

# Kohonneen verenpaineen ja ravinnon suolan vaikutukset suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan

Lauri Mervaala

Lääketieteen kandidaatti

Farmakologian osasto

Helsinki 2.11.2020

Tutkielma

[lauri.mervaala@helsinki.fi](mailto:lauri.mervaala@helsinki.fi)

Ohjaaja: Dosentti Esko Kankuri

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

## HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta / Farmakologian osasto		Laitos – Institution – Department Medicum	
Tekijä – Författare – Author Lauri Matti Ilmari Mervaala			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kohonneen verenpaineen ja ravinnon suolan vaikutukset suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävät opinnot		Aika – Datum – Month and year 2.11.2020	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 37 + 4

Suoliston mikrobistolla on osoitettu olevan vahva yhteys useisiin suolistosairauksiin samoin kuin moniin systeemisiin sairauksiin, kuten lihavuuteen, diabetekseen ja eräisiin neurologisiin sairauksiin. Näissä tautitiloissa suoliston mikrobiston koostumus ja toiminta on häiriintynyt (dysbioosi). Uusimpien tutkimustulosten perusteella suolistomikrobiston dysbioosilla saattaa lisäksi olla merkittävä vaikutus sydän- ja verisuonitautien synnyssä. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää verenpainetaudin kokeellista tautimallia hyödyntäen, vaikuttaako kohonnut verenpaine ja ravinnon suola suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan.

Verenpainetaudin kokeellisena tautimallina käytettiin spontaanisti hypertensiivisiä rottia (SHR), joille verenpainetauti kohde-elinvaurioineen kehittyy geneettisistä syistä. Normaalipaineisena verrokkiryhmänä käytettiin Wistar-Kyoto rottia (WKY), joista on aikoinaan risteytyksen avulla kehitetty SHR-kanta. Koe-eläinkannat jaettiin saamaan joko normaalisuolaista tai runsassuolaista ravintoa. Verenpainetaudin kehittymistä seurattiin mittaamalla koe-eläinten verenpainetta häntämittarilla kahdeksan viikon seuranta-aikana. Suolistomikrobiston koostumus selvitettiin määrittämällä ulostenäytteistä eristetystä DNA:sta 16S sekvensoinnilla. Suolistomikrobiston toimintaa arvioitiin määrittämällä seeruminäytteistä yli 650:n aineenvaihduntatuotteen pitoisuudet UPLC-MS/MS-laitteella.

Tutkimuksessa osoitettiin, että verenpainetautia sairastavien koe-eläinten suolistomikrobiston koostumus poikkesi merkittävästi normaalipaineisten koe-eläinten koostumuksesta. Lisäksi havaitsimme, että runsassuolainen ravinto muutti suolistomikrobiston koostumusta myös verenpainetaudista riippumatta. Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysit osoittivat, että useat suolistomikrobien muodostamat metaboliitit imeytyvät suolistosta, jolloin niitä voidaan havaita verenkierrosta biologisesti aktiivisina pitoisuuksina. Verenpainetautia sairastavien koe-eläinten seerumissa eräiden metaboliittien pitoisuudet olivat merkittävästi korkeammat normaalipaineisiin koe-eläimiin verrattuna. Havainto viittaa siihen, että metaboliittien muodostuminen on lisääntynyt suolistossa ja/tai metaboliittien läpäisevyys suoliston seinämästä on verenpainetaudissa lisääntynyt. Yksi mielenkiintoisimmista havaituista metaboliiteista oli fenyyliasetyyliglysiini, jonka veripitoisuutta sekä verenpainetauti että runsassuolainen ravinto nostivat merkittävästi.

Fenyyliasetyylyglysiini on aikaisemmin yhdistetty sydänpotilaiden suurentuneeseen kuolleisuusriskiin sekä verisuonten lisääntyneeseen tukosriskiin. Kaiken kaikkiaan runsassuolainen ravinto aiheutti merkittävästi laajemmat muutokset seeruminäytteiden metabolomiikassa normaalipaineisille koe-eläimille verenpainetautiä sairastaviin verrattuna. Havainto saattaa viitata siihen, että suolistomikrobien muodostamat metaboliitit osallistuvat suolaresistenssiyden muodostumiseen.

Lisäksi tutkimuksessa arvioitiin suolistomikrobien ja verenpainetaudin syy-seuraussuhdetta suorittamalla ulosteensiirto mikrobivapaisiin hiiriin ("germ-free mice"). Ulosteensiirto verenpainetautiä sairastavilta koe-eläimiltä kohotti verenpainetta merkittävästi enemmän kuin ulosteensiirto normaalipaineisilta koe-eläimiltä. Havainto viittaa siihen, että suolistomikrobit ja niiden muodostamat metaboliitit osallistuvat keskeisesti verenpainetaudin kehittymiseen.

Tutkimuksen perusteella suolistomikrobit ja niiden muodostamat metaboliitit voisivat olla lupaavia lääkekehityksen kohdemolekyylejä kehitettäessä uusia hoitoja sydän- ja verisuonitautien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon.

(311 sanaa)

Avainsanat – Nyckelord – Keywords

Gut microbiota; dysbiosis; hypertension; salt; cardiovascular diseases

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited

Tiedekunnan kanslia toimittaa Terkkoon. Opiskelija tallettaa sähköisen version Heldaan.

Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

1 Johdanto .....	1
2 Kirjallisuuskatsaus.....	3
2.1 Sydän- ja verisuonitaudit ja niiden riskitekijät.....	3
2.2 Suoliston mikrobit ja niiden vaikutukset elimistössä.....	4
2.3 Suolistomikrobiston dysbioosi.....	5
2.4 Suolistomikrobit ja suoliston läpäisevyys .....	6
2.5 Sappihapot ja niiden vaikutukset aineenvaihduntaan.....	7
2.6 Lyhytketjuiset rasvahapot ja niiden vaikutukset elimistössä.....	8
2.7 Trimetyyliamiinioksidi – sydän- ja verisuonitautien uusi riskitekijä?.....	9
2.8 Fenyylisetyyli-glutamiini – uusin suolistomikrobien tuottama metaboliitti, joka lisää sydän- ja verisuonitautien riskiä .....	11
2.9 Suolistomikrobit – sydän- ja verisuonitautien lääkehoidon uusi kohde? .....	12
3 Tutkimuksen tavoitteet .....	15
4 Tutkimusaineisto ja menetelmät .....	16
4.1 Koe-eläimet ja tutkimusasetelma .....	16
4.2 DNA:n eristäminen ulostenäytteistä .....	17
4.3 Ulostenäytteiden metagenomiikka-analyysi .....	17
4.4 Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysit.....	18
4.5 Eettiset luvat.....	18
4.6 Oma osallistuminen tutkimukseen .....	18
5 Tulokset .....	19
5.1 Koe-eläinten verenpaine seuranta .....	19
5.2 Ulostenäytteistä eristetyn DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen.....	20
5.3 Suolistomikrobiston koostumus .....	23
5.4 Suolistomikrobiston toiminta .....	24
5.5 ”Proof-of-Concept”-tutkimus .....	27
6 Pohdinta .....	28
7 Johtopäätökset .....	31
Lähdeluettelo.....	32
Liitteet .....	37

# 1 Johdanto

Tällä tutkielmalla pyritään edistämään ymmärrystä suolistomikrobien ja niiden muodostamien metaboliittien vaikutuksista sydän- ja verisuonitauteihin. Tässä luvussa käydään lyhyesti läpi tutkielman sisältö, ja kuvaillaan mitä kukin luku pitää sisällään.

Luku kaksi muodostuu kirjallisuuskatsauksesta. Siinä käsitellään lyhyesti sydän- ja verisuonitauteja sekä suolistomikrobistoa, jonka jälkeen käydään läpi suolistomikrobiston vaikutuksia elimistöön ja häiriötilojen yhteyksiä sydän- ja verisuonitauteihin. Lopussa tarkastellaan lyhyesti tämänhetkisiä hoito- ja ennaltaehkäisykeinoja.

Luvussa kolme kuvataan tutkimukselle asetetut tavoitteet. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, vaikuttaako kohonnut verenpaine ja runsas suolan saanti suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan. Täsmällisemmät tutkimustavoitteet käsitellään tässä luvussa tarkemmin.

Neljäs luku kuvailee tutkimusaineistoa ja menetelmiä. Siinä kuvataan, miten tutkimusasetelma aikaansaatii, ja miten koe-eläimistä kerättiin tutkimusaineistoa. Myös suolistomikrobiston koostumuksen ja toiminnan arvioinnissa käytetyt menetelmät selostetaan. Tutkimuksen eettiset luvat ja tutkielman tekijän osallistuminen käsitellään luvussa tarkemmin.

Luvussa viisi selostetaan tehdyt kokeet ja niistä saadut tulokset. Luvussa käsitellään koe-eläinten verenpaineen kehitystä seuranta-aikana, ja arvioidaan ulostenäytteistä eristetyn DNA:n puhtautta. Lisäksi metagenomiikka- ja metabolomiikka-analyyseissä havaitut muutokset käydään läpi. Lopussa kuvataan myös tutkimuksen jälkeen suoritettu ”Proof-of-Concept”-tutkimus kokonaisuudessaan.

Luvussa kuusi muodostetaan lyhyt yhteenveto tuloksista, ja pohditaan mistä tulokset kertovat. Luvussa keskitytään pohtimaan, miten kohonnut verenpaine ja

runsassuolainen ravinto aikaansaivat tutkimuksessa havaitut muutokset suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan. Lisäksi pohditaan koe-eläinkantojen suolaherkkyysien yhteyttä verenpaine seurannan tuloksiin.

Luvussa seitsemän pohditaan tutkimuksen kansanterveydellisiä merkityksiä. Siinä käsitellään suolan ja ruokavalion merkitystä terveydelle, sekä pohditaan, miten tutkimustuloksia voidaan mahdollisesti hyödyntää tulevaisuudessa.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Sydän- ja verisuonitaudit ja niiden riskitekijät

Sydän- ja verisuonitaudit ovat edelleen maailman yleisin kuolinsyy sekä suurin toimintakyvyttömyyden aiheuttaja kehittyneissä maissa. Ne aiheuttavat noin joka neljännen ihmisen kuoleman Euroopassa. (1) Suomessa sydän- ja verisuonitauteihin kuolee vuosittain yhteensä noin 19 000 ihmistä (2). Aivohalvauksen saa vuosittain noin 25 000 henkilöä, joista noin 4 500 menehtyy (3). Sydäninfarktin saa vuosittain noin 26 000 henkilöä, joista noin 9 500 menehtyy (2,4).

Merkittäviä sydän- ja verisuonitautien riskitekijöitä ovat kolesteroli ja muut rasva-aineenvaihdunnan häiriöt, kohonnut verenpaine, tupakointi ja diabetes. Riskitekijöitä, joihin ei voida vaikuttaa, ovat miessukupuoli, korkea ikä ja perinnöllinen alttius. (4) Perimän aiheuttama riski on kohorttitutkimuksissa osoitettu olevan luultua alhaisempi, sillä selittyy vain noin 20% tapauksista (5).

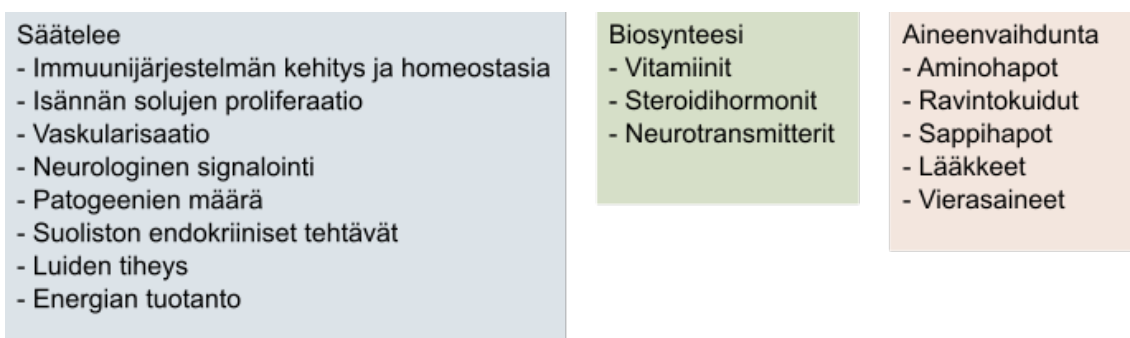
Nykyisin sydän- ja verisuonitautien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon pyritään vaikuttamaan elintapamuutoksilla (esimerkiksi terveellisellä ruokavaliolla, liikunnalla ja tupakoinnin lopettamisella), lääkehoidoilla sekä invasiivisilla toimenpiteillä (4). Uusimpien tutkimustietojen perusteella suoliston mikrobeilla saattaa olla merkittävä vaikutus sydän- ja verisuonitautien synnyssä.



