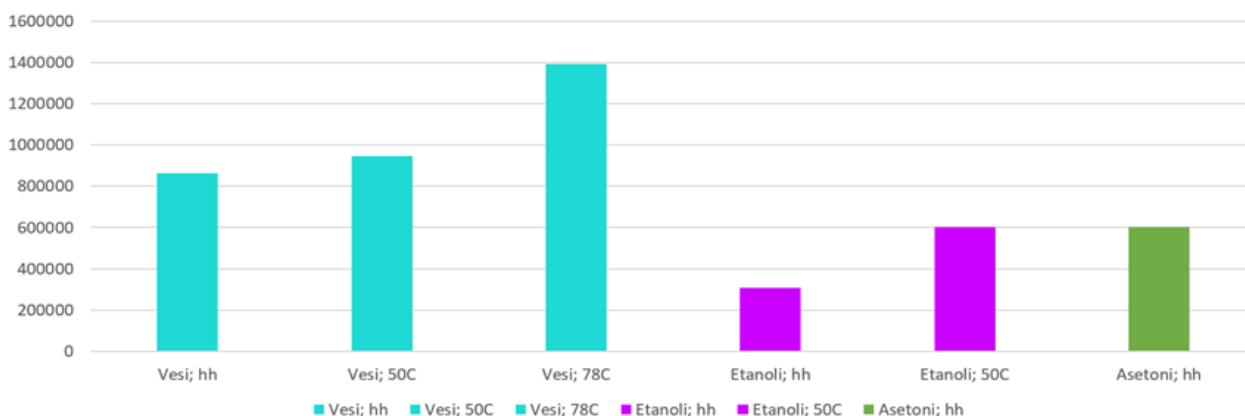
Pakurin antioksidanttiaktiivisuutta tutkittiin DPPH-menetelmällä. DPPH-menetelmä aloitettiin laimentamalla näytteet suhteessa 1:4 (näyte/ultrapuhdas vesi, v/v). Seuraavaksi kuoppalevyn kaivoihin pipetoitiin 50 μl näytettä ja 250 μl DPPH-reagenssia (kolmen toistona jokainen näyte), minkä jälkeen suoritettiin välittömästi antioksidanttiaktiivisuusmittaukset kuoppalevylukijalla. Lisäksi jokaisesta näytteestä mitattiin taustakohina eli blank-arvot, jolloin pipetoitiin 50 μl näytettä ja 250 μl ultra puhdasta vettä kolmeen kaivoon kunkin näytteen kohdalla. Lopullisen signaalin voimakkuus laskettiin vähentämällä näytteiden tuloksista niiden blank-arvot. Standardit määritettiin mittaamalla 0-% inhibition signaali (etanoli/vesi [1/1, v/v]), sekä 100-% inhibition signaali (1.0 mM pentagalloyy-ligluukoosi tai 2.0 M gallushappo) kuuden toistona kumpikin. Standardin suoritettiin analysoimalla näyte, jossa oli 50 μl joko 0-%- tai 100-% inhibition aiheuttamaa liuosta sekä 250 μl DPPH-reagenssia. 0-%- ja 100-% inhibition signaalin keskiarvot laskettiin ja suhteutettiin edelleen pakurinäytteiden signaaliin.

Fenolien kokonaispitoisuutta arvioidaan Folin-Ciocalteu -kokonaisfenolipitoisuusmäärittelyksellä ja analysointi tehtiin kuoppalevylukijalla. Näytteistä tehtiin laimennokset suhteessa 1:13 (näyte/ultrapuhdas vesi, v/v) ja kuoppalevyn kaivoihin pipetoitiin 50 μl näytettä, 50 μl 1N Folin-Ciocalteu -reagenssia ja 100 μl Na_2CO_3 yhteensä kolmeen kaivoon kunkin näytteen kohdalla (kolmen toistona). Tämän jälkeen mittaus suoritettiin välittömästi kuoppalevylukijalla ja lopullinen tulos saatiin kolmen mittauksen keskiarvosta. Lisäksi jokaisesta näytteestä mitattiin taustakohina eli blank-arvot, jolloin pipetoitiin 50 μl näytettä ja 150 μl ultra puhdasta vettä kolmeen kaivoon kunkin näytteen kohdalla. Lopullisen signaalin voimakkuus laskettiin vähentämällä näytteiden tuloksista niiden blank-arvot. Standardisuora määritettiin mittaamalla ultrapuhdasta veden sekä gallushapon kolmella eri pitoisuudella antama signaali (0, 10, 25 ja 100 $\mu\text{g/ml}$; kaikille kolme toistoa), joihin pakurinäytteiden tulokset suhteutettiin. Näin ollen näytteiden tulokset saatiin gallushappoyksiköinä, josta laskettiin kokonaisfenolipitoisuus.