## 2.2 Suoliston mikrobit ja niiden vaikutukset elimistössä

Elimistössämme elää suuri joukko erilaisia bakteereja, arkkeja, viruksia ja yksisoluisia eukaryootteja (6). Valtaosa rinnakkaiselävistä mikrobeista sijaitsee ruoansulatuskanavassa, erityisesti paksusuolen alueella (7). Suurin osa suoliston mikrobeista koostuu vain muutamasta bakteeripääjaksosta (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*). Terveessä suolistossa anaerobit *Bacteroidetes* ja *Firmicutes* kattavat yli 90% kaikista bakteerilajeista. (8) Suoliston mikrobikanta kehittyy ja muuttuu lapsuudessa runsaasti, ja vakiintuu aikuisiässä (9). Yksilöiden välillä havaitaan kuitenkin merkittävää vaihtelua, sillä suolistomikrobiston koostumukseen vaikuttavat niin geneettiset ominaisuudet kuin ympäristötekijätkin, kuten hygienia ja ruokavalio (10,11).

Suoliston mikrobit osallistuvat ruoansulatukseen, antavat suojaa taudinaiheuttajia vastaan, ja ovat tärkeä osa immuunijärjestelmän toimintaa (Kuva 1) (12). Lisäksi suoliston mikrobit tuottavat merkittävän määrän biologisesti aktiivisia metaboliitteja. Nämä metaboliitit imeytyvät isäntänsä systeemiseen verenkiertoon, jossa ne vaikuttavat hormonien kaltaisesti fysiologian säätelyyn – suolistomikrobiston voidaan ajatella olevan yksi massiivinen endokriininen elin. (13)



Kuva 1. Suolistomikrobien vaikutuksia elimistössä. Kuva on muokattu Lynch S V, Pedersen O (12).

## 2.3 Suolistomikrobiston dysbioosi

Suolistomikrobit osallistuvat laaja-alaisesti isäntänsä homeostaasian säätelyyn. Niillä on osoitettu olevan yhteys useisiin eri tauteihin: allergiaan ja atopiaan, ateroskleroosiin, *Clostridium difficile*- ja VRE-infektioihin, Crohnin tautiin, insuliininpuutosdiabetekseen, keliakiaan, NAFLD:hen, nekrotisoivaan enterokoliittiin, lihavuuteen, paksusuolen syöpään, tyypin 2 diabetekseen ja MBO:hon, ulseratiiviseen koliittiin ja ärtyvän suolen oireyhtymään. (9) Näissä tautitiloissa suoliston mikrobiston koostumus ja toiminta on häiriintynyt (dysbioosi), eikä yksittäisten patogeenisten mikrobien osoittaminen ole mahdollista. Tautitilojen dysbioosien syy-seuraussuhteiden arvioiminen on kuitenkin hankalaa; aiheuttaako tauti dysbioosin vai dysbioosi taudin. (7)

Metagenomiikalla pyritään arvioimaan suolistomikrobiston koostumusta. Usein sen avulla saadaan mitattua vain runsaimpia ja suurimpia mikrobiryhmiä. Näin pienimpien mikrobiryhmien aikaansaamat muutokset saattavat jäädä kokonaan huomioimatta, kuten erityyppiset toiminnanlisäys- ja toiminnanvähennysmutaatiot. (7)

Metabolomiikalla puolestaan arvioidaan suolistomikrobiston toimintaa. Sillä pyritään analysoimaan ja tunnistamaan kaikki näytteen sisältämät aineenvaihduntatuotteet, ja arvioimaan niiden biologista aktiivisuutta. Tuloksista ei kuitenkaan voida päätellä aineenvaihduntatuotteiden alkuperää, vaan ne voivat olla peräisin joko ruoansulatuskanavasta tai elimistöstä. (12)

Genomianalyyseillä päästään tutkimaan suoliston mikrobien geenejä, joita on löydetty yhteensä noin yhdeksän miljoonaa, 450-kertainen määrä ihmisen geenien lukumäärään nähden (14,15). Suolistomikrobien geenien tehtävistä tiedetään varsin vähän, ja genomianalyyseillä löydetään jatkuvasti uusia geenejä. Genomianalyysit kuitenkin kertovat vain geenien olemassaolosta – arvioita niiden ekspressiosta tai aktiivisuudesta niillä ei saada. (7) Haastetta lisää se, että bakteerien geenien ekspressio on vahvasti riippuvainen vallitsevasta elinympäristöstä, joka suolistossa muuttuu jatkuvasti (16).

## 2.4 Suolistomikrobit ja suoliston läpäisevyys

Normaalioloissa suoliston seinämä toimii eräänlaisena mekaanisena esteenä ruoansulatuskanavan ja verenkierron välillä. Seinämän epiteelisolut ovat kiinni toisissaan tiiviillä liitoksilla. Lisäksi seinämän solut muodostavat ylleen limakalvon, joka toimii puolustusmekanismina elimistölle vieraita antigenejä vastaan. (17)

Välillä suoliston seinämän toiminta häiriintyy, jolloin sen permeabiliteetti kasvaa. Kyseistä ilmiötä on havaittu erityisesti sydänpotilaille, joiden suoliston seinämä on lisäksi voimakkaasti turvonnut. Häiriötilassa suolistosta pääsee entistä helpommin ja enemmän suolistomikrobeja sekä niiden muodostamia metaboliitteja verenkiertoon. (17) Näiden yhdisteiden pitoisuuksia pystytään mittaamaan verenkierrosta. Osaa yhdisteistä elimistö pystyy tuottamaan itse, eikä yhdisteiden alkuperä ole aina pääteltävissä. Sydänpotilaille tehdyssä tutkimuksessa mitattiin endotoksiinipitoisuuksia sekä sydämen vasemmasta kammiosta että maksan porttilaskimosta, josta havaittiin korkeammat pitoisuudet. Tämä havainto tukee näkemystä yhdisteiden suolistoalkuperästä. (18)

Suoliston seinämän läpi vuotaa siis erilaisia lipopolysakkarideja verenkiertoon. Systemisessä verenkierrossa vaeltaa immuunijärjestelmän soluja, jotka hahmontunnistusreseptoreillaan tunnistavat patogeeneille ominaisia rakenteita, kuten edellä mainittuja lipopolysakkarideja. Kiinnittymisen jälkeen ne alkavat erittää immuunivasteeseen osallistuvia sytokiinejä, jonka seurauksena elimistöön syntyy pro-inflammatorinen tila. (19) Sydänpotilaiden sytokiinipitoisuuksien on osoitettu olevan suoraan verrannollisia sydämen vajaatoiminnan vaikeusasteeseen ja suurentuneeseen kuolleisuusriskiin (20). Kaiken kaikkiaan suoliston seinämän läpi vuotaneiden yhdisteiden veripitoisuudet näyttävät korreloivan suoliston seinämän häiriötilan vaikeusasteeseen, jolloin niitä voidaan mahdollisesti hyödyntää ennustetekijöinä sydän- ja verisuonitaudeissa (21).

Pro-inflammatoristen tekijöiden vaikutusmekanismeja ei tunneta tarkkaan sydän- ja verisuonitaudeissa. Ateroskleroosin on kuitenkin osoitettu olevan tulehdustauti; verisuonten systeemisellä tulehduksella ja ateroskleroosin synnyn ja kehittymisen välillä on osoitettu olevan syy-seuraussuhde. Tämän johdosta anti-inflammatoriset lääkehoidot saattavat tulevaisuudessa olla useamman sydän- ja verisuonitaudin ennaltaehkäisy- ja hoitokeino. (22) Anti-inflammatoristen lääkehoitojen kehitys on haastavaa ja vaatii yksilöllistä räätälöintiä, sillä ne saattavat altistaa opportunististen patogeenien aiheuttamille infektiolle (23).

Gastroenterologian puolelta on osoitettu, ettei suoliston seinämän lisääntyneet läpäisevyys aina ole merkki sydän- ja verisuonitaudista; tulehduksellisissa suolistosairauksissa ja koliitissa ei havaita lisääntyneitä sydän- ja verisuonitautiriskiä, vaikka suoliston seinämän läpäisevyys on lisääntynyt. Tämän syytä ei toistaiseksi tiedetä. (24)

## 2.5 Sappihapot ja niiden vaikutukset aineenvaihduntaan

Sappihapot ovat maksan kolesterolista valmistamia steroidirakenteisia karboksyylihappoja. Ne erittyvät maksasta sappiteiden ja sappirakon kautta ohutsuolen duodenumiin. Siellä ne osallistuvat ruoansulatukseen emulgoimalla rasvoja ja muodostamalla misellejä, mikä mahdollistaa rasvojen imeytymisen. Sappihapot absorboidaan takaisin ileumin loppupäästä ja paksusuolesta, josta ne kulkeutuvat takaisin maksaan, ja erittyvät uudestaan sappeen. (25)

Maksan tuottamilla primaarisilla sappihapoilla on havaittu suoria vaikutuksia suolistomikrobistoon; niillä näyttää olevan antimikrobisia ominaisuuksia, joilla ne pystyvät säätelemään suolistomikrobiston koostumusta ja toimintaa. Sääntely häiriintyy sappihappojen muodostumisen tai erityksen vähentyessä, kuten sappiteiden obstruktiossa, jolloin havaitaan suolistomikrobiston liikakasvua. (26) Sääntely tapahtuu myös toisinpäin; suolistomikrobisto muokkaa primaarisista sappihapoista laajan kirjon erilaisia sekundaarisia sappihappoja (27).

Imeytyessään verenkiertoon sekundaariset sappihapot vaikuttavat elimistön aineenvaihduntaan hormonien tapaisesti. Niillä on runsaasti erilaisia tumareseptoreita sekä G-proteiinikytkentäisiä reseptoreita, joiden avulla ne osallistuvat muun muassa oman synteesinsä sekä glukoneogeenin säätelyyn maksassa. (27) Yksi merkittävistä tumareseptoreista on maksan farnesoidi X reseptori, jonka toimintaa säätelee insuliini. Tyypin 2 diabeetikoilla tämä säätely on häiriintynyt toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla, jolloin havaitaan koholla olevia sappihappopitoisuuksia. Havainto viittaa siihen, että sappihapoilla saattaa olla yhteys insuliiniresistenttiyden muodostumiseen. (28)

## 2.6 Lyhytketjuiset rasvahapot ja niiden vaikutukset elimistössä

Rasvahappoja, joissa on vähemmän kuin kuusi hiiliatomia kutsutaan lyhytketjuisiksi. Niistä yleisimpiä ovat asetaatti, propionaatti ja butyraatti. Paksusuolen mikrobit fermentoivat ravintokuitua saadakseen suuremman osan energiasta hyödynnettyä, jolloin muodostuu lyhytketjuisia rasvahappoja. Nämä toimivat paksusuolen epiteelisolujen pääasiallisena energianlähteenä tehden niistä välttämättömiä ruoansulatuskanavan hyvinvoinnin kannalta. (29)

Lyhytketjuiset rasvahapot vaikuttavat laajalti elimistön fysiologiaan imeytyttyään verenkiertoon. Maksassa ne osallistuvat glukoneogeenin ja lipidien aineenvaihdunnan säätelyyn. (30) Lisäksi ne osallistuvat verenpaineen homeostaasian säätelyyn G-proteiinikytkentäisten reseptorien välityksellä (31,32). Yksi tällainen on Olf78-reseptori, jota havaitaan munuaisten jukstaglomerulaarisissa aparateissa. Sitoutuessaan Olf78-reseptoriin lyhytketjuinen rasvahappo stimuloi reniinin erityksen, jolloin verenpaineetaso kohoavat. (31) Toinen merkittävä G-proteiinikytkentäinen reseptori on GPR41, jota tavataan verisuonien endoteelisoluissa. Lyhytketjuisen rasvahapon sitoutumisesta GPR41-reseptoriin seuraa vasodilataatio ja verenpaineen lasku. (32) Lisäksi GPR41-reseptoreilla on havaittu olevan sydämen sykettä laskeva vaikutus

toistaiseksi tuntemattomalla mekanismilla (33). Kaiken kaikkiaan lyhytketjuisilla rasvahapoilla näyttää olevan verenpainetta laskeva vaikutus (31–33).