4.2 Tulokset

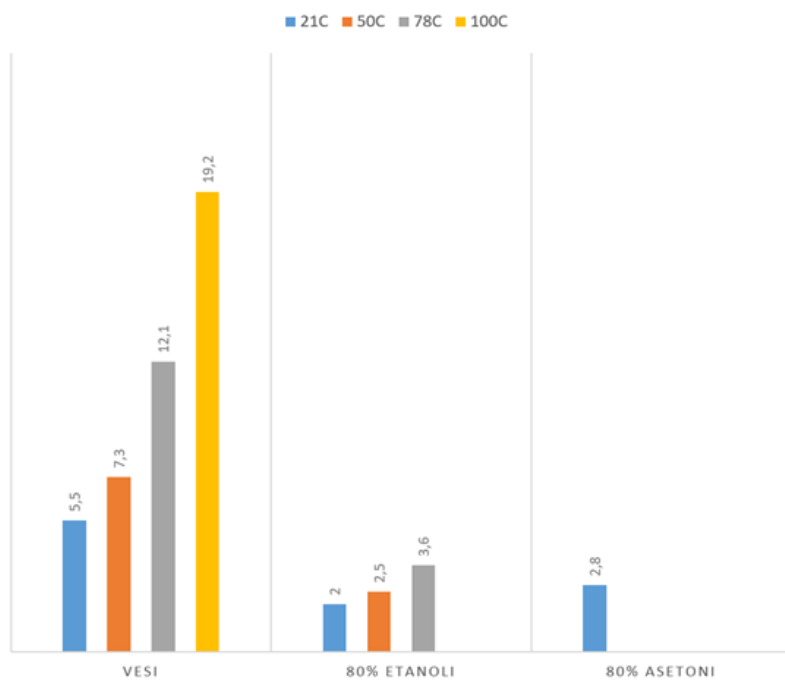
Pakuria vedellä uutettaessa saadaan suurin kokonaismäärä yhdisteitä verrattaessa yksittäisiä lämpötilavakioituja uutomenetelmiä keskenään (Kuva 5). Vedellä havaittiin olleen noin 170 % suurempi yhdisteiden pitoisuus etanoliuutukseen verrattuna huoneenlämmössä ja noin 60 % suurempi yhdistepitoisuus 50 °C:een lämpötilassa. Veden yhdistepitoisuus oli noin 50 % suurempi asetoniuutukseen verrattuna huoneenlämmössä.

Lämpötilan kasvaessa yhdisteitä liukeni enemmän. Veteen liukeni kokeen aikana noin 60 % enemmän yhdisteitä 78 °C:ssa verrattuna huoneenlämpöön, kun taas etanoliuutteen yhdistepitoisuus lähes kaksinkertaistui uuttolämpötilan kasvaessa huoneenlämpötilasta 50 °C:een. Kokeessa ei saatu tuloksia 100 °C:ssa tehtyjen vesiutosten ja 78 °C:ssa tehtyjen alkoholiuutosten näytteiden yhdistepitoisuuksista, sillä UHPLC-MS-laite ei ollut toimintakunnossa näytteiden viimeisenä analysointipäivänä.



Kuva 5. Uutteiden uuttotehokkuudet. Kuvaajassa on kuvattuna eri uuttomenetelmien kykyä liuottaa yhdisteitä suhteellisinä mittayksikköinä ilmoitettuna ja UHPLC-MS:lla mitattuna. Lämpötilan noustessa suurempi määrä yhdisteitä liukeni uuttoliuottimeen. Veden havaitaan liuottavan huomattavasti suuremman kokonaismäärän yhdisteitä alkoholiin ja asetoniin verrattuna. Mitä korkeampi pylvä, sitä suurempi on uutteen yhdisteiden kokonaispitoisuus. X-akselilla on uuttomenetelmä uuttoliuottimen ja lämpötilan suhteen.

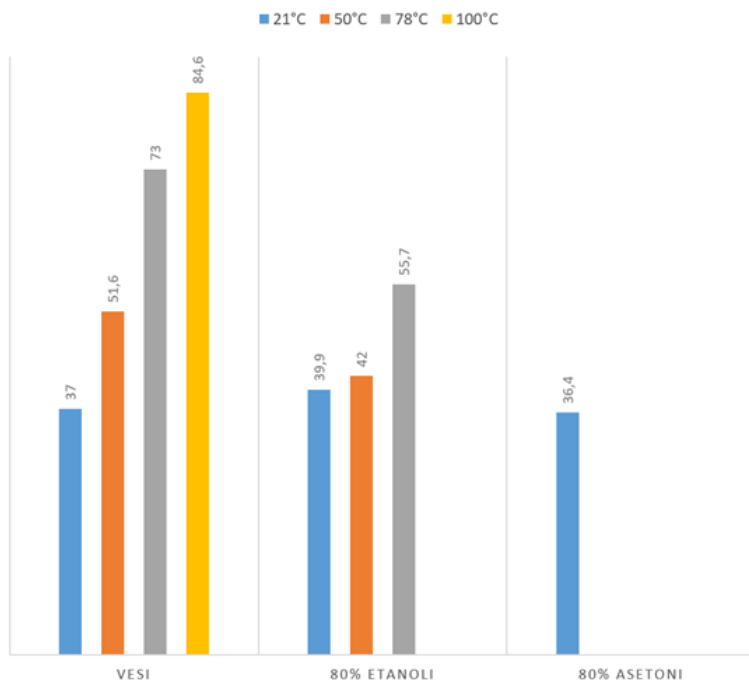
Havaitimme fenolisten yhdisteiden määrän lisääntyneen huomattavasti lämpötilan kohotessa aina 100 °C:een asti (Kuva 6). Veden havaittiin olleen ylivoimainen uuttoliuotin fenolisten yhdisteiden liuottamisessa. Vesiutosten havaittiin sisältävän noin kolme kertaa enemmän fenolisia yhdisteitä samassa lämpötilassa tehtyihin etanoliuutoksiin verrattuna. Huoneenlämmössä tehdyn vesiutteen havaittiin sisältävän lähes kaksi kertaa enemmän fenolisia yhdisteitä asetoniuutokseen verrattuna. Lämpötilalla oli oleellinen vaikutus, sillä kokeessa havaittiin noin 3,5-kertainen ero kokonaisfenolipitoisuudessa veden 100 °C:n ja 21 °C:n uuttolämpötilojen välillä.



Kuva 6. Uutteiden kokonaisfenolipitoisuudet. Fenolisten yhdisteiden pitoisuudet (mg/g) määritettiin eri uuttomenetelmille Folin-Ciocalteu -määrityksellä. Korkeamman uuttolämpötilan havaittiin lisäävään fenolisten yhdisteiden määrää huomattavasti. Vesi oli ylivoimainen uuttoliuotin etanoliin ja asetoniin verrattuna. X-akselilla on uuttomenetelmä uuttoliuottimen ja lämpötilan suhteen. Y-akselilla on näytteiden kokonaisfenolipitoisuus milligrammoina per gramma uutetta.

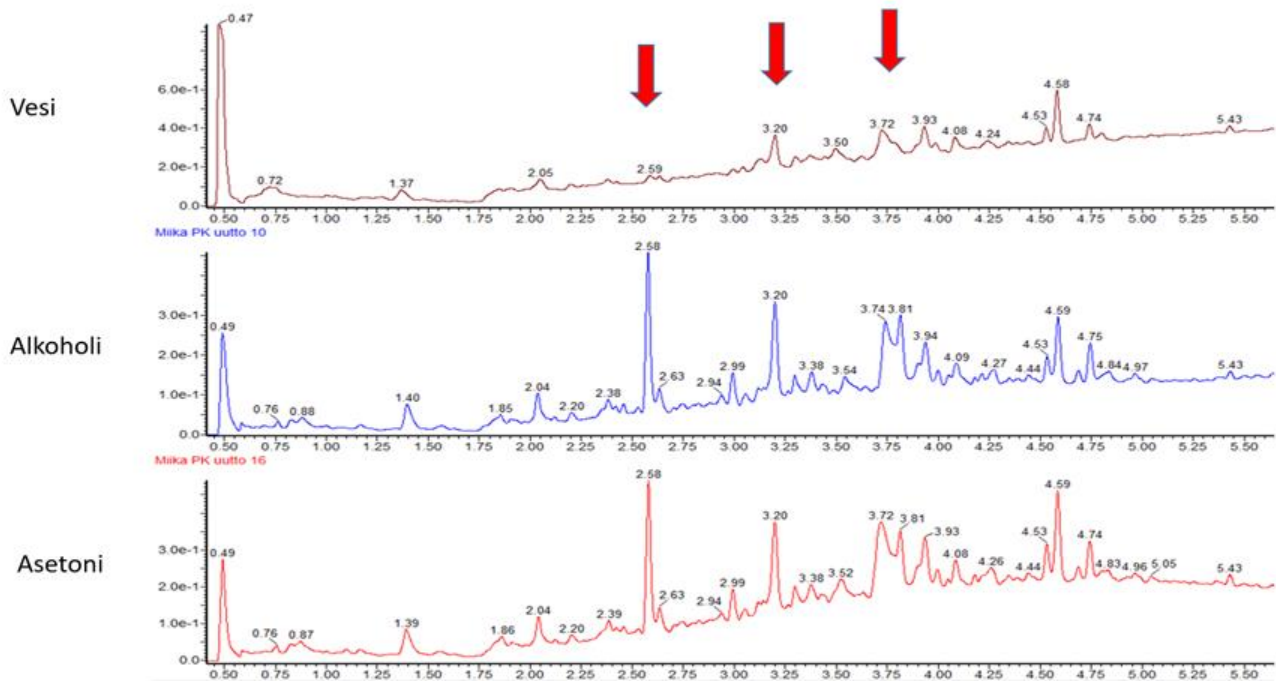
Antioksidanttiaktiivisuusarvoissa havaittiin tasaista kasvua lämpötilaa nostettaessa aina 100 °C:een (Kuva 7). Lämpötilan nostaminen huoneenlämpötilasta 100 °C:een lisäsi vesiuutteen antioksidanttiaktiivisuusarvoja noin 130 %. Suurin nousu antioksidanttiaktiivisuus-arvoissa vesi- ja alkoholiuutteilla havaittiin 50 °C:een ja 78 °C:een välillä. Etanoliuutoksilla havaittiin noin 40 % nousu antioksidanttiaktiivisuusarvoissa uuttolämpötilan noustessa huoneenlämmöstä 78 °C:een.