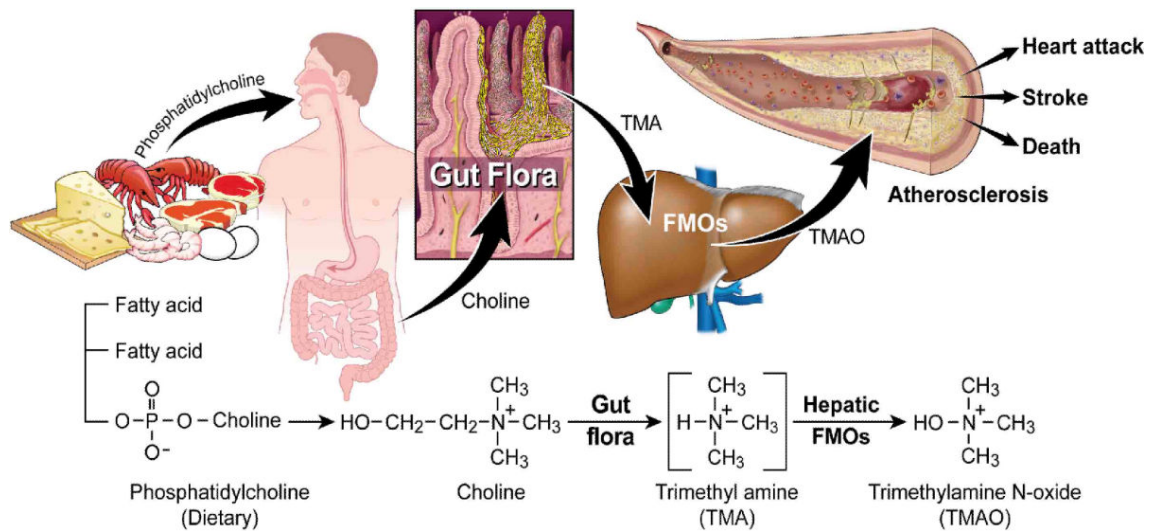
Kuitupitoisilla ravinnolla onkin todettu verenpainetta laskeva vaikutus, jonka lisäksi se näyttää estävän sydämen vajaatoiminnan kehittymistä. Havainnot kuvastavat hyvin elintapojen, kuten runsaskuituisen ruokavalion, merkitystä sydän- ja verisuonitautien ennaltaehkäisyssä ja hoidossa. (34)

Lyhytketjuiset rasvahapot on kokeellisissa mallinuksissa yhdistetty myös lihavuuteen. Antibioottien käyttö nuorilla hiirillä johti lisääntyneeseen lyhytketjuisten rasvahappojen muodostumiseen sekä häiriöihin maksan lipidien ja kolesterolin aineenvaihdunnassa. Yhdessä muutokset altistivat hiiret lihavuudelle. (35)

## 2.7 Trimetyyliamiinioksidi – sydän- ja verisuonitautien uusi riskitekijä?

Yksi keskeisistä tavoitteista suolistomikrobisto-tutkimuksissa on löytää yhdisteitä, joilla on osoitettavissa syy-seuraussuhteita tautien syntymiseen ja/tai kehittymiseen. Ensimmäinen suolistomikrobien muodostama metaboliitti, jolla kokeellisissa tautimallinuksissa osoitettiin tämä yhteys, oli trimetyyliamiini-N-oksidi (TMAO). (36)

TMAO:n muodostumiseen osallistuvat niin suolistomikrobit kuin elimistö. Suolistomikrobien on saatava ravinnosta TMAO:n lähtöaineita: koliinia, fosfatidyylikoliinia tai karnitiinia. Fosfatidyylikoliinia sekä karnitiinia saa runsaasti rasvaa ja kolesterolia sisältävästä ravinnosta, kuten punaisesta lihasta tai kananmunan keltuaisesta. Koliini lienee lähtöaineista merkittävin, koska sitä on runsaasti sapessa, eikä sen määrä ole siten merkittävästi riippuvainen ravinnosta. (36,37) Suolistomikrobit muuttavat lähtöaineet trimetyyliamiineiksi (TMA). Muodostusta säätelee erityisesti suolistomikrobien cut C/D-geenit. (38) Tämän jälkeen TMA imeytyy suolistosta porttilaskimoon, ja siirtyy maksaan. Maksassa TMA metaboloidaan flaviini monooksygenaaseilla TMAO:ksi. (36) Systemisestä verenkierrosta TMAO poistuu lopulta munuaisten kautta (39) (Kuva 2).



Kuva 2. TMAO:n muodostuminen välivaiheiden kautta fosfatidyylikoliinista, sekä TMAO:n aikaansaamia seurauksia. Kuva on lainattu Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. (36).

TMAO on vahvasti yhdistetty ateroskleroosin kehittymiseen. Se näyttää vaikuttavan siihen, kuinka herkästi elimistö siirtää kolesterolia verenkierrosta kudoksiin. Tutkimuksissa on havaittu TMAO:n lisäävän kolesterolin kertymistä makrofageihin, sekä estävän kolesterolin poistumista niistä. Näin se lisää vaahtosolujen muodostumista valtimoiden seinämiin. (36,37)

Ateroskleroosin kehittymistä merkittävämpi vaikutus lienee kuitenkin TMAO:n aiheuttama verisuonien tukosriskin suureneminen. Sen on havaittu muuttavan verihytaleiden kalsiumsignalointia, jolloin pienikin stimulus saa aikaan verihytaleiden aggregaation. (40) TMAO:n on havaittu myös lisäävän kudostekijän ekspressiosta. Kudostekijä toimii aktivaattorina verenhytymisjärjestelmän ulkoisessa aktivaatioreitissä, jolloin tukosriski suurenee entisestään. (41) Matala-annoksen aspiriinin käyttöä on tutkittu suurentuneen tukosriskin kumoamiseen, jossa se näyttää olevan tehokas. Tutkimukset ovat tosin alkuvaiheessa, eikä aspiriinin käyttöä voida suositella korkeiden TMAO-pitoisuuksien hoidoksi. (42)

Lisäksi TMAO:n on osoitettu lisäävän verisuonten tulehdusta. Havainnot viittaavat siihen, että TMAO näyttää lisäävän inflammatoristen geenien ekspressiota endoteelisoluissa sekä verisuonien sileän lihaksen soluissa. Lisäksi se lisää leukosyyttien adheesiota endoteelisoluihin. (43)

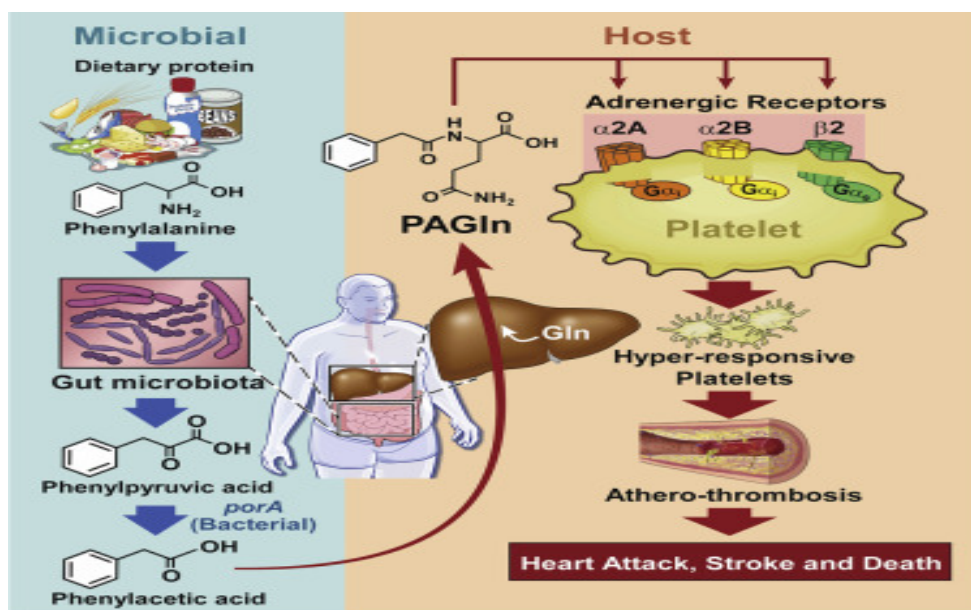
Käsitystä TMAO:n assosiaatiosta tukostaipumukseen tukee se, että suoralla TMAO:n annolla havaitaan annosriippuvainen verisuonten tukosriskin suurentuminen (42). Lisäksi on osoitettu, että tukosaltis fenotyyppi pystytään siirtämään ulostesiirteillä yksilöstä toiseen (40).

## 2.8 Fenyylasetyylylglutamiini – uusin suolistomikrobien tuottama metaboliitti, joka lisää sydän- ja verisuonitautien riskiä

Suolistomikrobisto-tutkimuksessa tyypin 2 diabeetikoilla löydettiin uusi mahdollinen riskitekijä sydän- ja verisuonitaudeille, fenyylasetyylylglutamiini (PAG). Kliinisissä tutkimuksissa PAG on liitetty vakavien sydäntautitapahtumien ja sydänkuolemien lisääntyneeseen riskiin. (44)

PAG muodostuu TMAO:n tavoin suolistomikrobien ja maksan välityksellä. Ravinnosta saatava, välttämätön aminohappo, fenyylialaniini toimii sen lähtöaineena. Fenyylialaniinia on runsaasti proteiinipitoisessa ravinnossa sekä aspartaamia sisältävissä tuotteissa. Suolistomikrobit muuttavat fenyylialaniinin välivaiheiden kautta fenyylitikkahapoksi, joka absorboituu suolesta porttilaskimoon, ja siirtyy maksaa. Maksassa on fenyylitikkahapolle on kaksi vaihtoehtoista aineenvaihduntareittiä; ihmisellä aineenvaihduntatuotteena syntyy PAG:ta, kun jrsijöillä vastaavasti syntyy fenyylasetyylyglysiinia. Syytä aineenvaihduntareitin valintaan ei tiedetä. Maksasta PAG sekä fenyylasetyylyglysiini siirtyvät systeemiseen verenkiertoon. (44) (Kuva 3)





Kuva 3. PAG:n muodostuminen elimistössä fenyylialaniinista, sekä sen aikaansaamat muutokset verihiutaleissa, ja niistä aiheutuvat seuraukset. Kuva on lainattu Nemet I, Saha PP, Gupta N, Zhu W, Romano KA, Skye SM, et al. (44). *PAGI = fenyyliasetyyliglutamiini*

Systeemisessä verenkierrassa PAG sitoutuu adrenergisiin reseptoreihin. Runsaasti korkean affiniteetin PAG:lle omaavia adrenergisiä reseptoreita tavataan verihiutaleiden pinnalla. Sitoutuessaan näihin verihiutaleet muuttuvat hyperreaktiivisiksi, jolloin verisuonten tukosriski suurenee. Mekanismi saattaa osittain selittää beetasalpauksen ennustetta parantavan vaikutuksen sydänpotilailla. (44)

## 2.9 Suolistomikrobit – sydän- ja verisuonitautien lääkehoidon uusi kohde?

Suolistomikrobien merkitystä on vasta viime vuosina alettu ymmärtämään, ja siitä on tullut merkittävä tutkimuskohde läpi lääketieteen osa-alueiden. Sydän- ja verisuonitautien osalta mielenkiinnon kohteena ovat tällä hetkellä uudet suolistomikrobeihin kohdistuvat lääkehoidot. Tarkoituksena on kehittää lääke, jonka vaikutukset kohdistuvat suolistomikrobiston manipulaatioon ilman merkittäviä haittavaikutuksia elimistöön. (24)

Huonosti suolistosta verenkiertoon imeytyvät antibiootit ovat yksi vaihtoehto. Niillä pystytään häätämään tehokkaasti patogeeninen mikrobiryhmä pois suolistosta. Vaikutuksia on kuitenkin vaikea arvioida, mikrobikantojen määrasuhteiden vinoutumisesta voi seurata yllättäviä vaikutuksia. (24) Lisäksi muiden kuin mikrobilääkkeiden, kuten verenpainelääkkeiden, vaikutuksista suolistomikrobeihin ei tiedetä tällä hetkellä juuri mitään. Havaintoja näiden lääkkeiden lievistä antimikrobiaalisista vaikutuksista on kuitenkin jo kuvattu. (45) Mikrobilääkkeiden sekä mahdollisesti myös ”tavallisten” lääkkeiden pitkäaikaisessa, preventiivisessä, käytössä on riski antibioottiresistenssien mikrobikantojen syntyyn (24,45).