Erilaisten uuttoliuottimien ei havaittu vaikuttavan oleellisesti antioksidanttiaktiivisuusarvoihin, vaikka pieniä eroja havaittiin. Vesiuutteilla havaittiin olevan noin 16 % suurempi antioksidanttiaktiivisuus-arvo vertaillessa lämpötilavakioituja asetoni- ja alkoholiuutosten tuloksia keskenään. Asetonin ja veden välillä ei havaittu juuri eroja huoneenlämpötilassa uutettaessa.



Kuva 7. Eri uutteen antioksidanttiaktiivisuudet. Uutteen antioksidanttisuusarvot määriteltiin DPPH-mittauksella. Antioksidanttisuusarvoissa ei havaittu suuria eroja eri uutteen menetelmiä vertaillessa. Vesiutteen oli hieman suuremmat antioksidanttisuusarvot etanoliutettiin verrattuna. Antioksidanttisuusarvot nousivat lämpötilan kasvaessa. X-akselilla on uutteen menetelmä uutteen liuottimen ja lämpötilan suhteen. Y-akselilla on ilmoitettu näytteen antioksidanttiaktiivisuus eli näytteen kyky inaktivoida DPPH-reagenssin radikaaleja.

Erilaisten uutteen yhdistekoostumuksissa havaittiin merkittäviä eroja. Erityisesti muutaman yhdisteen havaittiin liuenteen erittäin hyvin sekä etanoliin että asetoniin, mutta ei vesiutteeneseen (Kuva 8). Näin ollen eri uutteen menetelmät omanlaisilla yhdistekoostumuksillaan voivat vaikuttaa erilaisten terapeuttisten käyttökohteiden soveltuvuuteen. Analysoimme kaikissa kokeissa vesinäytteitä, joten pakurin rasvaliukoiset yhdisteet eivät näy tuloksissa.



Kuva 8. Vesi-, alkoholi- ja asetoni-uutokset sekä niiden kromatogrammit UHPLC-MS:lla mitattuna. Kukin kohonnut kohta eli piikki kuvaa eri molekyyliä, jotka laite on tunnistanut. Mitä korkeampi piikki, sitä enemmän kyseistä yhdistettä uuttoliuoksessa on ollut. Suurimmat piikit, joita ei näy vesi-uutoksessa, on merkitty punaisilla nuolilla kuvassa. Eri uutomenetelmien välillä havaitaan keskeisiä eroja yhdistekoostumuksen suhteen.

Kokeiden tuloksissa ei havaittu keskenään ristiriitoja ja tulokset näyttävät tukevan toisiaan. Yhdisteiden kokonaispitoisuudet, kokonaisfenolipitoisuudet ja antioksidanttiaktiivisuudet korreloivat keskenään. Käytännössä tämä tarkoittaa mm. sitä, että pakurin fenolisilla yhdisteillä vaikuttaisi olevan suuri vaikutus uutteen antioksidanttisuusarvoihin.

5 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Pakurikäävällä on havaittu monia erilaisia vaikutuksia soluviljely- ja hiirimalleilla, mikä edelleen luo pohjan pakurin yhdisteiden mahdolliselle terapeuttiselle käytölle. Ihmisten raportoimien kokemusten lisäksi yksittäiset potilaskertomukset ja pienimuotoiset kliiniset kokeilut osittain tukevat joitain tutkimuksissa havaittuja pakurin aiheuttamia terapeuttisia vasteita. Kuitenkin nämä ihmisillä toteutetut kliiniset kokeilut ovat olleet luonteeltaan varsin epäsystemaattisia, ja niiden tieteellinen arvo on todella pieni.

Pakurikäävästä on löydetty lukuisia erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joiden on osoitettu vaikuttavan soluviljely- ja hiirikokeissa niin solu-, elin- kuin yksilötasollakin. Saadut vasteet ovat olleet osaltaan varsin lupaaviakin. Valitettavasti suurimmalta osaltaan näiden yhdisteiden pitoisuudet ovat jääneet varsin pieneksi erilaisissa uutoksissa, minkä vuoksi niiden mahdollinen terapeuttinen käyttö ihmisellä voisi olla mahdollinen ainoastaan silloin, jos pakurista eristetään vaikuttavat yhdisteet ja annostellaan

sitä oikea määrä ihmiselle. Toinen haaste tähän liittyen on imeytyvyys. Osa näistä yhdisteistä imeytyy todella huonosti ruuansulatuskanavassa tai ihon kautta annosteltuna. Kolmas haaste on vaikuttavien yhdisteiden pysyvyys/stabiilisuus ihmisen elimistössä. Yhdiste voi esim. metaboloitua ihmisen elimistössä todella nopeasti, jolloin siitä ei ole ihmiselle terapeutista hyötyä, vaikka hiirikokeissa olisi-kin saatu lupaavia tuloksia. Yhdisteet voivat käyttäytyä ihmisen elimistössä aivan eri tavalla kuin hiirillä. Näin ollen voimme tyytyä lähinnä valistuneisiin arvauksiin (Taulukko 1 ja 2).

Kirjallisuuskatsauksen ja uutostutkimuksen merkittävin löytö on pakurin mahdollinen terapeutinen käyttö suoliston tulehduksellisten tilojen hoidossa. Lukuisten artikkeleiden mukaan vesi-uutosten on todettu olevan selvästi huonompia tulehduksellisten tilojen hoidossa^{17, 18, 22}, kun taas alkoholiuutosten on havaittu monissa hiirikokeissa hillitsevän paremmin tulehduksellisia tiloja^{13, 14, 16}. Suolistotulehduksellisiin tiloihin on todennäköisesti järkevämpää käyttää vahvoja tinktuuroita, kuin juoda pakuriteetä. Samasta syystä iholla esiintyviä tulehduksia (esim. haavassa) hoidettaessa on todennäköisesti suotavampaa käyttää uute-/voide-/öljyvalmistetta, joka on valmistettu esim. öljyyn tai väkevään alkoholiin uuttamalla.

Muina merkittävänä löytöinä havaittiin superoksididismutaasi -entsyymien (SOD) olevan todennäköisesti täysin merkityksetön toimiessaan antioksidanttina sen inaktivoituessa helposti²³. Lisäksi pakurin yhden ligniiniyhdisteen hyötykäyttö HIV:n hoidossa on täysin mahdotonta sen todella huonon imeytyvyyden takia³². Lisäksi yleiset väittämät pakurikäävän korkeista mineraali- ja joskus jopa vitamiinipitoisuuksista ovat turhia, sillä niiden saanto jää todella pieneksi pakuria käyttäessä. Osittain tämä selittyy pakurin hyvin pienillä päivittäisillä annoksilla, sillä parhaimmillaankin kuivan pakurin päivittäinen annos on muutaman gramman luokkaa (Taulukko 4).

Tärkeinä jatkotutkimuksina voisi selvittää pakurikäävän yhdistekoostumusta tarkemmin. Erityisesti kokeellisessa osuudessa saadut erot yhdistekoostumuksissa eri uuttoluottimien välillä ovat erityisen mielenkiintoisia jatkotutkimusten kohteita (Kuva 8). Lisääntyneen pakurin yhdistekoostumuksen tiedon ansiosta olisi mahdollista selvittää tarkemmin pakurin bioaktiivisia yhdisteitä ja jäljittää mahdollisesti terapeuttiset yhdisteet. Lisäksi tarkemman yhdistekoostumuksen tiedon myötä, olisi mahdollista luoda pakurikäävälle oma tunnusomainen yhdisteprofiili-sormenjälki ja käyttää tätä tietoa laadun varmistuksessa.

Pakurikäävälle ei ole tiettävästi tähän päivään mennessä tehty kokonaisvaltaista genomien sekvensointia. Se voisi olla yksi pakurikäävälle tehtävä jatkotutkimus, sillä DNA-analyysia olisi mahdollista käyttää tulevaisuudessa myös laadun varmistuksessa. Samaan asiaan liittyen Luonnonvarakeskus (Luke) on jo suorittanut hankkeen, jossa on pakurinäytteille tehty PCR-analyysijä eri pakurikantojen tunnistusta varten⁵⁵.

Tärkeää on ymmärtää myös erilaisten uuttomenetelmien vaikutus pakuriuutteen lopulliseen yhdistekoostumukseen (4.2-luku) ja mahdolliseen terapeuttiseen käyttökohteeseen. Esimerkiksi vesiuutoksen havaittiin uuttavan ylivoimaisesti suurimman pitoisuuden erilaisia yhdisteitä (mahdollisesti suurimmaksi osaksi polysakkarideja ja polyfenoleja kirjallisuudesta löytyvien uutosten yhdistekoostumusten perusteella ^{3, 10}) alkoholiin ja asetoniin verrattuna. Erilaisilla uuttoliuottimilla ei vaikuttanut olevan oleellista vaikutusta antioksidanttisuusarvoihin, mutta uuttolämpötilan noustessa uutteen antioksidanttisuusarvot nousivat. Jos pakuriuutteen halutaan säilyttävän maksimaalisen antioksidanttisuuden esim. yrittäessä lievittää suolistotulehdusta tai käytettäessä ihoa suojaavana ihovoiteena, kannattaa valmistuksessa käyttää erityisen korkeita uuttolämpötiloja. Pakuria on perusteltua uuttaa myös erittäin korkeissa lämpötiloissa (esim. 100 °C:ssa), jos halutaan tavoitella korkeita antioksidanttisuusarvoja tai uuttaa suuri määrä erilaisia yhdisteitä, kuten fenoleja (4.2-luku). Toisaalta korkeista antioksidanttisuusarvoista ei välttämättä ole juuri hyötyä normaalisti, sillä saamme antioksidanttisia yhdisteitä jo tavallisen ravinnon kautta runsaasti.

Pakurin perinteinen käyttö pakuriteenä tai alkoholitippoina ei itsessään mahdollista lähellekään niin laajaa terapeuttista käyttöä kuin kaupallisesti väitetään. Tämä johtuu mm. yhdisteiden pienistä pitoisuuksista, sekä imeytyvyyden vaihtelevuudesta. Kaikista väitetyistä terapeuttisista käyttökohteista osa vaikuttaa mahdottomilta, osa epätodennäköisiltä ja osa mahdollisilta vain, jos vaikuttava yhdiste eristetään ja annostellaan oikealla tavalla (Taulukko 1 ja 2). Toisaalta jotkin kerrotuista terapeuttisista käyttökohteista vaikuttavat mahdollisilta. Yksi mielenkiintoisimmista pakurista tehdyistä tuotteista on pakurivoide/-salva. Se voisi hillitä ihon tulehdustilaa, stimuloida ihon solujen kasvua sekä jossain määrin suojata ihoa hapetusstressiltä. Lisäksi haavan hoidossa käytetty pakurisalva voisi osittain estää bakteeri- ja sieni-infektioiden ilmaantumista ³⁴.