Probiootit, prebiootit ja symbiootit saattavat osoittautua ratkaisuksi lievän suolistomikrobiston dysbioosin hoidossa; niitä käytetään jo ehkäisemään antibioottiripulia. Vaikutuksien arvioimista hankaloittaa yksilöiden välisten suolistomikrobiston koostumuksen voimakas vaihtelevuus sekä niiden epäselvä selviytyminen ruoansulatuskanavassa; kuinka suuri osa selviää mahan happamuudesta, kuinka suuri osa löytää oikean vaikutuspaikan vai syrjäytykö mahdollisesti hyödyllinen mikrobikanta. (24)

Toinen tapa muokata suolistomikrobistoa mikrobeilla on ulostesiirteet. Niiden avulla dysbioottinen suolistomikrobisto korvataan terveeseen, tarkasti seulotun, luovuttajan suolistomikrobistolla, jolloin aikaansaadaan merkittävä muutos. Nykyisin ulosteensiirrot suoritetaan joko kolono- tai gastroskopiassa, ja tulevaisuudessa suun kautta otettavin ulostekapselein. Suomessa ulosteensiirtoja käytetään uusiutuvan *Clostridium difficile*-infektion hoidossa, jossa niillä saadaan yli 90 % hoitovaste. (46)

Mielenkiintoisia lääkehoidon kohteita ovat haitallisten metaboliittien muodostumiseen osallistuvat suolistomikrobien entsyymit. Kohdistus entsyymeihin jättää suolistomikrobit eloon, jolloin mikrobikanta ei häiriinny. Pisimmällä kehityksessä olevat entsyymi-inhibiittorit estävät suolistomikrobeja muodostamasta TMA:ta. Entsyymi-inhibiittoreiden etuna on niiden aikaansaama verisuonten tukosriskin pienentyminen ilman merkittävää vuotoriskin suurentumista; ne kumoavat verihutiutaleiden yliherkkyyden estämättä niiden normaalia toimintaa. (47,48)

Ruokavalion muuttaminen lienee helpoin ja yksinkertaisin suolistomikrobiston dysbioosin hoitokeino. Ruoka-ainerajoituksia on käytetty pitkään erilaisten häiriötilojen ja tautien, kuten keliakian ja laktoosi-intoleranssin, hoitona. Ruokavaliomuutoksilla voidaan vähentää merkittävästi haitallisten metaboliittien muodostumista ilman merkittäviä haittoja; karnitiinia (TMAO:n lähtöaine) elimistö muodostaa itse tarvitsemansa määrän, eikä sen saaminen ravinnosta ei ole välttämätöntä. (37,44) Fenyylialaniin välttäminen on työlästä, joskin fenyyliketonuriassa se on välttämätöntä. Sydänystävällisessä ruokavaliossa painotetaan kasvisten, vihannesten ja runsaskuituisten tuotteiden suosimista, sekä vältetään punaista lihaa ja pitkälle prosessoituja ruokia. Ruokavaliosuositusten heikkoudeksi muodostuu usein ruoka-ainerajoitusten runsas määrä, kuten FODMAP:ssa. (34,37,44,49)

### 3 Tutkimuksen tavoitteet

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää verenpainetaudin kokeellista tautimallia hyödyntäen, vaikuttaako kohonnut verenpaine ja ravinnon suola suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan.

Tutkimuksen ensimmäisenä päätavoitteena oli selvittää, millaisia vaikutuksia kohonnut verenpaine saa aikaan suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan.

Tutkimuksen toisena päätavoitteena oli selvittää, aiheuttaako runsas suolan käyttö muutoksia kohonneen verenpaineen lisäksi myös suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan.

Lisäksi tutkimuksessa pyrittiin hahmottamaan suolistomikrobien muodostamia metaboliitteja, jotka voisivat toimia lääkekehityksen kohdemolekyyleinä kehitettäessä uusia hoitoja sydän- ja verisuonitautien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon.

## 4 Tutkimusaineisto ja menetelmät

Aineisto koostuu tähän tarkoitukseen tutkimuksen aikana kerätystä tutkimusaineistosta. Aineisto kerättiin pääosin vuonna 2018. Osa aineistoa lähetettiin Metabolon-yritykselle USA:han ja osa sekvensointipalveluyksikköön Viikin kampukselle.

### 4.1 Koe-eläimet ja tutkimusasetelma

Tutkimusaineisto koostui yhteensä 40:stä koe-eläimestä. Ihmisen verenpainetaudin mallina käytettiin spontaanisti hypertensiivisiä rottia (SHR) (Envigo) sekä niiden geneettisiä kontrolleja, normotensiivisiä Wistar-Kyoto (WKY), joista SHR-kanta on 1960-luvulla kehitetty risteytyksen avulla. 6-viikon ikäiset koe-eläimet jaettiin kokeen alussa neljään ryhmään: 1) SHR-ryhmä joka sai normaalisuolaista ravintoa (n=10), 2) SHR-ryhmä joka sai runsassuolaista ravintoa (n=10), 3) WKY-ryhmä joka sai normaalisuolaista ravintoa (n=10) ja 4) WKY-ryhmä joka sai runsassuolaista ravintoa. Runsassuolainen ravinto (suolapitoisuus 6 %) valmistettiin lisäämällä natriumkloridia (Merck) normaalisuolaiseen (suolapitoisuus 0.8 %) koe-eläinrehuun. Koe-eläimillä oli vapaa pääsy ravintoon ja veteen tutkimuksen aikana. Tutkimuksen seuranta-aika oli kahdeksan viikkoa, minkä aikana eläinten painonkehitystä seurattiin viikoittain. Koe-eläinten verenpaine mitattiin epäsuorasti häntämittarilla kahden viikon välein (CODA, Kent Scientific Corporation, USA) (50). Ennen verenpaineen mittausta koe-eläimiä pidettiin 10 minuuttia 32 C:n lämmössä, jotta häntävaltimon pulsaatio on paremmin tunnistettavissa. Verenpainemittauksen suoritti yksi ja sama henkilö koko tutkimuksen ajan, jotta tulosten mahdollinen tekijäriippuvainen vaihtelevuus minimoitiin. Mittaustulokset kirjattiin manuaalisesti tietokoneelle. Kokeen lopussa koe-eläimet nukutettiin, minkä jälkeen veri- ja kudoksenäytteet kerättiin jatkotutkimuksia varten. Suolistomikrobiston koostumuksen selvittämistä varten ulostenäytteet kerättiin kokeen lopussa koe-eläinten paksusuolesta. Ulostenäytteet siirrettiin välittömästi Eppendorf-koeputkiin, syväjäädettiin kuivajäissä ja säilöttiin -80 C:ssa.

## 4.2 DNA:n eristäminen ulostenäytteistä

Ulostenäytteiden genomisen DNA eristettiin kaupallisen DNA-eristyskitin avulla valmistajan antamien ohjeiden mukaisesti (Nucleospin DNA Stool kit, Macherey-Nagel, Saksa) (kts. Liite 1). Lyhyesti, DNA:n eristäminen aloitettiin siirtämällä 180-220 mg ulostenäytettä NucleoSpin Bead Tube-putkeen, johon lisättiin 850 µl hajoittavaa lysis-puskuria. Näyteputkea inkuboitii 5 min +70 C:ssa, minkä jälkeen putkea ravisteltiin 10 min huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteiden epäpuhtaudet sakkautettiin sentrifugoimalla putkia 3 min 13,000 x G. Seuraavaksi näytteestä saatu supernatantti käsiteltiin NucleoSpin Inhibitor Removal-pylväässä, ja puhdistettu lysaatti eristettiin sentrifugoinnin jälkeen. Lopuksi DNA sidottiin silikakalvoon, jolloin erilaiset inhibiittorit ja loput epäpuhtaudet saatiin pesuohjelmalla poistettua. Lopuksi silikakalvoon sidottu DNA kuivattiin, ja uutettiin 5 mM:iin Tris-HCl:ään (pH 8.5). Näytteiden DNA-pitoisuus määritettiin (QIAxpert Instrument, Qiagen, USA) ennen lähettämistä metagenomisiin analyyseihin.

## 4.3 Ulostenäytteiden metagenomiikka-analyysi

Eristetyt DNA-näytteet lähetettiin Viikin kampukselle tutkimusjohtaja Petri Auvisen johtamaan sekvensointipalveluyksikköön (DNA Sequencing Service), missä näytteiden metagenomiikka-analyysit tehtiin. DNA-näytteistä sekvensoitiin mikrobien ribosomaalisen 16S RNA geenin seitsemän hypervaihtelevaa aluetta palveluyksikön pystyttämällä menetelmällä. Lisäksi näytteiden bioinformatiikka-analyysit tehtiin palveluyksikön toimesta. Näin ulostenäytteiden mikrobit saatiin tieteellisesti luokiteltua sukutasolle asti. Tulokset lähetettiin sähköisesti tutkimusryhmälle.

#### 4.4 Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysit

Suolistomikrobiston toiminnan selvittämistä varten tutkimuksessa kerätyt seeruminäytteet lähetettiin Metabolon-yritykselle USA:han. Seeruminäytteistä tehtiin kohdistamaton metabolomiikka-analyysi nestekromatografia-massaspektrometria-menetelmällä (UPLC-MS/MS). Myös seeruminäytteiden bioinformatiikka-analyysit tehtiin Metabolonin toimesta. Metabolomiikka-analyysi tarjoaa keinon havaita suuren määrän aineenvaihduntatuotteita seerumista samanaikaisesti. Yhdisteiden alkuperä voi olla ravinnosta, suoliston mikrobeista tai elimistöstä. Analysointiin käytetyt menetelmät ja tutkimustulokset lähetettiin sähköisesti tutkimusryhmälle.

#### 4.5 Eettiset luvat

Hankelupa tutkimuksen suorittamiselle on saatu Etelä-Suomen aluehallintoviraston hankelupalautakunnalta (ESAVI / 8054 / 04.10.07 / 2016).

#### 4.6 Oma osallistuminen tutkimukseen

Osallistuin kokeellisen tutkimuksen suunnitteluun ennen kokeen käynnistymistä, ja olin toteuttamassa kahdeksan viikon seurantatutkimusta kesällä 2018 (koe-eläinten päivittäinen hoito, koe-eläinten punnitukset ja verenpainemittaukset, kudos- ja verinäytteiden keruu). Vastasin DNA:n eristämisestä ulostenäytteistä.

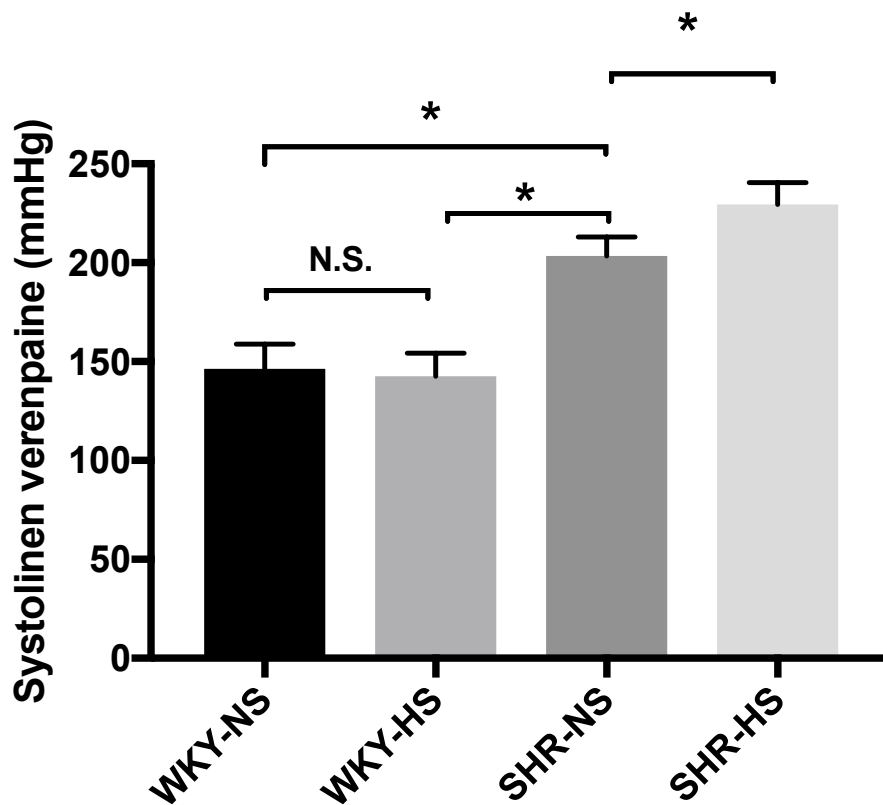
## 5 Tulokset

### 5.1 Koe-eläinten verenpaineseuranta

Jokaisen koe-eläimen systolinen verenpaine mitattiin tutkimuksen alussa. 6-viikon ikäisten SHR-rottien systolisen verenpaineen keskiarvo oli  $146 \pm 4$  mmHg ( $n=20$ ), joka oli huomattavasti korkeampi kuin normotensiivisten WKY-verrokkien ( $n=20$ ) (systolisen verenpaineen keskiarvo  $135 \pm 2$  mmHg,  $p<0,05$ ). Tämän jälkeen koe-eläimet jaettiin neljään ryhmään: 1) SHR-ryhmä joka sai normaalisuolaista ravintoa ( $n=10$ ), 2) SHR-ryhmä joka sai runsassuolaista ravintoa ( $n=10$ ), 3) WKY-ryhmä joka sai normaalisuolaista ravintoa ( $n=10$ ) ja 4) WKY-ryhmä joka sai runsassuolaista ravintoa.

Normaalisuolaista ravintoa saaneen SHR-ryhmän systolinen verenpaine kohosi seuranta-aikana, kokeen lopussa systolisen verenpaineen keskiarvo oli  $204 \pm 3$  mmHg ( $n=10$ ). Normaalisuolaista ravintoa saaneiden WKY-verrokkien verenpainetaso pysyi lähes muuttumattomana seuranta-aikana, systolisen verenpaineen keskiarvo oli kokeen lopussa  $143 \pm 4$  mmHg ( $n=10$ ). Runsassuolainen ravinto kohotti merkittävästi verenpainetta SHR-ryhmässä ( $229 \pm 3$  mmHg; muutos  $+25 \pm 3$  mmHg ( $n=10$ )), kun taas WKY-ryhmällä verenpaine pysyi muuttumattomana ( $143 \pm 3$  mmHg ( $n=10$ )) (Kuva 4).

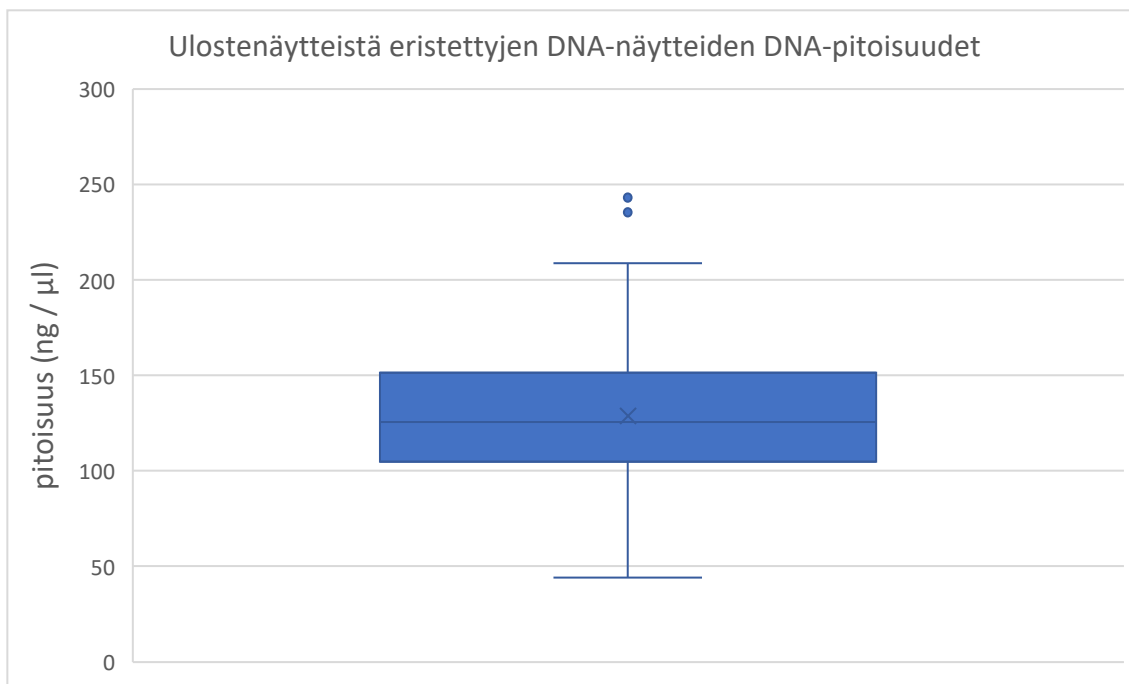




Kuva 4. Systolinen verenpaine eri tutkimusryhmissä kokeen lopussa mitattuna. WKY = Wistar-Kyoto rotta; SHR = spontaanisti hypertensiivinen rotta; NS = normaalisuolainen ravinto; HS = runsassuolainen ravinto. \* =  $p < 0.05$ , n.s. = ei tilastollisesti merkittävä (non-significant)

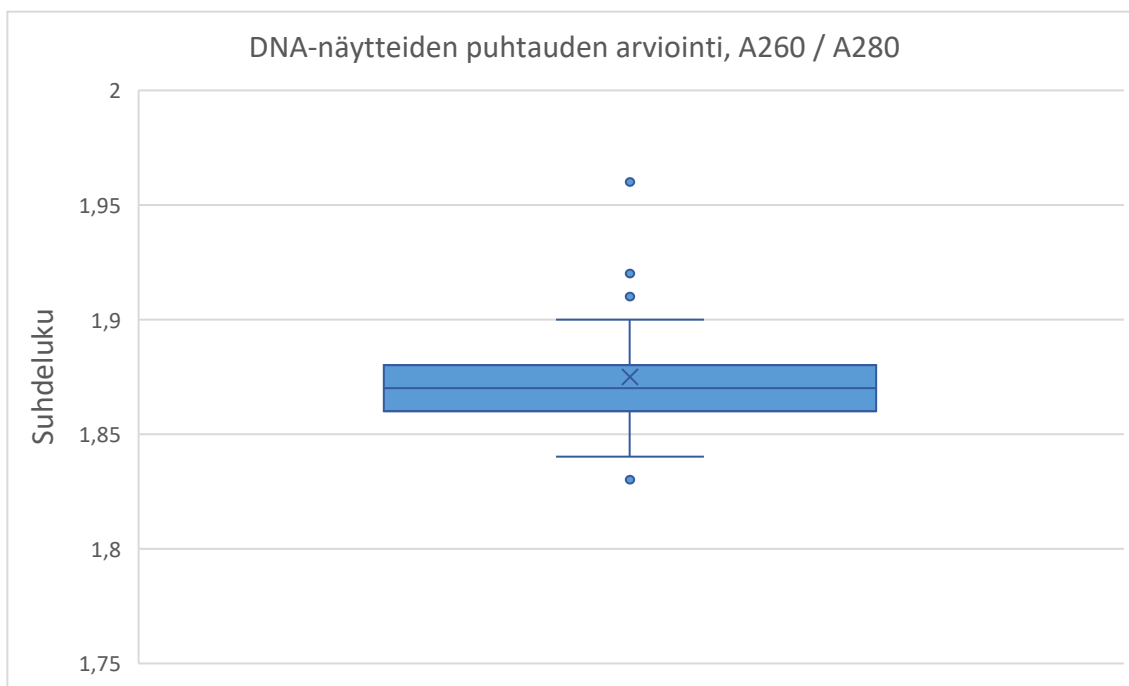
## 5.2 Ulostenäytteistä eristetyn DNA:n pitoisuuden ja puhtauden määrittäminen

Ulostenäytteistä eristetyistä DNA-näytteistä määritettiin spektrofotometrialla (QIAXpert Instrument, Qiagen, USA) niiden DNA-pitoisuudet ja DNA:n puhtaus. Ulostenäytteistä eristettyjen DNA-näytteiden DNA-pitoisuudet on esitelty kuvassa 5.

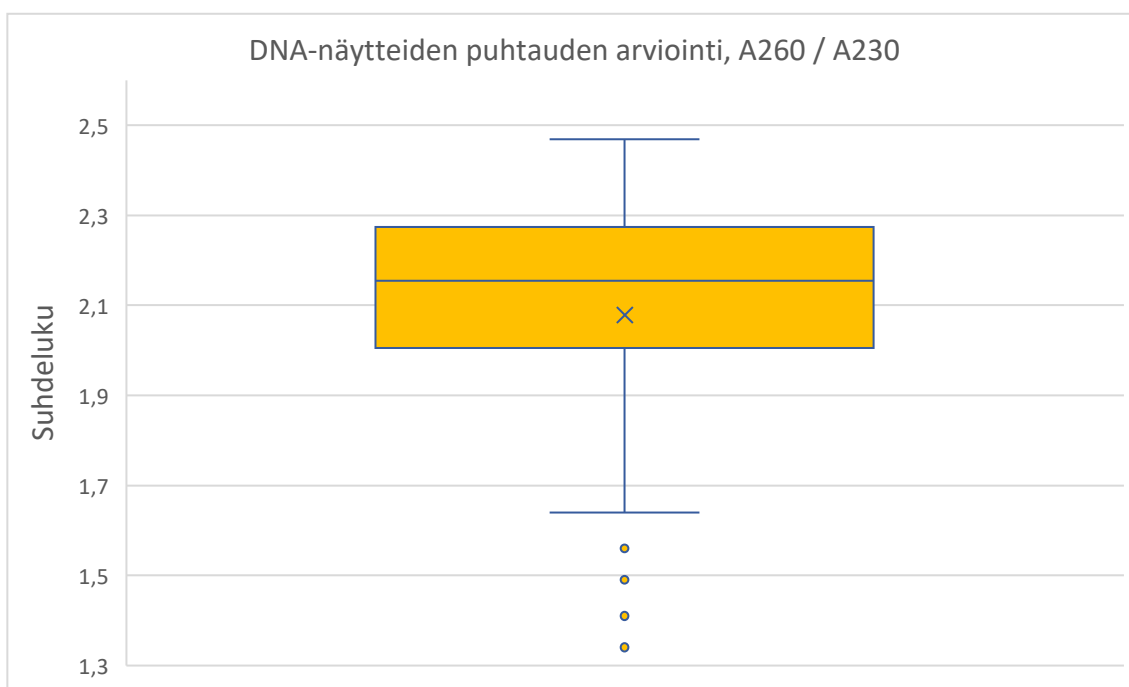


Kuva 5. Ulostenäytteistä eristettyjen DNA-näytteiden DNA-pitoisuudet. DNA-pitoisuuksien keskiarvo oli 128,7 ng / µl ja mediaani 125,5 ng / µl.

Merkittävin mittari DNA:n puhtaudelle on DNA:n absorptioista 260 nm:n ja 280 nm:n aallonpituuksille laskettava suhdeluku  $A_{260} / A_{280}$ . Suhdeluvun saadessa arvoja 1,7 ja 1,9 välillä DNA tulkitaan puhtaaksi. Toinen käytössä oleva mittari DNA:n puhtaudelle on vastaava suhdeluku 260 nm:n ja 230 nm:n aallonpituuksille,  $A_{260} / A_{230}$ . Yli 2,0:n suhdeluku viittaa puhtaaseen DNA:han. Edellä mainituista raja-arvoista poikkeavat arvot viittaavat DNA:n mahdollisiin epäpuhtauksiin. Mittausten tulokset on esitelty kuvissa 6 ja 7. Tutkimustulokset osoittavat, että eristetyn DNA:n puhtaus oli riittävä jatkotutkimuksia varten.