Lopputuloksena voimme todeta pakurikäävässä olevan potentiaalia joissain erilaisissa terapeuttisissa kohteissa. Taulukoiden 1 ja 2 arvioiden mukaisesti pakurin perinteisellä käytöllä (pakuritee ja tinktuurat) on ainakin teoriassa mahdollista suojata hapetusstressiltä, stimuloida ihon solujen kasvua sekä ehkä hidastaa syövän etenemistä. Lisäksi pakurin uutteen on havaittu sekä aktivoivan, että hillitsevän immunitettia, jolloin sen terapeuttiset vaikutukset voisivat ilmetä tulehduksen hillitsemisenä tai immunitetin voimistumisena. Pakurin eri yhdisteet voivat vaikuttaa immuunijärjestelmään päinvas- taisesti (joko hillitsevästi tai aktivoivasti), minkä vuoksi näiden yhdisteiden keskinäiset pitoisuudet vaikuttanevat lopulliseen vasteeseen (3.2.1-luku). Perinteisestä pakurin käytöstä poiketen sen yhdisteet voisivat periaatteessa eristettyinä, muokattuina ja formuloituina mahdollistaa myös syöpäsolujen tuhoamisen, allergisten oireiden lievittymisen, verensokerin laskun sekä nefropaattisen tilan rauhoit- tumisen tulevaisuuden hoitomuotona. Lisäksi erityisen väkevä pakuriute/-voide voisi paikallisesti

estää bakteerien ja sieneliöiden kasvua iholla³⁴. Samaan lopputulemaan päästäneen, jos pakurin antimikrobiset yhdisteet eristetään ja lisätään esim. voiteeseen. Pakuria ei kuitenkaan missään tapauksessa tule käyttää sellaisenaan monien vakavampien tautien, kuten syövän hoitamisessa esimerkiksi pakuriteetä juomalla. Näissä asioissa tulee kääntyä lääkärin puoleen, mikäli pakurin terapeuttisesta käytöstä herää kysymyksiä. Pakuria voi kuitenkin kokeilla ns. vähemmän vaarallisten oireiden hoitamiseen, kuten lievien ihon ja suoliston tulehduksellisten tilojen hoitamiseen. Alkoholitipat tai öljyyn uutetun pakurin käyttö lienee tulehduksellisten tilojen lievittämiseen pakuriteetä parempi ratkaisu. Yksi syy tähän lienee vesiuutosten runsas beetaglukaanien pitoisuus, mikä itse asiassa aktivoi immuuniteettijärjestelmää ja voi lisätä tulehduksellista tilaa²⁵.

Pakurin käyttö on epäspesifinen hoitomuoto monissa fungiterapeuttisissa kohteissaan. Tämän osaltaan selittää se, että pakurin bioaktiivisten yhdisteiden pitoisuuksissa on havaittu olevan jopa moninkertaisia eroja riippuen sen kasvupaikasta³⁴. Näin ollen vaikuttavan aineen määrä voi vaihdella huomattavasti yksittäisissä annoksissa, mikä tekee hoidosta huonosti toistettavan. Lisäksi pakurikäävän terapeuttisen käytön arviointi ihmisellä on haasteellista myös mm. kliinisten tutkimusten puutteesta johtuen. Pakurikäävän käyttö terapeuttisessa tarkoituksessa on epäspesifistä hoitoa, mutta yhdisteiden eristäminen, mahdollinen kemiallinen muokkaus ja formulointi esim. nanopartikkeleihin pakattuna tekee pakurin lääkinnällisen spesifin hoitomuodon toteuttamisesta ainakin teoriassa mahdollisen. Näiden asioiden selvittämiseen tarvitaan kuitenkin lisätutkimuksia. Sokkotestin tekeminen jatkotutkimuksena olisi suhteellisen helppo kliininen koe, jossa puolet potilaista saa pakuriuutetta/jotain pakurista eristettyä yhdistettä ja puolet placeboa eli lumelääkettä. Näin ollen voitaisiin selvittää pakurin lumevaikutuksia ja sitä kautta arvioida puhtaasti pakurin yhdisteistä aiheutuvia mahdollisia vaikutuksia.

6 KIITOKSET

Suuret kiitokset Turun yliopiston farmakologian ja lääkekehityksen professori emeritus Markku Koululle tämän kandidaatin tutkielman ohjauksesta. Lisäksi suuret kiitokset välittyvät myös toiselle ohjaajalle ja tämän tutkielman rahoittajalle Pro Pakuri Finland ry -yhdistykselle.

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

7 LÄHTEET JA LIITTEET

7.1 Kuvat ja taulukot

Kuva 1. Wikipedia. File:Inonotus obliquus or Fungus betulinus (Chaga, D= Chaga, F= Polypore oblique, NL= Berkenweerschijnzwam), brown spores, rather rare in Holland, at Ginkelse heather - panoramio.jpg. (2018, July 17). *Wikimedia Commons, the free media repository*. ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inonotus_obliquus_or_Fungus_betulinus_\(Chaga,_D%3D_Chaga,_F%3D_Polypore_oblique,_NL%3D_Berkenweerschijnzwam\),_brown_spores,_rather_rare_in_Holland,_at_Ginkelse_heather_-_panoramio.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inonotus_obliquus_or_Fungus_betulinus_(Chaga,_D%3D_Chaga,_F%3D_Polypore_oblique,_NL%3D_Berkenweerschijnzwam),_brown_spores,_rather_rare_in_Holland,_at_Ginkelse_heather_-_panoramio.jpg))

Kuva 2. Pro Pakuri ry / Hannu Piispanen

Kuva 3. Wikipedia (<https://en.wikipedia.org/wiki/Betulin#/media/File:Betulin.svg>)

Kuva 4. Wikipedia (https://en.wikipedia.org/wiki/Ergosterol_peroxide#/media/File:Ergosterol-5,8-peroxide.svg)

Taulukko 3. Taulukon arvot laskettu ” Chemical characterization and biological activity of chaga (inonotus obliquus), a medicinal "mushroom"”-artikkelin tietojen mukaan. [Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, et al. Chemical characterization and biological activity of chaga (inonotus obliquus), a medicinal "mushroom". *J Ethnopharmacol*. 2015;162:323-332.]

Taulukko 4. Jaakko Halmetoja (2014), Pakurikäpää -opas lääkinnällisten sienten maailmaan. (s.70-75)

https://www.accessdata.fda.gov/scripts/interactivenutritionfactslabel/factsheets/vitamin_and_mineral_chart.pdf

<https://www.lenntech.com/recommended-daily-intake.htm>

Taulukko 5. Luonnonvarakeskuksen (Luke) teettämästä tutkielman loppuraportista (Juha-Matti Pihlava 2014. Pakurinäytteiden raskasmetallipitoisuudet. teoksessa: H. Vanhanen (toim.). *Ra-harääseikkö- Pakurinviljelymenetelmät – Loppuraportti*. Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus).

7.2 Lähteet

1. Halmetoja, Jaakko (2014), Pakurikäpää -opas lääkinnällisten sienten maailmaan [s. 11]
2. Kim K, Lee D, Kim D, et al. Anti-inflammatory effects and mechanisms of action of coumaric and betulinic acids isolated from diospyros kaki in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2016;21(9):1206.

3. Mu H, Zhang A, Zhang W, Cui G, Wang S, Duan J. Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *Int J Mol Sci*. 2012;13(7):9194-9206.
4. Kuriyama I, Nakajima Y, Nishida H, et al. Inhibitory effects of low molecular weight polyphenolics from *Inonotus obliquus* on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation. *Molecular Medicine Reports*. 2013;8(2):535-542.
5. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinällisten sienten maailmaan* [s. 53]
6. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinällisten sienten maailmaan* [s. 47-49]
7. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinällisten sienten maailmaan* [s. 89-90]
8. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinällisten sienten maailmaan* [s. 90]
9. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinällisten sienten maailmaan* [s. 104]
10. Wang J, Hu S, Nie S, Yu Q, Xie M. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5692852.
11. Hu Y, Teng C, Yu S, et al. *Inonotus obliquus* polysaccharide regulates gut microbiota of chronic pancreatitis in mice. *AMB Express*. 2017;7.
12. Antioxidant activities of five polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012;50(5):1183-1187.
13. Ma L, Chen H, Dong P, Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chem*. 2013;139(1-4):503-508.
14. Kim HG, Yoon DH, Kim CH, et al. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food*. 2007;10(1):80-89.
15. Ko SK, Jin M, Pyo MY. *Inonotus obliquus* extracts suppress antigen-specific IgE production through the modulation of Th1/Th2 cytokines in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1077-1082.
16. Nguyet TMN, Lomunova M, Le BV, et al. The mast cell stabilizing activity of chaga mushroom critical for its therapeutic effect on food allergy is derived from inotodiol. *Int Immunopharmacol*. 2018;54:286-295.
17. Won DP, Lee JS, Kwon DS, Lee KE, Shin WC, Hong EK. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus*. *Mol Cells*. 2011;31(2):165-173.
18. Kim YR. Immunomodulatory activity of the water extract from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Mycobiology*. 2005;33(3):158-162.
19. Niu H, Song D, Mu H, Zhang W, Sun F, Duan J. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus*. *Int J Biol Macromol*. 2016;86:587-593.