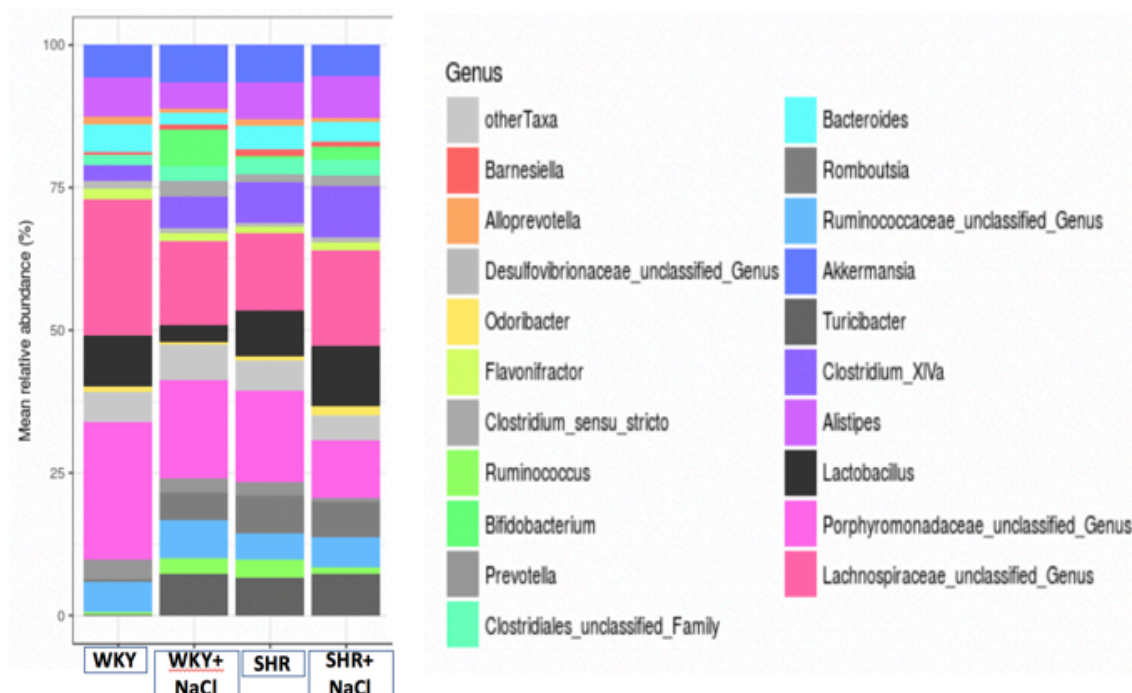
Kuva 6. DNA-näytteiden puhtauden arviointi A260 / A280:lla. Suhdelukujen keskiarvoksi saatiin 1,87 ja mediaaniksi 1,87.



Kuva 7. DNA-näytteiden puhtauden arviointi A260 / A230:lla. Suhdelukujen keskiarvoksi saatiin 2,08 ja mediaaniksi 2,16.

### 5.3 Suolistomikrobiston koostumus

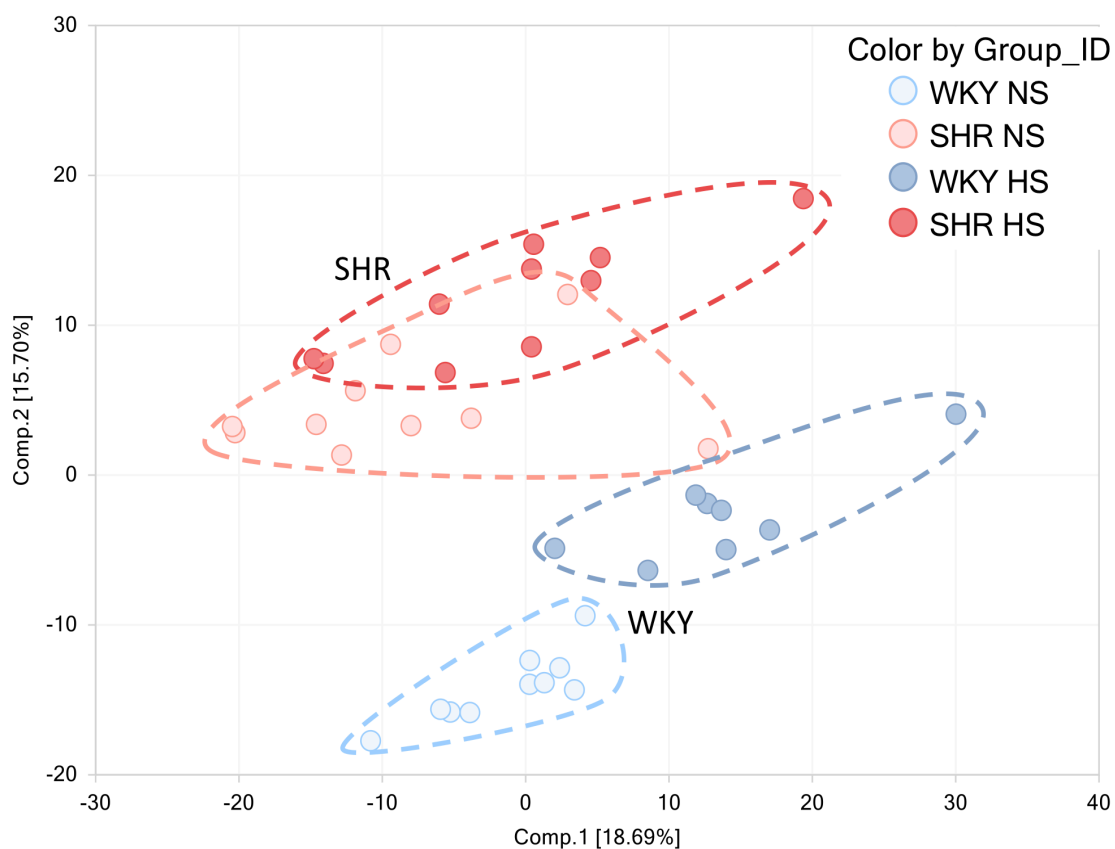
Metagenomiikka-analyyseissä havaittiin yhteensä 2 640 erilaista taksonomista yksikköä. Näistä 100:lla todettiin merkittäviä eroavaisuuksia normotensiivisen ja hypertensiivisen koe-eläinkannan välillä. Lisäksi havaittiin, että runsassuolainen ravinto lisäsi eroavaisuuksia niin WKY- kuin SHR-rotilla. Suolistomikrobiston koostumus eri tutkimusryhmissä on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Metagenomiikka-analyysi suolistomikrobiston koostumuksesta. Haivatut taksonomiset yksiköt ovat värikoodattu, ja lueteltu selvennyksineen ohessa. *WKY* = *Wistar-Kyoto rotta*; *SHR* = *spontaanisti hypertensiivinen rotta*; *NaCl* = *runsassuolainen ravinto*

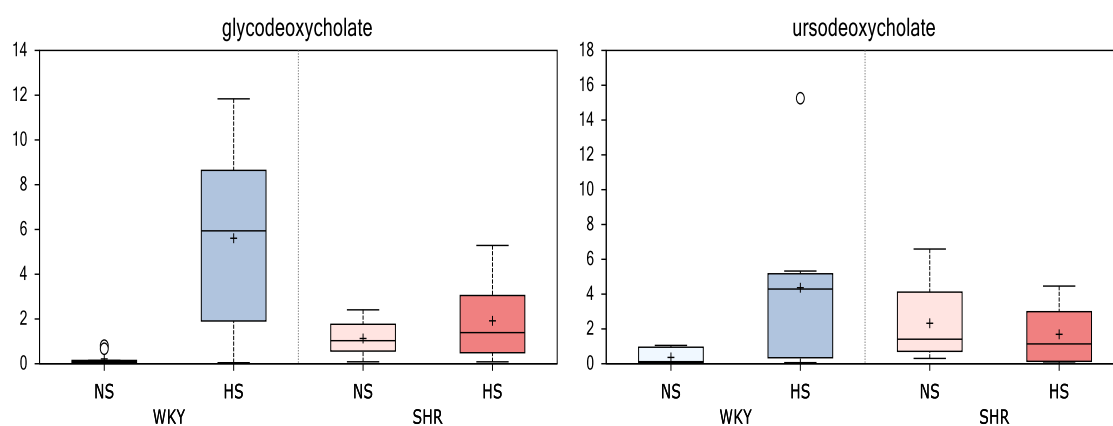
## 5.4 Suolistomikrobiston toiminta

Seeruminäytteiden kohdistamattomassa metabolomiikka-analyysissä havaittiin yhteensä 691 erilaista yhdistettä. Näistä 259:llä haivattiin tilastollisesti merkitseviä eroavaisuuksia yhdisteiden veripitoisuudessa normotensiivisen ja hypertensiivisen koe-eläinkannan välillä ( $p < 0,05$ ). Metabolomiikka-määritysten pääkomponenttianalyysi on esitetty kuvassa 9.

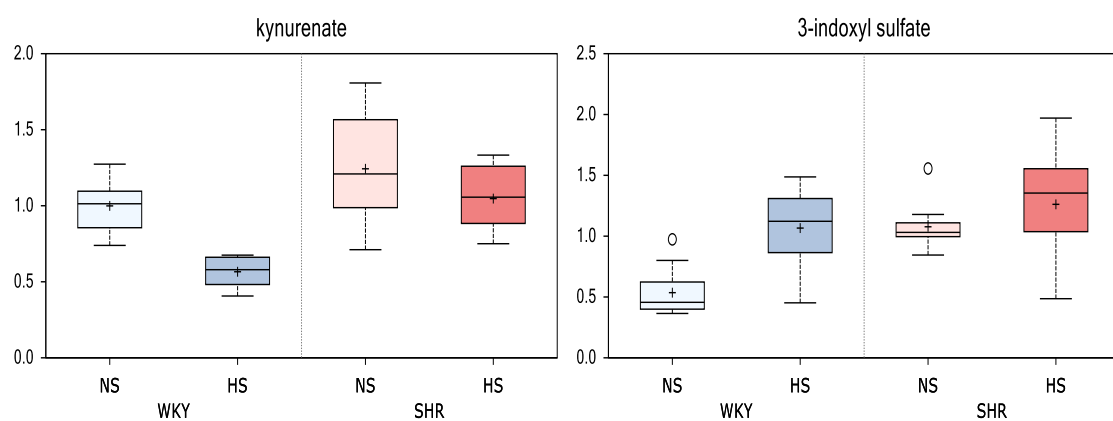


Kuva 9. Pääkomponenttianalyysi. Pääkomponenttianalyysissä kerätyn datan keskeisimmät piirteet pyritään esittämään ilman merkittävää informaatiohukkaa. WKY- ja SHR-ryhmät ovat ryhmitelty erikseen. *WKY* = *Wistar-Kyoto* rotta; *SHR* = *spontaanisti hypertensiivinen rotta*; *NS* = *normaalisuolainen ravinto*; *HS* = *runsassuolainen ravinto*

Keskeisimpinä verenpainetautiin liittyvinä aineenvaihduntareittimuutoksina havaittiin lisääntynyt aktiivisuus tryptofaanien, sappihappojen ja hemien aineenvaihduntareiteissä, lipidivälitteisessä signaloinnissa sekä rasva-aineiden käyttämisessä energiantuotannossa. Eräiden sekundaaristen sappihappojen pitoisuudet ovat esitetty kuvassa 10 ja tryptofaanien aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksia kuvassa 11.

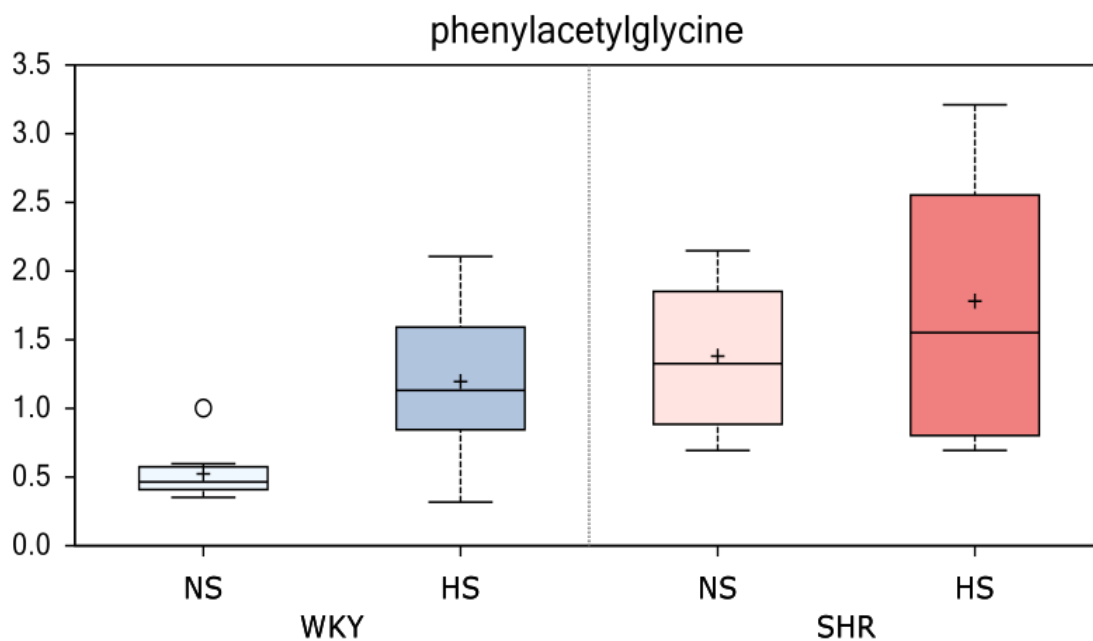


Kuva 10. Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysi eräistä sekundaarisista sappihapoista. Runsassuolainen ravinto nosti merkittävästi normotensiivisten WKY-rottien sekundaaristen sappihappojen pitoisuuksia. *WKY = Wistar-Kyoto rotta; SHR = spontaanisti hypertensiivinen rotta; NS = normaalisuolainen ravinto; HS = runsassuolainen ravinto*



Kuva 11. Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysi tryptofaanien metaboliiteista. Kohonneita pitoisuuksia havaittiin kauttaaltaan SHR-rotilla. *WKY = Wistar-Kyoto rotta; SHR = spontaanisti hypertensiivinen rotta; NS = normaalisuolainen ravinto; HS = runsassuolainen ravinto*

Yksi mielenkiintoisimmista havaituista metaboliiteista oli fenyyliasetyyliyglysiini, jonka pitoisuus oli SHR-ryhmässä merkittävästi enemmän koholla kuin WKY-verrokeilla. Runsassuolainen ravinto nosti pitoisuuksia molemmissa koe-eläinkannoissa (Kuva 12).

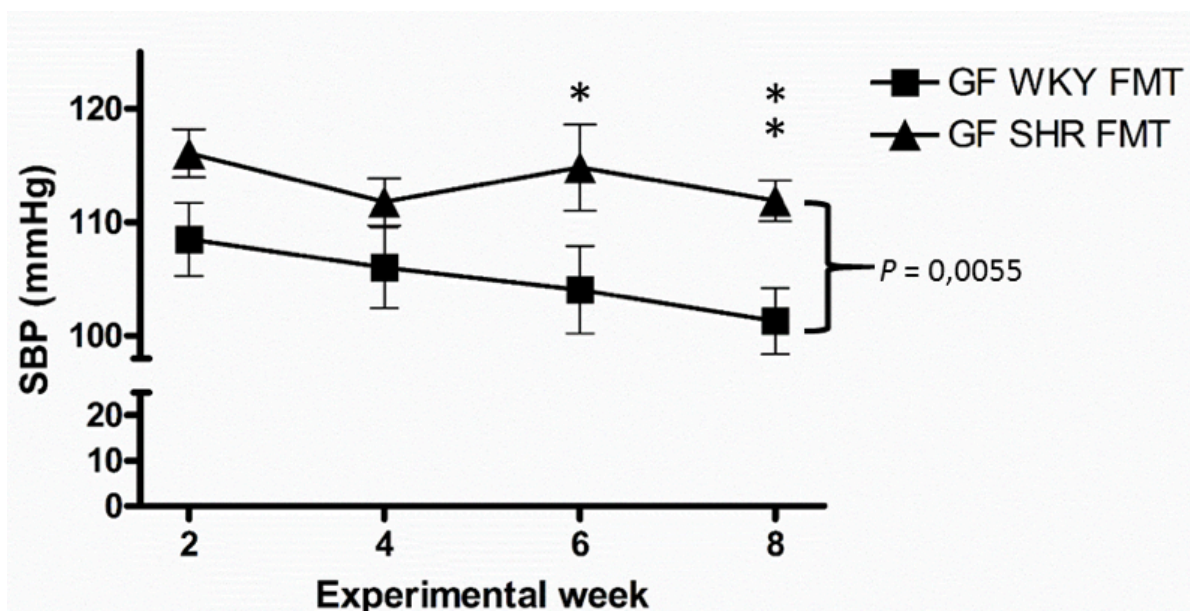


Kuva 12. Seeruminäytteiden metabolomiikka-analyysi fenyyliasetyyliyglysiinistä. WKY = Wistar-Kyoto rotta; SHR = spontaanisti hypertensiivinen rotta; NS = normaalisuolainen ruokavalio; HS = runsassuolainen ruokavalio

## 5.5 "Proof-of-Concept"-tutkimus

Tutkimuksen jälkeen suoritettiin vielä lisätutkimus, jonka tavoitteena oli ulostesiirteiden avulla arvioida suolistomikrobien ja verenpainetaudin syy-seuraussuhdetta.

Tutkimuksessa käytettiin mikrobivapaita C57BL/6 hiiriä ("germ-free mice", Taconic). Hiiret jaettiin kahteen eri ryhmään: 1. ryhmä sai ulostesiirteitä normotensiivisilta WKY-rotilta (n=6), ja 2. ryhmä sai ulostesiirteitä hypertensiivisiltä SHR-rotilta (n=6). Ulostesiirtoja suoritettiin viikoittain. Hiirten verenpaineen kehitystä seurattiin yhteensä kahdeksan viikon ajan. Tutkimuksessa osoitettiin, että ulostesiirteet hypertensiivisiltä SHR-rotilta kohottivat mikrobivapaiden hiirien systolista verenpainetta merkittävästi enemmän kuin ulostesiirteet normotensiivisilta WKY-rotilta ( $p < 0,0055$ , Kuva 13). Havainto viittaa siihen, että ulostesiirteillä pystytään vaikuttamaan yksilön verenpainetasoihin. Hypertensiivisen fenotyypin siirto yksilöstä toiseen suolistomikrobiston välityksellä viittaa vahvasti siihen, että suolistomikrobeilla ja niiden muodostamilla metaboliiteilla on keskeinen rooli verenpainetaudin kehittymisessä.



Kuva 13. Mikrobivapaiden C57BL/6 hiirien verenpaine seuranta. *GF WKY FMT* = mikrobivapaat hiiret, jotka saivat ulostesiirteitä Wistar-Kyoto rotilta; *GF SHR FMT* = mikrobivapaat hiiret, jotka saivat ulostesiirteitä spontaanisti hypertensiivisiltä rotilta



## 6 Pohdinta

Suolistomikrobiston ja ihmisten tautitilojen välisten yhteyksien tutkiminen on useimmiten haastavaa, koska potilaiden perinnölliset ominaisuudet vaihtelevat runsaasti ja ravintotekijöitä on usein lähes mahdoton kontrolloida tiukasti. Tämän takia suolistomikrobistoa tutkittaessa käytetään usein kokeellisia tutkimusmalleja välittävien mekanismien ja syy-seuraussuhteiden selvittämiseksi. Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää verenpainetaudin geneettistä tautimallia hyödyntäen, vaikuttaako ravinnon suola ja kohonnut verenpaine suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan.

Tässä tutkimuksessa suolistomikrobiston koostumus selvitettiin määrittämällä ulostenäytteistä eristetystä DNA:sta 16S sekvensoinnilla. Suolistomikrobiston toimintaa arvioitiin määrittämällä seeruminäytteistä yhteensä yli 650:n aineenvaihduntatuotteen pitoisuudet UPLC-MS/MS-laitteella. Molemmat edellä kuvatut menetelmät ovat validoituja ja soveltuvat erinomaisesti tutkimushypoteesin testaamiseen. Suolistomikrobiston koostumuksen ja toiminnan erikoisanalyysit tehtiin tutkimusten palveluyksiköissä, jotka vastasivat myös tutkimusaineiston bioinformatiikka-analyyseistä.

Tutkimuksen keskeisin havainto oli, että verenpainetautia perinnöllisesti sairastavien SHR-rottien suolistomikrobiston koostumus erosi merkittävästi normaalipaineisten WKY-verrokkien suolistomikrobiston koostumuksesta, vaikka koe-eläimet söivät tarkalleen samaa ravintoa. Tutkimuksessa havaittiin yhteensä yli 2 640 erilaista taksonomista yksikköä, joista 100:lla todettiin tilastollisesti merkitseviä eroja verenpainetautia sairastavien ja normaalipaineisten koe-eläinkantojen välillä. Lisäksi tarkemmissa tutkimuksissa havaittiin, että suolistomikrobiston dysbioosin merkinä yleisesti käytetty *Firmicutes* / *Bacteroidetes* -suhde oli koholla myös tutkimuksen verenpaineen kokeellisessa tautimallissa, samoin suolistomikrobiston monimuotoisuus oli vähentynyt verenpainetaudin yhteydessä (julkaisematon havainto). Lisäksi ”Proof-of-Concept”-tutkimuksessa osoitettiin, että ulostesiirteet verenpainetautia sairastavilta koe-eläimiltä kohottivat mikrobivapaiden hiirien systolista verenpainetta merkittävästi

enemmän kuin normaalipaineisilta verrokeilta saadut ulostesiirteet. Tulokset viittaavat vahvasti siihen, että suolistomikrobeilla ja niiden muodostamilla metaboliiteilla on keskeinen rooli verenpainetaudin kehittymisessä. Kaiken kaikkiaan tutkimustulokset tukevat näin aiemmin kirjallisuudessa esitettyjä havaintoja suolistomikrobiston ja verenpainetaudin välisistä yhteyksistä (31,32,34).

Muutokset suolistomikrobiston koostumuksessa oletetaan heijastuvan niiden toimintaan ja kykyyn muodostaa erilaisia aineenvaihduntatuotteita. Osa näistä suolistomikrobi-peräisistä metaboliiteista toimivat energianlähteinä paikallisesti suoliston epiteelisoluille, osa suolistoepiteelistä läpi päässeistä metaboliiteista aktivoi suoliston seinämän tulehdussoluja sekä elimistön tulehdusreaktiota, ja lisäksi osa metaboliiteista imeytyy suolistosta systeemiseen verenkiertoon. Verenpainetautia sairastavien koe-eläinten seerumissa eräiden metaboliittien pitoisuudet olivat merkittävästi korkeammat normaalipaineisiin koe-eläimiin verrattuna. Havainto viittaa vahvasti siihen, että metaboliittien muodostuminen on lisääntynyt suolistossa ja/tai metaboliittien läpäisevyys suoliston seinämästä on lisääntynyt verenpainetaudissa. Yksi mielenkiintoisimmasta havaituista metaboliiteista oli fenyyliasetyyliiglysiini. Sen pitoisuudet olivat merkittävästi koholla verenpainetautia sairastavilla koe-eläimillä normaalipaineisiin verrokkeihin nähden. Lisäksi runsassuolainen ravinto aikaansai merkittävän pitoisuuksien kohoamisen molemmilla koe-eläinkannoilla. Koe-eläinten fenyyliasetyyliiglysiini vastaa ihmisellä PAG:ta, joka on kliinisissä tutkimuksissa liitetty vakavien sydäntautitapahtumien ja sydänkuolemien lisääntyneeseen riskiin (44). Verenpainetautia sairastavilla koe-eläimillä havaittiin myös tryptofaanien aineenvaihduntatuotteiden kohonneita pitoisuuksia niin indoliini- kuin kynureniini-aineenvaihduntareiteissä. Tryptofaanien aineenvaihduntatuotteista osa, kuten indoksyylisulfaatti, on tunnettuja ureemisiä toksineja, joilla on tutkimuksissa havaittu yhteyksiä lisääntyneeseen inflammaatioon, verisuonten tukkeutumiseen ja oksidatiiviseen stressiin. Erityisesti munaisten vajaatoimintapotilailla ureemisten toksiinien on havaittu olevan yhteydessä suurentuneeseen kuolleisuusriskiin sekä suurentuneeseen sydän- ja verisuonitautien päätapahtumariskiin. (51)

Runsaan suolan saannin on osoitettu kohottavan verenpainetta. Yksi keskeisimpiä verenpainetaudin lääkkeettömiä hoitokeinoja on suolan saannin vähentäminen lähtötasosta noin viiteen grammaan vuorokaudessa. (52) Tämän tutkimuksen toisena päätavoitteena oli selvittää, aiheuttaako runsas suolan saanti muutoksia verenpaineen lisäksi suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan. Tutkimus vahvisti jo aiemmin tehdyn havainnon SHR-rottien suolaherkkydestä. Sen sijaan WKY-rottien verenpaine ei kohonnut merkittävästi tutkimuksen seuranta-aikana, joka tukee aikaisempia havaintoja tämän mallin suolaresistenttiydestä. Huomioitava on kuitenkin, ettei verenpaineen mittauksessa käytetty häntämittari-menetelmä ole tarpeeksi herkkä pienien verenpainemuutosten havaitsemiseen. Tutkimuksen kestoa voidaan pitää riittävänä suolan verenpainevaikutusten arvioimiseksi, koska aikaisemmissa kliinisissä ja kokeellisissa tutkimuksissa yli neljän viikon seuranta-ajan jälkeen elimistön katsotaan tottuneen uuteen suolan saantitasoon, jolloin suolan hemodynaamisia vaikutuksia voidaan arvioida luotettavasti (52). Tutkimuksessa osoitettiin, että runsas suolan saanti aiheutti muutoksia suolistomikrobiston koostumukseen sekä verenpainetautia sairastavilla että normaalipaineisilla koe-eläimillä. Mielenkiintoinen havainto oli, että normaalipaineisilla koe-eläimillä suolistomikrobiston koostumus muuttui määrällisesti enemmän, kun taas verenpainetauti sairastavien koe-eläinten kyky muuttaa suolistomikrobiston koostumusta oli vähäinen. Havainto viittaa siihen, että suolistomikrobisto saattaa toimia eräänlaisena puskurimekanismina, joka toiminnallaan estää runsaaseen suolan käyttöön liittyviä haitallisia vaikutuksia. Käsitystä tukee havainto siitä, että runsassuolainen ravinto aiheutti huomattavat muutokset lukuisten metaboliittien veripitoisuuksissa normaalipaineisilla koe-eläimillä, kun taas verenpainetautia sairastavilla koe-eläimillä muutokset olivat määrällisesti ja laadullisesti vähäisemmät. Suolaresistenteillä koe-eläimillä havaittiin merkittäviä muutoksia erityisesti sekundaaristen sappihappojen määrissä, joiden tiedetään osallistuvan muun muassa verenpaineen pitkäaikaissäätelyyn.

## 7 Johtopäätökset

Kaiken kaikkiaan tutkimustulokset osoittavat, että verenpainetauti ja runsassuolainen ravinto aiheuttavat merkittäviä muutoksia suolistomikrobiston koostumukseen ja toimintaan. Suolan yhteys sydän- ja verisuonitauteihin, erityisesti kohonneeseen verenpaineeseen, on entuudestaan tunnettu (4). Tästä huolimatta liian moni suomalainen saa ravinnosta liikaa suolaa, harva liian vähän. Tietoisen suolan käytön vähentämisen lisäksi ravintotottumusten muokkaaminen terveellisemmiksi tuo merkittäviä terveyshyötyjä. Viime vuosien kasvispainotteisen ravinnon suosio sekä lisääntynyt tarjonta edesauttavat terveellisempien valintojen tekemisessä, muun muassa Meilahden kampusravintola UniCafe lopetti kokonaan naudanlihan käytön. Hankalaa on kuitenkin puuttua ruokakulttuuriimme, jossa ihmiset tavoittelevat mahdollisimman nopeaa ja helppoa ruokaa. Tämä johtaa muun muassa einesten runsaaseen käyttöön, ja harvoin aktiivisesti tiedostetaan ”piilosuolan” ja sen aiheuttamien terveyshaittojen olemassaoloa.

Suolistomikrobiston analysointi tarjoaa tulevaisuudessa entistä enemmän tietoa potilaan terveydestä. Myös menetelmät tulevat kehittymään, ja niiden käyttökustannukset laskevat. Tulevaisuuden vastaanotoilla analysoidaan mahdollisesti verinäytteiden ohella ulostenäytteitä. Kliinisissä tutkimuksissa on osoitettu, että varhaisilla interventioilla voidaan taata vastasyntyneiden suolistomikrobiston ja immuunijärjestelmän normaali kehitys, jolloin ennaltaehkäistään autoimmuunisairauksien, kuten insuliinipuutosdiabeteksen ja tulehduksellisten suolistosairauksien, kehittymistä. (53)

Tämän tutkielman perusteella suolistomikrobit ja niiden muodostamat metaboliitit voisivat olla lupaavia lääkekehityksen kohdemolekyylejä kehitettäessä uusia hoitoja sydän- ja verisuonitautien ennaltaehkäisyyn ja hoitoon. Elimistöön minimaalisesti vaikuttavat lääkehoidot saattavat nousta keskeiseen asemaan tulevaisuudessa, jolloin kilpajuoksu resistenttien patogeenisten mikrobikantojen kehityksen kanssa voi kääntyä lääketieteen voitoksi.

## Lähdeluettelo

1. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan;133(4):e38-360.
2. Tilastokeskus - Tilastot aiheittain - Kuolemansyyt [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <http://www.tilastokeskus.fi/til/ksyyt/2018/index.html>
3. Mikä on aivoverenkiertohäiriö (AVH)? | Aivoliitto [Internet]. [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://www.aivoliitto.fi/aivoverenkiertohairio/faktat/>
4. Airaksinen J, Aalto-Setälä K, Hartikainen J, Huikuri H, Laine M, Lommi J, et al. *Kardiologia*. Third. Helsinki: Duodecim; 2016.
5. Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, Sharma A, et al. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet (London, England)*. 2010 Oct;376(9750):1393–400.
6. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):65–80.
7. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res*. 2017 Mar;120(7):1183–96.
8. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar;464(7285):59–65.
9. Salonen A. [Human microbiomes--normal microbiota underlying a growing number of diseases]. *Duodecim*. 2013;129(22):2341–8.
10. Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nat Med*. 2016 Jul;22(7):713–22.
11. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JMJ, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, et al. Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*. 2015 Jan;17(1):72–84.
12. Lynch S V, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2016 Dec;375(24):2369–79.

13. Brown JM, Hazen SL. The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annu Rev Med*. 2015;66:343–59.
14. Yang X, Xie L, Li Y, Wei C. More than 9,000,000 unique genes in human gut bacterial community: estimating gene numbers inside a human body. *PLoS One*. 2009 Jun;4(6):e6074.
15. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):834–41.
16. Patnode ML, Beller ZW, Han ND, Cheng J, Peters SL, Terrapon N, et al. Interspecies Competition Impacts Targeted Manipulation of Human Gut Bacteria by Fiber-Derived Glycans. *Cell*. 2019 Sep;179(1):59-73.e13.
17. Tang WHW, Li DY, Hazen SL. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):137–54.
18. Peschel T, Schönauer M, Thiele H, Anker SD, Schuler G, Niebauer J. Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2003 Oct;5(5):609–14.
19. Hug H, Mohajeri MH, La Fata G. Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*. 2018 Feb;10(2).
20. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000 Dec;102(25):3060–7.
21. Pastori D, Carnevale R, Nocella C, Novo M, Santulli M, Cammisotto V, et al. Gut-Derived Serum Lipopolysaccharide is Associated With Enhanced Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation: Effect of Adherence to Mediterranean Diet. *J Am Heart Assoc*. 2017 Jun;6(6).
22. Lawler PR, Bhatt DL, Godoy LC, Lüscher TF, Bonow RO, Verma S, et al. Targeting cardiovascular inflammation: next steps in clinical translation. *Eur Heart J*. 2020 Mar;
23. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017 Sep;377(12):1119–31.
24. Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease.

- Circ Res. 2020 Jul;127(4):553–70.
25. Färkkilä M, Isoniemi H, Heikkinen M, Puolakkainen P. Gastroenterologia ja hepatologia. Third. Helsinki: Duodecim; 2013.
  26. Inagaki T, Moschetta A, Lee Y-K, Peng L, Zhao G, Downes M, et al. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar;103(10):3920–5.
  27. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. J Lipid Res. 2009 Aug;50(8):1509–20.
  28. Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D, Ferrannini E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids. Diabetes. 2013 Dec;62(12):4184–91.
  29. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. Gut Microbes. 2016 May;7(3):189–200.
  30. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. Cell. 2016 Jun;165(6):1332–45.
  31. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar;110(11):4410–5.
  32. Natarajan N, Hori D, Flavahan S, Steppan J, Flavahan NA, Berkowitz DE, et al. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. Physiol Genomics. 2016 Nov;48(11):826–34.
  33. Poll B, Steppan J, Lester L, Berkowitz D, Pluznick J. A short chain fatty acid produced by the gut microbiota plays a role in blood pressure regulation and cardiac contractility. FASEB J [Internet]. 2019;33(S1):569.19-569.19. Available from: [https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1\\_supplement.569.19](https://doi.org/10.1096/fasebj.2019.33.1_supplement.569.19)
  34. Marques FZ, Nelson E, Chu P-Y, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, et al. High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive

- Mice. *Circulation*. 2017 Mar;135(10):964–77.
35. Cho I, Yamanishi S, Cox L, Methé BA, Zavadil J, Li K, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012 Aug;488(7413):621–6.
  36. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011 Apr;472(7341):57–63.
  37. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May;19(5):576–85.
  38. Craciun S, Balskus EP. Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glycy radical enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec;109(52):21307–12.
  39. Tang WHW, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatsuma-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2015 Jan;116(3):448–55.
  40. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 2016 Mar;165(1):111–24.
  41. Cheng X, Qiu X, Liu Y, Yuan C, Yang X. Trimethylamine N-oxide promotes tissue factor expression and activity in vascular endothelial cells: A new link between trimethylamine N-oxide and atherosclerotic thrombosis. *Thromb Res*. 2019 May;177:110–6.
  42. Zhu W, Wang Z, Tang WHW, Hazen SL. Gut Microbe-Generated Trimethylamine N-Oxide From Dietary Choline Is Prothrombotic in Subjects. Vol. 135, *Circulation*. 2017. p. 1671–3.
  43. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *J Am Heart Assoc*. 2016 Feb;5(2).
  44. Nemet I, Saha PP, Gupta N, Zhu W, Romano KA, Skye SM, et al. A Cardiovascular Disease-Linked Gut Microbial Metabolite Acts via Adrenergic Receptors. *Cell*.












- 2020 Mar;180(5):862-877.e22.
45. Maier L, Pruteanu M, Kuhn M, Zeller G, Telzerow A, Anderson EE, et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. *Nature*. 2018 Mar;555(7698):623–8.
  46. Arkkila P, Mattila E, Anttila V-J. [Fecal transfusion as treatment of *Clostridium difficile* infection]. *Duodecim*. 2013;129(16):1671–9.
  47. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, et al. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell*. 2015 Dec;163(7):1585–95.
  48. Roberts AB, Gu X, Buffa JA, Hurd AG, Wang Z, Zhu W, et al. Development of a gut microbe-targeted nonlethal therapeutic to inhibit thrombosis potential. *Nat Med*. 2018 Sep;24(9):1407–17.
  49. Whelton SP, Hyre AD, Pedersen B, Yi Y, Whelton PK, He J. Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials. *J Hypertens*. 2005 Mar;23(3):475–81.
  50. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens*. 2008 Dec;21(12):1288–91.
  51. Sallée M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins (Basel)*. 2014 Mar;6(3):934–49.
  52. Kohonnut verenpaine. Kohonnut verenpaine Käypä hoito -suositus Suom Lääkäriseuran Duodecimin ja Suom Verenpaineystö ry:n asettama työryhmä Helsinki Suom Lääkäris Duodecim, 2020 (viitattu 26102020) Saatavilla Internetissä [www.käypähoito.fi](http://www.käypähoito.fi).
  53. Korpela K, Helve O, Kolho K-L, Saisto T, Skogberg K, Dikareva E, et al. Maternal Fecal Microbiota Transplantation in Cesarean-Born Infants Rapidly Restores Normal Gut Microbial Development: A Proof-of-Concept Study. *Cell*. 2020 Sep;

## Liitteet

## Genomic DNA from stool samples

## Protocol at a glance (Rev.02)

NucleoSpin® DNA Stool		
<b>1 Prepare sample</b>		MN Bead Tube Type A 180–220 mg sample material 850 µL ST1, shake horizontally 2–3 s
<b>2 Lyse sample</b>		70 °C, 5 min Vortex 10 min at RT using MN Bead Tube Holder on Vortex-Genie® 2 at max. speed
<b>3 Precipitate contaminants</b>		13,000 x g, 3 min Transfer 600 µL supernatant 100 µL ST2 Vortex 5 s 5 min, 2–8 °C 13,000 x g, 3 min
<b>4 Filter lysate</b>		Transfer 550 µL cleared lysate on NucleoSpin® Inhibitor Removal Column 13,000 x g, 1 min
<b>5 Adjust binding conditions</b>		200 µL ST3 Vortex 5 s
<b>6 Bind DNA</b>		Load 700 µL sample on NucleoSpin® DNA Stool Column 13,000 x g, 1 min
<b>7 Wash silica membrane</b>		<b>1<sup>st</sup></b> 600 µL ST3 13,000 x g, 1 min <b>2<sup>nd</sup></b> 550 µL ST4 13,000 x g, 1 min <b>3<sup>rd</sup></b> 700 µL ST5 Vortex 2 s 13,000 x g, 1 min <b>4<sup>th</sup></b> 700 µL ST5 13,000 x g, 1 min
<b>8 Dry silica membrane</b>		13,000 x g, 2 min
<b>9 Elute DNA</b>		30–100 µL SE 13,000 x g, 1 min Vortex 2 s