20. Fan L, Ding S, Ai L, Deng K. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus*. *Carbohydr Polym*. 2012;90(2):870-874.
21. Wold CW, Kjeldsen C, Corthay A, et al. Structural characterization of bioactive heteropolysaccharides from the medicinal fungus *Inonotus obliquus* (chaga). *Carbohydr Polym*. 2018;185:27-40.
22. Choi, Hur, An, et al. Anti-inflammatory effects of *Inonotus obliquus* in colitis induced by dextran sodium sulfate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 2010: 943516.
23. Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos JC, Araújo OR, Goulart MO. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? *Redox Biol*. 2015;6:617-639.
24. Yun Y1, Han S, Park E, Yim D, Lee S, Lee CK, Cho K, Kim K. Immunomodulatory activity of betulinic acid by producing pro-inflammatory cytokines and activation of macrophages. *Arch Pharm Res*. 2003 Dec;26(12):1087-95.
25. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäppä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan* [s. 65]
26. Mizuno M, Nishitani Y. Immunomodulating compounds in basidiomycetes. *J Clin Biochem Nutr*. 2013;52(3):202-207.
27. Kang JH, Jang JE, Mishra SK, et al. Ergosterol peroxide from chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the beta-catenin pathway in colorectal cancer. *J Ethnopharmacol*. 2015;173:303-312.
28. Tan W, Pan M, Liu H, Tian H, Ye Q, Liu H. Ergosterol peroxide inhibits ovarian cancer cell growth through multiple pathways. *Onco Targets Ther*. 2017;10:3467-3474.
29. Nomura M, Takahashi T, Uesugi A, Tanaka R, Kobayashi S. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis. *Anticancer Res*. 2008;28(5A):2691-2696.
30. Xu T, Pang Q, Zhou D, et al. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e105768.
31. Chung MJ, Chung CK, Jeong Y, Ham SS. Anticancer activity of subfractions containing pure compounds of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract in human cancer cells and in balbc/c mice bearing sarcoma-180 cells. *Nutr Res Pract*. 2010;4(3):177-182.
32. Ichimura, Watanabe, Maruyama. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia obliqua*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998;62(3):575-7.
33. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2002;56(6):276-282.
34. Glamočlija J, Ćirić A, Nikolić M, et al. Chemical characterization and biological activity of chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal "mushroom". *J Ethnopharmacol*. 2015;162:323-332.
35. Ying YM, Zhang LY, Zhang X, et al. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Phytochemistry*. 2014;108:171-176.

36. Joo JI, Kim DH, Yun JW. Extract of chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) stimulates 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Phytother Res.* 2010;24(11):1592-1599.
37. Wang J, Hu W, Li L, et al. Antidiabetic activities of polysaccharides separated from *Inonotus obliquus* via the modulation of oxidative stress in mice with streptozotocin-induced diabetes. *PLoS One.* 2017;12(6).
38. Yan ZF, Yang Y, Tian FH, Mao XX, Li Y, Li CT. Inhibitory and acceleratory effects of *Inonotus obliquus* on tyrosinase activity and melanin formation in B16 melanoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:259836.
39. Yun JS, Pakh JW, Lee JS, Shin WC, Lee SY, Hong EK. *Inonotus obliquus* protects against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence. *Mol Cells.* 2011;31(5):423-429.
40. Yong T, Chen S, Liang D, et al. Actions of *Inonotus obliquus* against hyperuricemia through XOD and bioactives screened by molecular modeling. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(10):3222.
41. Chandraiah Godugu, Apurva R Patel, Ravi Doddapaneni, Jaganmohan Somagoni, Mandip Singh. Approaches to improve the oral bioavailability and effects of novel anticancer drugs berberine and betulinic acid. *PLoS One.* 2014;9(3):e89919.
42. Chou YJ, Kan WC, Chang CM, et al. Renal protective effects of low molecular weight of *Inonotus obliquus* polysaccharide (LIOP) on HFD/STZ-induced nephropathy in mice. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1535.
43. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan* [s. 148]
44. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan*
45. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/interactivenutritionfactslabel/factsheets/vitamin_and_mineral_chart.pdf
46. <https://www.lenntech.com/recommended-daily-intake.htm>
47. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan* [s. 95]
48. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan* [s. 96-97]
49. Pihlava, Juha-Matti 2014. Pakurinäytteiden raskasmetallipitoisuudet. teoksessa: H. Vanhanen (toim.). *Raharäiseikkö- Pakurinviljelymenetelmät – Loppuraportti.* Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.
50. Halmetoja, Jaakko (2014), *Pakurikäätä -opas lääkinnällisten sienten maailmaan* [s. 99-100]
51. Arata S, Watanabe J, Maeda M, et al. Continuous intake of the chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice. *Heliyon.* 2016;2(5):e00111.

52. Youn MJ, Kim JK, Park SY, et al. Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) induces G0/G1 arrest and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14(4):511-517.
53. Feresin RG, Pourafshar S, Huang J, Zhao Y, Arjmandi BH, Salazar G. Extraction and purification of polyphenols from freeze-dried berry powder for the treatment of vascular smooth muscle cells in vitro. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).* 2017(125):e55605.
54. Engström MT, Päljjarvi M, Fryganas C, Grabber JH, Mueller-Harvey I, Salminen J. Rapid qualitative and quantitative analyses of proanthocyanidin oligomers and polymers by UPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem.* 2014;62(15):3390-3399.
55. Pihlava, Juha-Matti 2014. Pakurinäytteiden DNA-määrittäminen. teoksessa: H. Vanhanen (toim.). *Raharäiseikkö- Pakurinviljelymenetelmät – Loppuraportti.* Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskus.