



Kandidaatintutkielma

Mustikan (*Vaccinium myrtillus*) antosyaanit ja niiden  
terveysvaikutukset

Ella Aitta

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta  
2016

# Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

## I KIRJALLISUUSTUTKIELMA

1. Funktionaaliset elintarvikkeet	1
2. Mustikan funktionaaliset yhdisteet	4
2.1. Polyfenolit	5
2.1.1. Flavonoidit	5
2.1.1.1. Antosyaanit	6
2.1.2. Muut polyfenolit	9
2.2. Vitamiinit	9
3. Mustikan antosyaanien terveysvaikutukset	10
3.1. Ikääntyminen ja muistisairaudet	12
3.2. Masennus	13
3.3. Metabolinen oireyhtymä	13
3.3.1. Diabetes	14
3.3.2. Verenpaine ja verisuonitaudit	15
3.4. Näkö	16
3.5. Suolisto	18
3.6. Syöpä	19
4. Muiden funktionaalisten yhdisteiden terveysvaikutukset	21
5. Johtopäätökset	22
6. Kirjallisuusviitteet	23

## II liite: TIEDETTÄ POPULARISOIVA ESITYS

Otsikko: Mustikan (*Vaccinium myrtillus*) antosyaanit ja niiden terveysvaikutuksia

Toteutus: posterit

## Käytetyt lyhenteet

APC	adenomatous polyposis coli
APP	amyloidiprekursoriproteiini
ARBE	antocyanin rich bilberry extract
BB	bilberry l. mustikka
dw	dry weight, kuivapaino
fw	fresh weight, tuorepaino
IFN	interferoni
IL	interleukiini
KLL	krooninen lymfaattinen leukemia
LPS	lipopolysakkaridi
RGC	retinal ganglion cell l. verkkokalvon gangliosolu
ROS	reactive oxygen species l. vapaat radikaalit
SIN-1	3-(4-morpholinyyl) sydnonimine hydrochloride
SOD	superoksididismutaasi
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances

## 1. Funktionaaliset elintarvikkeet

Funktionaaliset elintarvikkeet ovat terveydelle hyödyllisiä aineita sisältäviä elintarvikkeita. Funktionaalisille elintarvikkeille ei ole virallista määritelmää, ja joidenkin mielestä mikä tahansa ravinteita sisältävä ruoka on funktionaalinen. Yleisesti funktionaaliseksi elintarvikkeeksi käsitetään kuitenkin elintarvike, jolla on selkeästi muitakin terveydelle hyödyllisiä ainesosia, kuin tavallisia ravinteita. Monet hedelmät, marjat, viljat, kala ja maito- sekä lihatuotteet sisältävät terveydelle hyödyllisiä ainesosia, kuten esimerkiksi lykopeenia, omega-3-rasvahappoja tai saponiineja. Monien määritelmien mukaan funktionaalisen elintarvikkeen pitäisi olla ”perinteistä ruokaa” ja osa tavallista ruokavaliota, eikä esimerkiksi lisäravinne. FUFOS (EC Concerted Action on Functional Food Science in Europe) on määritellyt funktionaalisen elintarvikkeen seuraavasti: “Funktionaalinen elintarvike vaikuttaa yhteen tai useampaan elimistön kohdetoimintoon riittävää ravitsemusta enemmän, joko parantamalla terveyttä ja hyvinvointia ja/tai vähentämällä sairastumisen riskiä. Se on osa tavallista ruokavaliota eikä se siis ole pilleri, kapseli tai minkäänlainen lisäravinne” (Publ. Off. of the Europ. Union (2010).

Mustikka (*Vaccinium myrtillus L.*) on *Vaccinium*-sukuun kuuluva kasvi, joka kasvaa Euroopan, Aasian ja Pohjois-Amerikan pohjoisosissa. *Vaccinium*-sukuun kuuluu mustikan lisäksi muun muassa karpalo ja kanadanmustikka. Mustikka kasvaa tuoreissa ja kuivissa kangasmetsissä, korvessa sekä tunturikankailla. Kasvi kasvaa 10-40 cm korkeaksi ja sen tuottamat marjat ovat syötäviä. Mustikan kukinta-aika on toukokuusta heinäkuuhun, jonka jälkeen se tuottaa lähes mustan värisiä marjoja, joita kuitenkin yleensä peittää vaaleanharmaa tai sininen vahamainen pinta.

Mustikka sisältää paljon terveydelle hyödyllisiä hivenaineita, vitamiineja ja antioksidantteja, minkä vuoksi sitä voidaan pitää funktionaalisen elintarvikkeenä. Mustikan sisältämiä hivenaineita ovat esimerkiksi kalsium, kalium, magnesium, fosfori, rauta ja sinkki. Se sisältää myös runsaasti eri vitamiineja, kuten A-, B1-, B2-, B6-, B12-, C-, D-, E-, ja K-vitamiineja, niasiinia sekä folaattia (Fineli, 2016). Lisäksi mustikassa on paljon erilaisia fenolisia yhdisteitä, joista monet ovat antioksidantteja. Mustikan terveyshyötyjä tutkitaan paljon, ja tutkimuksia on tehty esimerkiksi marjan yhdisteiden vaikutuksista aivoihin, diabetekseen, näköön, sydän- ja verisuonitauteihin, suoliston toimintaa sekä syöpään.

Iso osa mustikan terveyshyödyistä on liitetty fenoleihin kuuluviin antosyaaneihin, joilla on antioksidanttisten vaikutusten lisäksi muunlaisiakin vaikutusmekanismeja, kuten

solusignalointiin, geeniekspressioon, DNA:n korjausmekanismeihin ja soluadheesioon liittyviä toimintoja (Chu *et al.* 2011). Antosyaaneilla on osoitettu olevan mm. soluja suojaavia, antimikrobisia, syöpää estäviä, hermostoa suojaavia sekä lihavuutta ehkäiseviä vaikutuksia. Tämän tutkielman tarkoituksena on koota yhteen tämänhetkistä tietämystä antosyaanin rakenteesta, toimintamekanismeista sekä terveysvaikutuksista.

## **2. Mustikan funktionaaliset yhdisteet**

### **2.1. Polyfenolit**

Polyfenolit ovat joukko yhdisteitä, joita esiintyy kaikissa putkilokasveissa. Niissä on vähintään yksi fenoliryhmä, johon on yleensä liittynyt sokeriryhmiä tai orgaanisia happoja. Polyfenolit voidaan luokitella fenolihappoihin, flavonoideihin, lignaaneihin, stilbeeneihin ja tanniineihin rakenteensa perusteella. Niitä on runsaasti etenkin teessä, viinirypäleissä ja viinissä, oliiviöljyssä, kahvissa, suklaassa sekä marjoissa ja hedelmissä. Polyfenoleilla on antioksidanttisia ja tulehdusta vähentäviä vaikutuksia ja sydän- ja verisuonitauteja sekä hermostoa suojaavia ominaisuuksia. Polyfenoleiden on myös tutkittu inhiboivan joidenkin bakteerien, virusten ja sienten kasvua, hidastavan tai estävän syöpäkasvainten kasvua ja säätelevän proteiinien ekspressiota ja toimintaa. Edellämainitut hyödyt ovat käyneet ilmi lukuisissa eri tutkimuksissa *in vitro* mutta polyfenolit ovat herkkiä ympäristön vaikutuksille, kuten lämmölle, valolle ja pH:lle. Ne ovat myös huonosti veteenliukenevia vapaina yhdisteinä ja ihmiselimistö metaboloii polyfenolit nopeasti (Watson *et al.* 2014). Kähkönen *et al.* (2001) määrityksen mukaan mustikka sisältää fenolisia yhdisteitä yhteensä 3,3-3,8 g/100g dw riippuen kasvupaikasta.

#### **2.1.1. Flavonoidit**

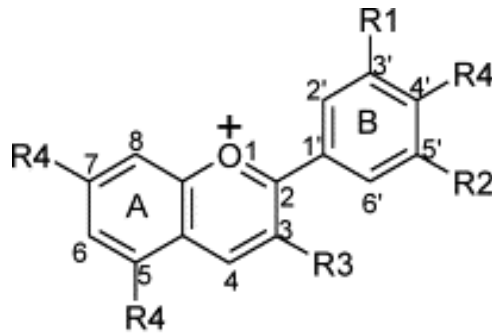
Flavonoidit ovat fenolisia yhdisteitä, jotka muodostuvat kahdesta bentseenirenkaasta ja niitä yhdistävästä heterosyklisestä pyronirenkaasta. Ne luokitellaan rakenteensa perusteella flavonoleihin, flavoneihin, flavanoneihin, flavanoleihin (katekiinit), isoflavonoideihin sekä antosyanidiineihin. Proantosyanidit eli kondensoituneet tanniinit ovat oligomeerisiä flavanoleja ja niillä ei ole sokeriryhmää. Proantosyanidin depolymerisaatio hapettavissa olosuhteissa tuottaa antosyanidiineja. Flavonoideilla on kasveissa useita rooleja, kuten toimia solujen tukimateriaalina, aikaansaada kirkkaita värejä, joiden tehtävä on houkuttaa lintuja ja suojella

UV-säteilyltä (Riihinen *et al.* 2008). Mustikassa yleisimpiä flavonoideja antosyaanien lisäksi ovat flavonoleihin kuuluvat kversetiini (243 µg/100g dw), rutiini (52 µg/100 g dw) ja myrisetiini (41 µg/100g dw) (Tumbas Šaponjac *et al.* 2015). Kversetiinin ja myrisetiinin pitoisuuksiksi on määritetty Häkkinen *et al.* (1999) tutkimuksessa 2,9 ja 1,4 mg/100g tuorepainosta.

#### 2.1.1.1. Antosyaanit

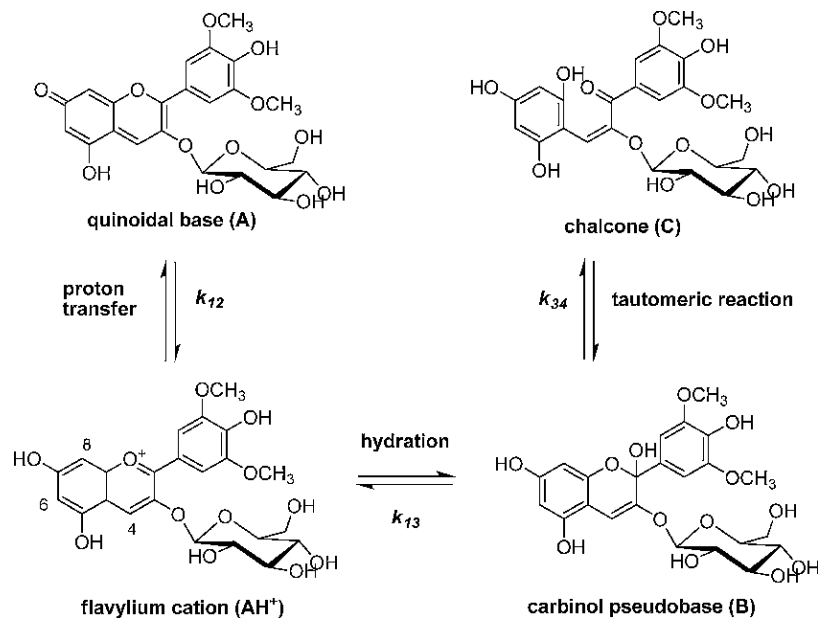
Antosyaanit ovat vesiliukoisia flavonoideihin kuuluvia pigmenttejä, jotka koostuvat sokeriosasta eli glykonista sekä antosyanidiksi kutsutusta flavonoidiosasta. Antosyaanit ovat 2-fenyylibentsopyriliumin tai flavyliumsuolojen polyhydroksi- ja polymetoksijohdannaisten glykosidejä. Sokeriosa voi olla glukoosi, galaktoosi, ksyloosi, arabinoosi tai ramnoosi mutta mustikassa glykoni voi olla vain glukoosi, galaktoosi tai arabinoosi. Sokeriryhmä voi liittyä antosyanidin C3, C5 tai C7 kohtaan (Kuva 1) mutta C3-glykosylaatio on näistä kuitenkin yleisin. Kuusi yleisintä antosyanidia kasvien syötävissä osissa ovat syanidiini (Cy, 50 %), pelargonidiini (Pg, 12 %), peonidiini (Pn, 12 %), delfinidiini (Dp, 12 %), petunidiini (Pt, 7 %) sekä malvidiini (Mv, 7 %), joista mustikassa esiintyy kaikkia pelargonidiinia lukuun ottamatta. Neljä yleisintä antosyanidiglykosidiryhmää puolestaan ovat 3-monosidit, 3-biosidit, 2,5-diglykosidit sekä 3,7-diglykosidit, joista 3-glykosidejä esiintyy kaksi ja puoli kertaa enemmän kuin 3,5-diglykosideja. Syanidiini-3-glukosidi on siis yleisimmin esiintyvä antosyaani (Kong *et al.* 2003, Matsunaga *et al.* 2009, Smeriglio *et al.* 2014)

Antosyanidit koostuvat kolmesta rengasrakenteesta – kahdesta bentseenirenkaasta (A ja B) ja niiden väliin jäävästä happiatomin sisältävästä pyraanirenkaasta (Kuva 1). Antosyaanien rungon rakennetta kuvataan kaavalla C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>. R1-hiileen voi liittyä joko vety tai metyyliiryhmä, R2-hiileen puolestaan vety, hydroksi- tai metoksiryhmä ja R3-hiileen glykoni 3-glykosididisidoksella. Näin ollen mustikassa voi olla 15 erilaista antosyaania (Matsunaga *et al.* 2009).



**Kuva 1.** Antosyanidin rakenne. R1-hiileen voi liittyä vety tai metyyyliryhmä, R2-hiileen vety, hydroksi- tai metoksiyhmä ja R3-hiileen glykoni eli sokeriryhmä. Glykoni voi olla mustikassa glukoosi, galaktoosi tai arabiinose. R1-, R2- ja R3-hiiliin liittyneet ryhmät määrittävät antosyaanin. Kuvan lähde: (Kong *et al.* (2003)). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

Antosyaanit saavat kasveissa, kukissa ja marjoissa aikaan violetteja, sinisiä ja punaisia värejä, jotka ovat riippuvaisia pH:sta. Väri voi hiukan vaihdella riippuen antosyanidiin liittyneestä glykonista. Antosyanidit voivat esiintyä liuoksessa neljässä eri muodossa; quinoidal base, flavyliumkationi, hemiasetal base (carbinol pseudo-base) ja chalcone. Punaisen värin antava flavyliumkationimuoto vallitsee, kun pH on 1-3. PH:n kohotessa flavyliumkationi menettää protonin, muodostaen sinisen quinoidalemäksen. Flavyliumkationin hydraus puolestaan muodostaa värittömän carbinol pseudo-base:n, joka voi teutomerisoitua keltaiseksi chalcone:ksi hiilirenkaan avautuessa (Kuva 2) (Watson *et al.* 2014).



**Kuva 2.** Antosyaanin muodot eri pH-tasapainotiloissa. Mallina on käytetty malvidiini-3-O-glukosidia. Kuvan lähde: Willemse *et al.* (2013). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

Riihinen *et al.* (2008) määrittivät tutkimuksessaan mustikan antosyaanipitoisuudeksi 21,2 mg/g dw, josta 95 % sijaitsi mustikan kuorella ja loput hedelmälihassa. Näin ollen mustikan kuoresta jopa 2 % on antosyaaneja. Lähti *et al.* (2008) tutkivat Suomessa kasvavien mustikoiden antosyaanien pitoisuuseroja etelä-pohjoisakselilla ja heidän määrityksensä mukaan mustikan keskimääräinen antosyaanipitoisuus oli tai 28,8 mg/g dw, joka käy yhteen Riihinen *et al.* (2008) määrittämän pitoisuuden kanssa. Tutkimuksessa selvisi myös, että pohjoisessa kasvavien mustikoiden antosyaanipitoisuus oli korkeampi kuin etelässä ja lisäksi pohjoisen mustikoissa vallitseva antosyanidiini oli delfinidiini, kun taas etelässä se oli syanidiini. Toisessa tutkimuksessa mustikan antosyanidipitoisuudeksi määritettiin 0,6 %, josta syanidiinin osuus oli lähes puolet eli 0,25 % mustikan painosta (Burdulis *et al.* 2009). Kähkönen *et al.* (2001) määrityksen mukaan mustikan antosyaanipitoisuus on n. 23-31 mg/g dw kasvupaikasta riippuen. Mustikan antosyaanien tuorepainoksi on saatu tutkimuksen mukaan n. 300 mg/100g eli 0,3 % mustikan painosta (Prior *et al.* 1998). Yhdysvalloissa antosyaaneja saadaan ruokavaliosta arviolta 180-215 mg/vrk (Zafra-Stone *et al.* 2007) mutta Suomessa antosyaaneja saadaan ruokavaliosta paljon vähemmän keskimäärin 80 mg/vrk 2007 ihmistä kattavan tutkimuksen mukaan (Ovaskainen *et al.* 2008).

Antosyaanien biosynteesin lähtöaineet saadaan asetaatti- ja shikimate-reaktioteiden kautta. Fenyylialaniinista muodostetaan coumaroyl-CoA, joka muodostaa kolmen malonyyli-CoA-molekyylin kanssa buteiinin (tetrahydroxyhalcone) chalconesyntaasin katalysoimassa reaktiossa. Chalcone-isomeraasi muuttaa buteiinin naringiiniksi, joka puolestaan hydroksyloidaan eriodictyoliksi. Sekä naringiini että eriodictyol hydroksyloidaan vastaaviksi dihydroflavonoleikseen, jotka toimivat leukoantosyanidiinien prekursoreina. Antosyanidiinisyntaasi (leukoantosyanidiinidioksygenaasi) katalysoi antosyanidien synteesiä leukoantosyanideista. Koska antosyanideja ja liitettäviä sokeriryhmiä on erilaisia, tarvitaan antosyaanien syntetisoimiseen useita erilaisia entsyymejä. 3-O-glykosylointi on antosyanidien yleisin glykosylointi. Siinä UDP-glukoosi muodostaa sidoksen antosyanidin kanssa flavonoidi-3-glukosyyli transferaasin katalysoimassa reaktiossa (Smeriglio *et al.* 2016).

Bioaktiivisten aineiden hyötyosuus tarkoittaa sitä määrää ainetta, jonka keho pilkkoo, absorboi ja metaboloii. Antosyaanien hyötyosuutta voidaan selvittää esimerkiksi tutkimalla plasman tai virtsan pitoisuuksia niiden nauttimisen jälkeen. Eläinkokeissa antosyaaneja on havaittu verenkierrossa 0,25-2 tunnin päästä niiden syömisestä, ja ne ovat poistuneet elimistöstä virtsan mukana 6-8 tunnin kuluttua. Rotilla tehdyssä kokeessa antosyaanipitoisuus oli plasmassa 2-3 µg/ml 15 minuuttia mustikoiden syömisen (400 mg/kg ruumiinpainosta) jälkeen ja kahden



tunnin päästä antosyaaneja ei ollut enää havaittavissa (Morazzoni *et al.* 1991). Ihmisillä tehdyt tutkimukset ovat antaneet samankaltaisia tuloksia. Stoner *et al.* (2005) huomasivat tutkimuksessaan, että plasman antosyaanipitoisuus oli korkeimmillaan 1-2 tuntia pakastekuivattujen mustavadelmien (45 g) syömisen jälkeen. Suurin määrä antosyaaneja tai niiden metyloituja johdannaisia oli virtsassa 0-4 tuntia kokeen jälkeen, mutta vain 1 % suun kautta nautitusta antosyaanimäärästä oli absorboitu ja eritetty virtsaan. Mustavadelmien antosyaanikoostumus eroaa mustikasta, mutta antosyaanien metabolointi elimistössä on samanlaista.

### **2.1.2. Muut polyfenolit**

Flavonoideihin kuulumattomilla fenolisilla yhdisteillä ei ole tiettyä rakennetta niin kuin flavonoideilla, vaan niihin kuuluvat esim. fenolihapot, stilbeenit, lignaanit, hydrolysoituvat tanniinit, gallotanniinit sekä ellagitanniinit. Fenolihappoihin kuuluvat mm. hydroksikanelihappo, joka voidaan vielä jakaa kofeiinihappoon, ferulihappoon ja kumariinihappoon sekä hydroksibentsoehappo, johon kuuluvat galliinihappo ja vanilliinihappo (Nile & Park 2014). Kähkönen *et al.* (2001) määrittöksen mukaan mustikka sisältää kasvupaikasta riippuen hydroksikanelihappoa 113-231 mg/100g dw ja hydroksibentsoehappoa 3,3-7,2 mg/100g dw. Hydroksikanelihappoihin kuuluvaa p-kumariinihappoa on mustikassa Riihinen *et al.* (2008) määrittöksen mukaan 132 µg/g dw sekä kofeiini- ja ferulihappoja yhteensä 238 µg/g dw. Näiden yhteispitoisuus (370 µg/g tai 37 mg/100g) on paljon alhaisempi kuin Kähkönen *et al.* (2001) tutkimuksessa havaittu hydroksikanelihapon arvo.

## **2.2. Vitamiinit**

C-vitamiini eli askorbiinihappo on yleisin vitamiini mustikassa ja sen pitoisuus täysin kypsässä marjassa on tutkimuksista riippuen 6 mg/100g fw (n. 50 mg/100g dw) (Cocetta *et al.* 2012) tai 26 mg/100g fw (Milivojevic *et al.* 2012). C-vitamiini on voimakas antioksidantti, jonka vuoksi se voi alentaa riskiä sairastua erilaisiin kroonisiin ja ikääntymiseen liittyviin sairauksiin. E-vitamiinia eli  $\alpha$ -tokoferolia on mustikassa vitamiineista toiseksi eniten; 1,9 mg/100g (Fineli 2016). E-vitamiini on askorbiinihapon tapaan antioksidantti, ja osa mustikan terveyshyödyistä voidaankin selittää vitamiinien antioksidanttisilla vaikutuksilla. Vitamiinien pitoisuudet ovat kuitenkin paljon alhaisemmat kuin antosyaanien pitoisuus (300 mg/100g fw). Kuten polyfenolienkin kohdalla, mustikan vitamiinipitoisuudet voivat vaihdella suuresti kasvupaikasta, kypsyystasosta, säilönnästä ja käsittelystä riippuen (Cocetta *et al.* 2012).

### 3. Mustikan antosyaanien terveysvaikutukset

Mustikan antosyaanien terveysvaikutusten uskotaan pohjautuvan pitkälti vapaiden radikaalien (ROS, reactive oxygen species) aiheuttamien vahinkojen estämiseen. Vapaita radikaaleja syntyy esimerkiksi mitokondriossa oksidatiivisen fosforylaation sivutuotteina. Vapaat radikaalit aiheuttavat soluissa laajaa vahinkoa esimerkiksi vahingoittamalla proteiineja, lipidejä ja DNA:ta ja niiden aiheuttamat vahingot ovat yhteydessä useisiin tauteihin sekä vanhenemiseen (Wang *et al.* 1996). Antioksidantit estävät muiden molekyylien hapettumisen reagoimalla vapaiden radikaalien kanssa. Hyvin tunnettuja antioksidantteja ovat esimerkiksi askorbiinihappo eli C-vitamiini, A- ja E-vitamiinit sekä monet polyfenolit, kuten antosyaanit.

Reaktiivisia happiradikaaleja ovat mm. superoksidianioni ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), hydroksyyliiradikaali ( $\bullet\text{OH}$ ) ja vetyperoksidi ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Vapaa radikaali on käytännössä mikä tahansa yhdiste, jolla on yksi tai useampi pariutumaton elektroni. Suurin osa eukaryoottisolujen happiradikaaleista muodostuu mitokondrion hengitysketjussa, rasvahappojen aineenvaihdunnassa sekä flavoproteiinioksidaasien ja mikrosomaalisten sytokromi P450-entsyymien katalysoimien reaktioiden tuotteina. Elimistössä muodostuu myös typpioksidiradikaaleja ( $\text{NO}$ ), jotka reagoidessaan muiden ROS-yhdisteiden kanssa voivat muodostaa reaktiivista peroksinitriittiä ( $\text{ONOO}^-$ ). Näitä typpiyhdisteitä kutsutaan reaktiivisiksi typpiradikaaleiksi (RNS, reactive nitrogen species).  $\text{NO}$  muodostuu sivutuotteena nisäkässoluissa L-arginiinin hapettuessa sitrulliiniksi typpioksidisyntaasin katalysoimassa reaktiossa. Toisin kuin happiradikaalit, typpioksidi on melko stabiili (biologinen puoliintumisaika sekunteja) eikä se reagoi niin usean biomolekyylin kanssa.  $\text{NO}$  reagoi kuitenkin erityisesti hemiä sisältävien proteiinien kanssa. Elimistö altistuu oksidatiiviselle stressille, kun vapaiden hapettavien radikaalien eli oksidanttien sekä antioksidanttien määrät ovat epätasapainossa. Soluilla on runsaasti sisäänrakennettuja puolustuskeinoja vapaita radikaaleja vastaan, kuten entsyymit superoksididismutaasi, katalaasi ja glutationiperoksidaasi (Castro & Freeman 2001).

Antosyaanien tehokkuus vapaiden radikaalien estämiseen perustuu antosyanidin rakenteeseen. Bentseenirenkaassa B (Kuva 1) olevat hydroksyyliiryhmät sekä pyriinirenkaan hydroksyyliiryhmä voivat luovuttaa vetyatomien superoksidi-anionille ja muille hydroksyyliiradikaaleille. Antosyanidien on raportoitu estävän vapaita radikaaleja tehokkaammin kuin niitä vastaavien glykosyloitujen antosyaanien ja lisäksi sokeriketjun pituuden kasvun on osoitettu heikentävän antioksidanttista tehokkuutta (Wang & Stoner 2008). Antosyaaneilla saattaa olla myös kyky sitoutua DNA:han, ja siten suojella DNA:ta oksidatiiviselta stressiltä. Sarma & Sharma (1999) havaitsivat tutkimuksessaan, että syanidiini

muodosti vasikan kateenkorvan DNA:n kanssa kopigmentaatiokompleksin. Syanidiini ja DNA hapettuivat voimakkaasti, kun niitä altistettiin •OH-radikaalille mutta kompleksimuodossa kumpikaan yhdiste ei kärsinyt hapettumisesta.

Koska vapaille happiradikaaleilla on niin lyhyet puoliintumisajat, on niitä sellaisinaan vaikea havaita. Sen sijaan vapaiden radikaalien hapettamia yhdisteitä voidaan tutkia, ja sitä kautta saada kvantitatiivista tietoa radikaaleista. Eräitä tällaisia yhdisteitä ovat thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), joita muodostuu lipidien peroksidaatiossa eli härskiintymisessä (Rikans & Hornbrook 1997). Nardi *et al.* (2016) tutkivat gojimarjan, mustikan ja karpaloiden antioksidanttisia vaikutuksia hiirillä. Tutkimuksen mukaan mustikoita saaneilla koe-eläimillä TBARS-yhdisteiden määrä maksassa oli 75.3 % vähemmän kontrolliryhmään verrattuna. Toisessa tutkimuksessa mustikkauute inhiboi sytokromi-c:n aiheuttamaa 6-hydroksidopamiinin (6-OHDA) hapettumista. Tulos johtuu suurilta osin mustikkauutteen suurista syanidiini- ja delfinidiinipitoisuuksista mutta myös muilla flavonoideilla, kuten kversetiinillä ja myrisetiinillä on antioksidanttisia vaikutuksia (Yao & Vieira 2007).

Mustikalla on todettu olevan antioksidanttisia vaikutuksia lukuisissa tutkimuksissa. Mustikkauute vähensi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:n muodostusta eristetyissä rotan sydämen mitokondrioissa Trumbeckaite *et al.* (2013) tutkimuksessa. Mustikkauutteilla (1,5 ja 15 µl/1,5 ml) saavutettiin 46 % ja 62 % pienempi vetyperoksidin muodostuminen verrattuna kontrollimitokondrioihin. Toisessa tutkimuksessa 25 % antosyaaneja sisältävä mustikkauute suojeli viljeltyä rotan hepatosyyttejä *tert*-butyylihydroperoksiidin (*t*BH) ja allyylialkoholin aiheuttamalta oksidatiiviselta stressiltä (Valentová *et al.* 2007). *t*BH muodostaa hajotessaan hydroksyyli-, vetyperoksyli- ja alkoksyyli-radikaaleja, jotka aiheuttavat mm. lipidien peroksidaatiota, entsyymien vuotoa solun ulkopuolelle ja solun makromolekyylien alkylaatiota. Allyylialkoholi puolestaan aiheuttaa epäsuorasti lipidien peroksidaatiota. Parhain suojaus oksidatiiviselta stressiltä (58 %) ilmeni, kun mustikkauutteen pitoisuus oli 500 µg/ml ja oksidatiivisen stressin aiheuttaja oli allyylialkoholi mutta myös 100 µg/ml pitoisuus mustikkauutetta riitti suojelemaan soluja. Kokeessa oksidatiivisen stressin indikaattoreina käytettiin laktaattidehydrogenaasin (LDH) ja TBARS-yhdisteiden määriä. Maksa on elimistön aineenvaihdunnan pääelin, joten se altistuu eniten elimistön myrkyllisille vierasaineille tai niiden metaboliiteille. Maksasoluilla eli hepatosyyteillä on myös runsaasti mitokondrioita, joista aiheutuu oksidatiivista stressiä. Hepatosyyttejä käytetäänkin usein aineenvaihduntaan ja toksisuuteen liittyvissä tutkimuksissa (Valentová *et al.* 2007).

### 3.1. Ikääntyminen ja muistisairaudet

Ikääntyessä elimistö kyky korjata soluja ja suojautua tulehduksilta ja oksidatiiviselta stressiltä heikkenee. Yksi tärkeimmistä soluvahinkoja korjaavista proteiineista on saperoni HSP70 (70 kilodalton heat shock protein), joka pystyy korjaamaan vahingoittuneita proteiineja. (Galli *et al.* 2006) tutkivat lyhytaikaisen mustikkakuurin vaikutusta eri ikäisten rottien hippokampusten kykyyn suojautua tulehdukselta. Hippokampukset altistettiin tulehdusreaktiolle lipopolysakkarideilla *in vitro*, ja HSP70-tasot mitattiin 30, 90 ja 240 minuuttia altistuksen jälkeen. Käsittelemättömien hippokampusten HSP70-tasot olivat samat testi- ja kontrolliryhmien välillä mutta LPS-käsittelyn jälkeen vanhempien rottien HSP70-tasot nousivat huomattavasti vähemmän kuin nuorten rottien kaikkina mitattuina ajankohtina. Mustikkakuuri näytti kuitenkin palauttavan HSP70-proteiinin vasteen LPS:lle verrattuna kontrolliryhmään ikääntyneillä rotilla. Suurimmat erot saavutettiin 90 ja 240 minuuttia LPS-käsittelyn jälkeen.

Alzheimerin taudin pääpiirre on  $\beta$ -amyloidin lisääntynyt tuotto, joka johtuu amyloidiprekursoriproteiinin (APP) pilkkoutumisen häiriöstä.  $\beta$ -amyloidit takertuvat yhteen muodostaen plakkeja. Tutkimuksessaan Vepsäläinen *et al.* (2013) tutkivat polyfenolien vaikutuksia hermoston suojaamiseen ja APP:n prosessointiin erilaisissa *in vitro* stressitilanteissa. APP751-proteiinia ylituottavat ihmisen SH-SY5Y-neuroblastoomasolut indusoitiin oksidatiiviselle stressille ja apoptoosille. Menadionin aiheuttama ROS-yhdisteiden tuotto oli selkeästi vähäisempää solunäytteissä, jotka oli käsitelty myrisetiini-, kversetiini- tai antosyaani-pitoisilla uutteilta. Kaspasi-3:n aktivaatiossa, APP:n prosessoinnissa tai  $A\beta$ -pitoisuuksissa ei puolestaan ollut eroa ryhmien välillä soluissa, joissa apoptoosi oli indusoitu staurosporiinilla. Kaspasi-3 on proteaasi, joka pilkkoo APP:n. Tutkimuksessa käytettiin myös transgeenisia AD-hiiriä (ApdE9), joille annettiin antosyaani-pitoista mustikka- tai herukkauutetta. Hiirten aivokuorilla todettiin vähemmän APP:n C-terminaalifragmentteja kontrolliryhmään verrattuna. Liukoisten  $A\beta$ 40- ja  $A\beta$ 42-proteiinifragmenttien tasot olivat huomattavasti alhaisemmat mustikkaryhmällä verrattuna herukkauutetta saaneisiin hiiriin, mutta liukenemattomien proteiinifragmenttien tasot olivat ryhmien välillä käänteiset. Ikääntyneillä APdE9-hiirillä molemmat marjauutteet autoivat spatiaalisen työmuistin alenemassa. Ruokavaliolla ei ollut kuitenkaan vaikutusta tau-proteiinien ekspressioon tai fosforylaatioon (Vepsäläinen *et al.* 2013). Tau-proteiinien kokonaismäärä sekä kohdasta 181 (treoniini) fosforyloitujen tau-proteiinien (p-tau-181) määrä ovat eräitä Alzheimerin taudin biomarkkereita (Kester *et al.* 2009).

### **3.2. Masennus**

Typpioksidi (NO) syntetisoidaan L-arginiinista typpioksidisyntaasin (NOS) katalysoimassa reaktiossa ja se on epätavallinen välittäjäaine elimistössä. NO:lla on tärkeä rooli hermoimpulssin siirtymisessä, synaptisessa plastisuudessa sekä erilaisissa kognitiivisissa, oppimiseen ja tunteisiin liittyvissä toiminnoissa kuten masennuksessa sekä aggressiivisuudessa. Typpioksidisyntaasin inhibitio saattaa olla uusi keino voimistaa serotonergisten masennuslääkkeiden tehoa, sillä masentuneilla potilailla on havaittu kohonnutta nitraattitasoa plasmassa. Nitraatti on typpioksidiaineenvaihdunnan lopputuote. Myös NOS-tasojen väheneminen aivojen hippokampuksissa on aikaansaanut masennuslääkkeiden kaltaisia vaikutuksia. Masentuneilla potilailla onkin huomattu olevan kohonnutta NOS:n ekspressiota hippokampuksissa. Kuten on aiemmin esitetty, NO on myös vapaa radikaali, joka reagoiessaan superoksidianionin kanssa muodostaa peroksinitraattia (Kumar *et al.* 2012).

Kumar *et al.* (2012) tutkivat mustikan vaikutusta hiirillä, joille oli aiheutettu arvaamatonta kroonista lievää stressiä (unpredictable chronic mild stress, UCMS), joka aiheuttaa masennuksenkaltaisia oireita elimistössä. 125, 250 tai 500 mg/kg mustikkauutteita (25-36 % antosyaaneja) annettiin koe-eläimille 21 päivän ajan. Kroonista stressiä aiheutettujen hiirten aivojen TBARS- ja nitriittitasot olivat huomattavasti korkeammat kontrolliryhmään verrattuna. Mustikkauutetta saaneiden stressaantuneiden hiirten TBARS- ja nitriittitasot olivat tutkimuksen mukaan huomattavasti alhaisemmat ja vaikutukset olivat suoraan verrannolliset saatuun annokseen. Stressaantuneilla hiirillä todettiin myös alentuneet SOD- ja katalaasitasot, joita mustikkakäsittely paransi huomattavasti. Mustikkakäsittely paransi hiirillä myös näkyviä masennukseen liittyviä oireita, kuten liikkumattomuutta. Mustikan positiiviset vaikutukset voivat johtua muutoksista L-arginiini-typpioksidi -signalointitiessä.

### **3.3. Metabolinen oireyhtymä**

Metabolinen oireyhtymä on aineenvaihduntahäiriön tila, jossa yhdellä ihmisellä on useita sydän- ja verisuonitautien riskitekijöitä. Keskivartalolihavuus on yksi oireyhtymän merkittävimmistä riskitekijöistä. Lihavuus ja insuliiniresistenssin kehittyminen saattavat olla yhteydessä adiposyyttien eli rasvasolujen häiriöihin. Adiposyyttien päätehtävä elimistössä on toimia energiavarastona, mutta niissä myös syntetisoidaan biologisesti aktiivisia molekyyliä, adiposytokiinejä. Leptiini on eräs rasvasolujen erittämä hormoni, joka vähentää ruokahalua ja

lisää elimistön energiankulutusta. Adiponektiini on eräs toinen adiposyyteissä tuotettu hormoni ja se on kenties tärkein adiposytokiineistä. Adiponektiinin konsentraation ja mRNA:n ekspressiotasojen on havaittu olevan alhaisempia ylipainoisilla ja insuliiniresistenssin omaavilla henkilöillä (Tsuda 2008).

### 3.3.1. Diabetes

Diabetes johtuu insuliinin tuotannon häiriöstä haiman  $\beta$ -soluissa ja yksi sen oireista on kohonnut verensokeri, koska insuliinia ei erity tarpeeksi tai ollenkaan, jolloin solujen kyky ottaa glukoosia sisäänsä heikkenee. Korkealla verensokeripitoisuudella on merkittävä rooli sydän- ja verisuonitautien puhkeamisessa, koska se aiheuttaa mitokondriohäiriöitä ja ROS-yhdisteiden kertymistä (Fiorentino *et al.* 2013). Haiman insuliinia tuottavilla  $\beta$ -soluilla on vain vähän vapaita radikaaleja tuhoavia entsyymejä, kuten kloramfenikoliasetyylitransferaaseja (CAT), superoksididismutaaseja (SOD) tai glutationiperoksidaaseja, jonka vuoksi  $\beta$ -solut ovat erityisen herkkiä oksidatiiviselle stressille. Tutkimusten mukaan ruokavalion antioksidantit, kuten antosyaanit, vähentävät glukoosin indusoimaa oksidatiivista stressiä  $\beta$ -soluissa. Useissa *in vivo* ja *in vitro*-tutkimuksissa antosyaanit on yhdistetty parantuneeseen insuliinintuotantoon 2-tyypin diabetesta sairastavilla (Watson *et al.* 2014).

Noin 70-80 % 2-tyypin diabeetikoista kärsii rasvamaksasta, joka myös yhdistetään kohonneeseen riskiin sairastua sydän- ja verisuonisairauksiin. Maksan alentunut insuliiniherkkyys ja tiettyjen tulehdusmerkkiaineiden erityis on liitetty rasvan kertymiseen. Mustikka vähensi painonnousua ja alensi paastoverensokeria korkearasvaisella ruokavaliolla olleilla C57BL/6J-hiirillä verrattuna korkearasvaisella ruokavaliolla olleeseen kontrolliryhmään Heyman *et al.* (2014) tutkimuksen mukaan. Koe-eläimet oli jaettu kolmeen ryhmään ruokavalioiden perusteella: vähärasvainen, korkearasvainen sekä korkearasvainen, jossa oli mukana 20 % puolukkaa, mustaherukkaa, mustikkaa, vadelmaa, acai-marjaa, luumua tai karhunvatukkaa. Puolukkaa, mustaherukkaa ja mustikkaa saaneilla koe-eläimillä elimistön rasvan määrä, maksan lipidien kertyminen ja plasman inflammatoorimarkkeri PAI-1:n tasot laskivat huomattavasti ja toisaalta glukoositasapaino parani. Paastoverensokerin alenema saattaa olla suoraan seurausta rasvan määrän vähenemisestä, mutta mustikkauutteen antosyaanien on myös todettu alentavan korkeaa verensokeria ja parantavan insuliiniherkkyyttä aktivoimalla AMPK (5' AMP-activated protein kinase) -reaktiotietä. AMPK-reaktiotien aktivointi aiheuttaa esim. glukoositransportteri 4:n toiminnan aktivoimista valkoisissa

rasvasoluissa ja lihaksissa sekä glukoosin tuotannon ja rasvan määrän vähenemistä maksassa (Takikawa *et al.* 2010).

Resistiini on eräs adiposytokiineihin kuuluva hormoni, joka on liitetty ylipainosta aiheutuvan diabeteksen puhkeamiseen. Mykkänen *et al.* (2014) tekemässä tutkimuksessa korkearasvaisella ruokavaliolla olevien C57BL-hiirten resistiinitasot olivat alhaisemmat niillä yksilöillä, joiden ruokavalioon oli lisätty antosyaanipitoista mustikkajuomaa. Resistiinillä on tulehdusta edistäviä vaikutuksia elimistössä ja se myös säätelee MCP-1:n (monocyte chemoattractant protein 1) ekspressiota. MCP-1 on sytokiini, joka saa aikaan monosyyttien, muisti-T-solujen ja dendriittisten solujen kertymisen tulehdusalueelle.

### **3.3.2. Verenpaine ja verisuonitaudit**

Verenpainetauti on yksi kriteeri metabolisen oireyhtymän diagnosoille ja se liitetään usein ylipainoon. Oksidatiivinen stressi, tulehdusreaktiot ja häiriöt reniini-angiotensiinijärjestelmässä liittyvät krooniseen korkeaan verenpaineeseen. Korkeaan verenpaineeseen voidaan määrätä joukko erilaisia lääkkeitä, kuten  $\beta$ -salpaajia, ACE-inhibiittoreita, Ca-kanavasalpaajia jne., mutta tutkimuksissa ruoka-aineilla on myös saatu positiivisia tuloksia. Mykkänen *et al.* (2014) havaitsivat mustikkajuoman alentavan C57BL-hiirten korkeaa verenpainetta, joka oli indusoitu runsasrasvaisella ruokavaliolla. Verenpaineen laskun taustalla ovat luultavasti mustikan sisältävien antosyaanien ja muiden antioksidanttien tulehdusta vähentävät vaikutukset.

Zafra-Stone *et al.* (2007) tutkivat marjojen antosyaanien vaikutusta ateroskleroosiin eli valtimonkovettumatautiin hamstereilla. Koe-eläimet oli jaettu kahteen yhdeksän eläimen ryhmään, joiden ruokavalio koostui 0,2 % kolesterolista ja 10 % kookosöljystä. Toinen ryhmä sai lisäksi 1 % OptiBerry-valmistetta, joka on sekoitus pensasmustikkaa, mustikkaa, karpaloa, seljaa, vadelman siemeniä ja mansikkaa. 12 viikon jälkeen hamsterit punnittiin, eläinten veri plasma analysoitiin ja aortat irrotettiin ja puhdistettiin. Aorttanäytteet käsiteltiin en face -tekniikalla ja värjättiin Oil Red O-väriaineella, joka värjää lipidit ja triglyseridit. Menetelmällä pyrittiin tarkastelemaan vaahtosolujen osuutta aortan soluista, joka on yksi ateroskleroosin indikaattori. OptiBerry-valmistetta saaneet eläimet painoivat keskimäärin 8 % vähemmän kuin kontrolliryhmän hamsterit, johtuen joko ruokahalun vähenemisestä tai aineenvaihdunnan kiihtymisestä. Veriplasmasta tutkituissa kolesterolin- ja triglyseridiarvoissa ei puolestaan ollut huomattavaa eroa ryhmien välillä. OptiBerry-ryhmässä ateroskleroottinen indeksi

(vaahtosolujen osuus aortan soluista prosentteina) oli 36.6 % vähemmän kuin kontrolliryhmässä. OptiBerry-valmisteen sisältämät marjat sisältävät runsaasti antosyaaneja.

Polyfenoli-pitoisen juoman on myös havaittu alentavan verenpainetta etenkin korkeasta verenpaineesta kärsivillä henkilöillä. Tjelle *et al.* (2015) käyttivät 134 koehenkilöä kattavassa tutkimuksessa kahta eri juomaa (Optijuice & MANA Blue), joiden polyfenolipitoisuudet olivat 245,5 ja 305,2 mg/100g sekä plasebojuomaa, jonka polyfenolipitoisuus oli 75 mg/100g. Antosyaaneja juomissa oli vastaavasti 41,3 mg/100g (Optijuice), 11,9 mg/100g (MANA Blue) ja 0 mg/100g plasebojuomassa. Koehenkilöt saivat 500 ml juomaa 12 viikon ajan ja heidän verenpaineensa mitattiin kokeen alussa sekä 6 ja 12 viikkoa sen jälkeen. Plaseboryhmän verenpaine oli korkeampi kuin kokeen alussa 6 viikon jälkeen mutta matalampi 12 viikon jälkeen. Plaseboryhmän verenpaineen vaihtelut otettiin huomioon määritettäessä polyfenoli-ryhmän verenpaineiden vaihteluja. Hypertensiivisten koehenkilöiden systolinen verenpaine oli pudonnut 7,3 mmHg kuuden viikon ja 6,8 mmHg 12 viikon jälkeen kokeen aloittamisesta, kun molempien testiryhmien tulokset yhdistettiin ja niitä verrattiin plaseboryhmään. Normaalin verenpaineen omaavilla koehenkilöillä, jotka saivat polyfenolipitoista juomaa, systolinen verenpaine laski keskimäärin 6,9 mmHg kuuden viikon ja 3,4 mmHg 12 viikon jälkeen kokeen aloittamisesta verrattuna plaseboryhmään. Optijuice ja MANA Blue- koeryhmien välillä ei kuitenkaan ollut merkittäviä eroja verenpaineen suhteen. Optijuice sisälsi n. 5-kertaisen määrän antosyaaneja, sekä 28% suuremman konsentraation flavonoleja. Hydroksikanelihapon määrä oli molemmissa valmisteissa lähes sama. Kokeen tulosten pohjalta ei pystytty päättelemään, millä fenolisella yhdisteellä tai kuinka suurella annoksella polyfenoleja oli vaikutusta verenpaineeseen (Tjelle *et al.* 2015).

### **3.4. Näkö**

Gangliosolut (RGC) ovat hermosoluja, jotka sijaitsevat silmän verkkokalvon sisäpinnalla. Gangliosolujen tuhoutuminen on monen sairauden, kuten glaukooman, näköhermotulehduksen, diabeettisen retinopatian ja verkkokalvovaltimon tukoksen tunnusmerkki. Mustikan antosyaanien on löydetty suojelevan RGC-5-soluja SIN-1 indusoidulta solukuolemalta *in vitro*, luultavasti niiden antioksidanttisten ominaisuuksien takia. Lisäksi antosyaanit suojelivat N-metyyli-D-aspargiinihapolla (NMDA) aiheutetuilta verkkokalvon vaurioilta hiirillä *in vivo* (Matsunaga *et al.* 2009).



Matsunaga *et al.* (2010b) tekemän tutkimuksen mukaan mustikan yleisimmät antosyaanit delfinidiini, syanidiini ja malvidiini inhiboivat verisuonen endoteelin kasvutekijä-A:n (VEGF-A) indusoimaa verisuonten uudismuodostusta eli angiogeneesiä. Angiogeneesin häiriöt ovat yhteydessä syöpäkasvaimien leviämiseen, mutta myös verkkokalvon sairauksiin, kuten silmäpohjan ikärappeumaan, diabeettiseen retinopatiaan ja glaukoomaan. Samassa tutkimuksessa havaittiin, että kyseiset antosyanidit estivät 2,2-difenyyl-1-pikryylihydratsyyliradikaalin (DPPH) toimintaa. Toisessa tutkimuksessa Matsunaga *et al.* (2010a) mustikkauute inhiboi VEGF-A:n indusoimaa ERK1/2:n ja seriini/treoniini-proteiinikinaasiperheen proteiinikinaasi B:n (Akt) fosforylaatioita. Tämä puolestaan johti angiogeneesin inhibointiin. Antosyanidien angiogeneesin inhibointikyky perustuu siis osin niiden antioksidanttisiin ominaisuuksiin mutta myös ERK1/2:n ja Akt:n fosforylaation inhibointiin. VEGF-A:n indusoimalla ERK1/2-signalointitiellä on tärkeä rooli esimerkiksi ihmisen napalaskimon endoteelisolujen (HUVECs) proliferaatiossa ja Akt:lla migraatiossa (Matsunaga *et al.* 2010a).

Mustikkauutteen vaikutuksesta verkkokalvon epiteelisolujen uudistumiseen ja homeostaasiin on saatu positiivisia tuloksia Bao *et al.* (2008) tekemässä tutkimuksessa. Verkkokalvon epiteelisolujen on havaittu noudattavan tiettyä solusyklin dynamiikkaa parantumisen aikana. G<sub>2</sub>/M-vaiheessa olevien tumien prosenttiosuus kertoo mitoottisesta aktiivisuudesta. Mustikkauute (10<sup>-4</sup> M Cyd-3-glu) kasvatti G<sub>2</sub>/M- ja S-vaiheessa olevien solujen osuutta 36 tunnin inkubaation jälkeen, joten sillä on luultavasti positiivisia vaikutuksia verkkokalvon epiteelisolujen mitoottiseen aktiivisuuteen ja solujakautumisen nopeuteen. Mustikkauutetta voitaisiin käyttää paikallisesti verkkokalvon naarmujen parantamiseen korkeinkin pitoisuuksina, sillä sen ei ole havaittu olevan toksinen soluille.

Mustikan vaikutuksesta pimeänäköön on tehty n. 30 tutkimusta, joista 12 on placebo-kontrolloitu. Canter & Ernst (2004) kokosivat yhteen näiden 12 tutkimuksen tulokset, joista neljä uusinta koetta olivat satunnaistettuja kontrolloituja (RCT) ja niissä mustikalla ei ollut vaikutusta pimeänäköön. Viides RCT ja seitsemän ei-satunnaistettua koetta puolestaan raportoivat positiivisesta vaikutuksesta. Negatiivisen tuloksen antavissa kokeissa mustikkauutteiden annokset olivat kuitenkin pienemmät ja kerätyt mustikat olivat maantieteellisesti kaukana toisistaan, joten antosyaanipitoisuuksissa saattoi olla eroja. 11:ssä tutkimuksessa 12:sta mustikan vaikutusta tutkittiin vain terveysilmäisillä koehenkilöillä, mutta tiukkoja (esim RCT) kokeita ei ole järjestetty ollenkaan henkilöillä, joilla on alentunut pimeänäkö tai patologinen silmäsairaus. Hypoteesin varmistamiseksi tarvittaisiin siis

tiukemmin kontrolloituja, plasebo-kontrolloituja tutkimuksia, joiden koehenkilöillä olisi em. näköalennemia.

### 3.5. Suolisto

Roth kumppaneineen (2016) tutki mustikan antosyaanien vaikutusta Colitis Ulcerosaa (UC) eli haavaista paksusuolen tulehdusta sairastavien potilaiden suolistossa. Haavainen paksusuolen tulehdus on krooninen suoliston sairaus, joka kuuluu Crohnin taudin lisäksi tulehduksellisiin suolistosairauksiin (IBD). Sytokiinit ovat pieniä proteiineja, jotka ovat tärkeitä solusignaaloinnissa. Immunisolut tuottavat sytokiineja immuunivasteen seurauksena ja sytokiinien korkea pitoisuus viestiikin tulehduksesta elimistössä. Potilaat saivat antosyaanipitoista mustikkauutetta (ARBE), ja heidän seerumin sytokiinipitoisuudet analysoitiin ELISA-menetelmällä. Näytteet otettiin 1, 3, 5 ja 7 viikon päästä tutkimuksen aloituksesta. Lisäksi tutkimuksessa käytettiin THP-1-solulinjaa selvittämään antosyaanin tarkempaa vaikutusmekanismia solutasolla *in vitro*.

Interferoni (IFN) on sytokiineihin kuuluva proteiiniyryhmä, joita solut erittävät patogeenien läsnä ollessa. Interferonit voidaan jakaa kolmeen kategoriaan niitä sitovien reseptorien perusteella. IFN- $\gamma$  (tyyppi II) vaikuttaa enimmäkseen JAK/STAT-signaalintien kautta (Blouin & Lamaze 2013). Tutkimuksessaan Roth *et al.* (2016) saivat selville, että ARBE inhiboi IFN- $\gamma$ :n indusoimaa IFN- $\gamma$  R2:n ekspressiota, joka on IFN- $\gamma$ -reseptorin signaalin välittävä osa. ARBE siis estää tulehdusta inhiboimalla IFN- $\gamma$ :a, joka aiheuttaa tulehdusta edistäviä vaikutuksia. Tutkimuksessa havaittiin, että IFN- $\gamma$  ja IFN- $\alpha$  tasot seerumissa vähenivät vain niillä potilailla, joiden sairaus siirtyi remissiovaiheeseen tutkintajakson aikana. Täten interferonien ( $\alpha$  ja  $\gamma$ ) väheneminen saattoi johtua itse sairauden oireettomasta vaiheesta, eikä niinkään ARBE:sta. IFN- $\gamma$  R2:n ja STAT1:n ekspressiotasot kuitenkin vähenivät riippumatta remissiosta, joten nämä muutokset ovat luultavasti suoraan ARBE:n vaikutusta.

Huolimatta *in vitro* -kokeiden positiivisista tuloksista, Graf *et al.* (2013) tutkimuksessa antosyaanipitoisella rypälemehulla ei ollut vaikutusta T-solujen tai luonnollisten tappajasolujen (NK) määrään, NK-solujen aktivaatioon, sytokiinien eritykseen imusoluista tai suoliliepeen rasvakudoksesta, tulehdusmerkkiaineiden määrään seerumissa eikä NF- $\kappa$ B:n aktivaatioon Fischer-rotilla. Rotat saivat 15 mg antosyaaneja päivässä 10 viikon ajan.

Mahahaava on yksi maailman yleisimmistä sairauksista ja se ilmaantuu yleensä stressin, steroideihin kuulumattomien tulehduskipulääkkeiden, väsymyksen, *Helicobacter pylori*-

tartunnan tai alkoholikulutuksen seurauksena. Mahalaukun limakalvon vaurioon on yhdistetty vapaiden radikaalien, kuten superoksidianionin ja hydroksyyliiradikaalin toiminta, lipidien peroksidaatio sekä neutrofiilien aktivaatio ja tunkeutuminen limakalvon soluihin. Etanoli aiheuttaa mahan limakalvoesteen vaurioita, vapauttaa histamiinia ja lisää tulehdusta, joten sitä voidaan käyttää tutkimuksissa indusoimaan soluvaurioita. Ogawa *et al.* (2011) tutkivat mustikkauutteen (>25% antosyanideja) ja  $\alpha$ -tokoferolin vaikutuksia etanolilla ja suolahapolla indusoituihin mahahaavoihin. Hiirille annettiin 3, 10, 20 tai 100 mg/kg mustikkauutetta tai 100 mg/kg e-vitamiinia 1 h ennen HCl/etanolikäsittelyä. Mustikkauute (20, 20 ja 100 mg/kg) vähensi mahan limakalvojen vaurioita (47, 56 ja 63 %) riippuen suoraan saadusta annoksesta. Myös e-vitamiini inhiboi vaurioita, mutta vähemmän kuin sama määrä mustikkauutetta. Positiiviset tulokset johtuvat oletettavasti mustikan tärkeimpien antosyanidien delfinidiinin, syanidiinin ja malvidiinin antioksidanttisista ja vapaita radikaaleja pysäyttävistä ominaisuuksista (Ogawa *et al.* 2011).

### 3.6. Syöpä

Adams kumppaneineen (2011) tutki pensasmustikkajauheen (*Vaccinium corymbosum*) vaikutusta rintasyöpäkasvaimiin, jotka antavat negatiivisen tuloksen markkereille MDA-MB-2321 (TNBC) nude-hiirillä. Tutkimuksessa verrattiin kasvaimen kasvua hiirillä, joiden ruokavalioon oli lisätty 5 tai 10 % (wt:wt) mustikkajauhetta. Lisäksi kasvaimista tutkittiin tombospondiini-2, IL-13 ja IFN- $\gamma$  koodaavien geenien ekspressiota, jotka ovat merkittäviä tulehduksissa, syövässä ja metastaasien muodostumisessa. Toisessa kokeessa tutkittiin 5 %:sen mustikkajauheen inhibointikykyä MDA-MB-231-luc-D3H2LN-solulinjan metastaasien muodostumiseen *in vivo*. Tutkimuksessa kävi ilmi, että kasvaimien koko oli 75 % pienempi 5 %:n mustikkauute (BB) -ryhmällä ja 60 % pienempi 10 %:n BB-ryhmällä verrattuna kontrolliryhmään. Kasvainsolujen jakautuminen oli myös hitaampaa molemmissa BB ryhmissä sekä 10 % BB ryhmässä solukuolemien määrä oli korkeampi verrattuna kontrolliryhmään. Tulehdusreaktioon liittyvien geenien ekspressiossa oli molemmissa BB-ryhmissä selkeitä eroja kontrolliryhmään verrattuna. Wnt-signaloinnissa tapahtuvia muutoksia analysoitiin tarkemmin 5 % BB-ryhmän syöpäkasvaimilla ja huomattiin, että  $\beta$ -kateniinin ekspressio ja glykogeenisyntaasikinaasi-3 $\beta$ :n fosforylaatio olivat alentuneet.  $\beta$ -kateniinin inhibiittoriproteiini adenomatous polyposis coli:n (APC) ekspressio oli puolestaan kohonnut kontrolliryhmään verrattuna.  $\beta$ -kateniinin signalointi indusoi esimerkiksi sykliini D-1:n ja

MMP-9 geenien ekspressiota, jotka edistävät syöpäsolujen jakautumista ja metastaasien muodostumista (Adams *et al.* 2011).

Zafra-Stone *et al.* (2007) havaitsivat OptiBerry-valmisteen vähentävän IL-8 tuottoa *Helicobacteri pylori* -bakteeria kantavilla ihmisen suolistosyöpäsoluilla (MKN45). *H. pylori* aiheuttaa osalla tartunnan saaneista kroonista tulehdusta mahan limakalvolla, mikä on yhdistetty kohonneeseen mahasyövän riskiin, sekä maha- tai pohjukkaissuolen haavan kehitykseen (Sipponen & Marshall 2000). Tutkimuksessa solunäytteisiin siirrettiin *H. pylori*-bakteeria, 10 ng TNF $\alpha$ :a sekä osaan näytteistä 0.5 % OptiBerry-valmistetta ja supernatantit kerättiin 6, 12 ja 24 tunnin kuluttua käsittelystä. IL-8- tasot mitattiin kaupallisen kitin avulla (R&D Systems, Minneapolis, MN). IL-8 olivat kohonneet *H. pylori*-käsittelyn vuoksi 20, 22 tai 25 % (6, 12 tai 24 tuntia). OptiBerry-valmiste inhiboi IL-8:n tuoton täysin kaikissa solunäytteissä.

Kemoterapiahoidon resistenssin muodostumisen suurin syy kroonisessa lymfaattisessa leukemiassa (KLL) on häiriö apoptoosissa. Alhosin *et al.* (2015) tutkivat antosyaanipitoisen mustikkauutteen (Antho50) proapoptoottisia ominaisuuksia KLL:a sairastavien potilaiden B-soluilla ja terveiden henkilöiden perifeerisen veren mononukleaarisilla soluilla (PBMCs). Antho50 indusoi proapoptoottisia vaikutuksia B KLL-soluilla mutta ei PBMC:llä. KLL-solujen elinkyvyn heikkeneminen ja apoptoosi olivat riippuvaisia käsittelyajasta sekä käytetystä Antho50:n konsentraatiosta. p-Bad (Bcl-2-associated death promoter) -inaktivaatio defosforyloinnilla indusoi Bcl-2-geenin tuotannon hiljentämistä, joka johtaa apoptoosiin. p-Akt voi puolestaan aktivoida Bad:n fosforyloimalla Ser112 ja Ser136 aminohapot. Antho50:n havaittiin defosforyloivan juuri Akt:n Ser437 aminohapon tunnin kuluessa käsittelystä, jonka seurauksena Bad ei fosforyloidu. Tämä johtaa Bcl-2-geenin ekspression vähenemiseen ja sen seurauksena kaspasi-3:en liittyvän solukuoleman aktivaatioon. Huolimatta antosyaanien antioksidanttisista ominaisuuksista, Antho50:n huomattiin aiheuttavan ROS-yhdisteiden nopeaa muodostumista KLL-soluissa sekä UHRF1-geenin ekspression hiljentämistä, indusoiden apoptoosia. UHRF1 on anti-apoptoottinen proteiini, jonka tuotanto on yli-ilmentynyttä monissa ihmisen syöpäsoluissa. Tutkimuksessa käytetyn Antho50:n tärkein antosyanidi oli delfinidiini, mutta myös muilla antosyaaneilla sekä fenolisilla yhdisteillä voi olla yhteisvaikutusta apoptoosin indusoinnissa B KLL-soluissa.

#### 4. Muiden funktionaalisten yhdisteiden terveysvaikutuksia

Tumbas Šaponjac *et al.* (2015) tutkivat kolmen erilaisen kuivatun mustikkafraktion antioksidanttisia ja antiproliferatiivisia ominaisuuksia. Fraktio 1 sisälsi c-vitamiinia, fraktio 2 flavonoideja ja fraktio 3 fenolihappoja. Tutkimuksessa antioksidanttisten vaikutusten tutkimiseen käytettiin hydroksyyli- ja DPPH-radikaaleja. Flavonoidit stabiloivat hydroksyyli- ja DPPH-radikaaleja muita fraktioita enemmän, kun taas fenolihapot osoittautuivat paremmiksi DPPH-radikaalien pysäyttäjiksi. DPPH• reagoi fenolien kanssa kahdella eri mekanismilla: irroittamalla fenoliryhmän vetyatomien tai siirtämällä elektronin fenoliryhmältä tai fenoksidianionilta DPPH-radikaalille. Fraktioiden 2 ja 3 havaittiin myös hidastavan syöpäsolujen jakautumista ja solujen kasvun inhibitio oli suoraan verrannollinen aineiden konsentraatioihin. Fraktio 1 inhiboi myös solujen kasvua konsentraatioverrannollisesti, mutta myös solulinjalla näytti olevan vaikutusta. C-vitamiini inhiboi HT-29 (paksusuolen adenokarsinoma) solulinjan soluja vain suurimmalla käytetyllä konsentraatiolla (>250 µg/ml) mutta HeLa- ja MCF7-solujen kasvu inhiboitui kaikilla konsentraatioilla. Fenolihappopitoinen fraktio 3 inhiboi parhaiten HeLa-solujen kasvua mutta sekä fraktio 2 että fraktio 3 inhiboivat MCF7-solujen kasvua lähes yhtä hyvin.

Mustikalla on myös antimikrobisia vaikutuksia. Burdulis *et al.* (2009) tekemän tutkimuksen mukaan mustikkauute inhiboi usean gram-negatiivisen ja gram-positiivisen bakteerin kasvua, mutta hiivojen kasvuun sillä ei ollut juuri vaikutusta. Myös Raudsepp *et al.* (2016) havaitsivat tutkimuksessaan, että mustikalla on antimikrobisia vaikutuksia. Etanoliin uutettu mustikka inhiboi bakteerien kasvua paremmin, kuin veteen uutettu. Samassa tutkimuksessa havaittiin, että etanoliin uutetulla mustikalla on myös parempi antioksidanttinen vaikutus, kuin veteen uutetulla mustikalla. Yksi syy tähän voi olla vesi-uutoksen kuumentaminen, jonka havaittiin vähentävän c-vitamiinipitoisuutta 30 % verrattuna huoneenlämmössä valmistettuun etanoliuutukseen. Toiseksi, etanoliuutteessa esiintyi lipofiilisiä antioksidanttisia yhdisteitä, joita vesi-uutteessa ei havaittu. Riihinen *et al.* (2011) totesivat tutkimuksessaan mustikasta eristettyjen fraktioiden inhiboivan hammasplakkia muodostavien bakteerien koagregatiota. *Streptococcus mutans* on yksi yleisimmistä suun bakteereista, jotka ilmestyvät suuhun jo varhain. Hampaan pinnalle muodostuva plakki onkin yleisesti streptokokkien ja *Actinomyces*-sukuun kuuluvien bakteerien (kuten *Actinomyces naeslundii*) keräymiä. *Fusobacterium nucleatum* ilmestyy suuhun yleensä myöhemmin ja se toimii ”siltana” uusien ja vanhojen bakteeripesäkkeiden välillä, muodostaen koagregaatteja useimpien suusta löytyvien

bakteerien kanssa. Mustikan, ja muiden marjojen, antosyaanien, proantosyanidien ja flavoloniglykosidien arvellaan vaikuttavan bakteerien kykyyn muodostaa koagregaatteja.

## 5. Johtopäätökset

Mustikan antosyaaneilla ja muilla funktionaalisilla yhdisteillä on saavutettu tutkimuksissa huomattavia terveyshyötyjä. Mustikkauutteilla on havaittu mm. antioksidanttisia, antimikrobisia, tulehdusta estäviä, syöpäkasvua hidastavia, masennusta ja Alzheimerin tautia ehkäiseviä sekä verensokeria ja -painetta tasapainottavia ominaisuuksia. On kuitenkin otettava huomioon, että usein tutkimuksissa käytetään korkeita antosyaanipitoisuuksia. Lisäksi eläimillä tai solulinjoilla tehtyjä kokeita ei ole usein toteutettu ihmisillä, joten tuloksiin pitää suhtautua kriittisesti. Esimerkiksi Kumar *et al.* (2012) antoivat tutkimuksessaan hiirille 125, 250 tai 500 mg/kg mustikkauutetta, jonka antosyaanipitoisuus oli vähintään 25 %. Koe-eläimille aiheutetut masennuksen oireet helpottivat kaikilla annetuilla pitoisuuksilla. 75 kg painavan ihmisen pitäisi saada antosyaaneja 2344 mg, jotta se vastaisi hiiren saamaa antosyaanipitoisuutta (125 mg/kg x 0,25). Tämä määrän saamiseksi mustikoita pitäisi syödä n. 780 g, jos oletetaan, että mustikan antosyaanipitoisuus on 300 mg/100g (Prior *et al.* 1998). Koska suomalaiset saavat antosyaaneja ruokavaliostaan keskimäärin 80 mg päivässä (Ovaskainen *et al.* 2008), ei ruokavaliosta ole yksistään riittävästi aikaansaamaan tutkimuksissa havaittuja terveyshyötyjä. Osa tutkimuksissa havaituista mustikan terveyshyödyistä saattaa olla myös seurausta kaikkien antioksidanttisten yhdisteiden yhteisvaikutuksesta.

Mustikan antosyaanien vaikutukset perustuvat suurimmalta osin niiden antioksidanttisiin ominaisuuksiin, mutta niiden on tutkittu myös vaikuttavan AMPK- ja JAK/STAT-reaktioteihin ja defosforyloivan ERK1/2- ja Akt-signaalintiproteiineja. Mustikan on havaittu myös vaikuttavan L-arginiini-typpioksidin -signaalintiteihin hiirillä ja siten toimivan masennusta ehkäisevästi. Lisäksi *H. pylori* kantavilla suolistosyöpäsoluilla antosyaanipitoinen uute inhiboi IL-8:n tuoton täysin. Vaikka mustikalla saadut tutkimustulokset *in vitro* solulinjoilla ja *in vivo* eläinkokeilla vaikuttavat positiivisilta ja lupaavilta, saattaa antosyaanien vaikutukset ihmisen elimistössä olla erilaiset johtuen eroista aineenvaihdunnassa. Antosyaaneista ei myöskään imeydy elimistöön kuin n. 1 % suun kautta nautitusta määrästä. Mustikkaa voidaan silti pitää funktionaalisena elintarvikkeena ja tulevaisuudessa potentiaalisena ravintolisänäkin, vaikka silloin sitä ei enää funktionaaliseksi elintarvikkeeksi saakaan nimittää.

## 6. Kirjallisuusviitteet

Functional Foods. Luxembourg: Publ. Off. of the Europ. Union, 2010

Adams LS, Kanaya N, Phung S, Liu Z & Chen S (2011) Whole blueberry powder modulates the growth and metastasis of MDA-MB-231 triple negative breast tumors in nude mice. *J Nutr* 141(10): 1805-1812.

Alhosin M, Leon-Gonzalez AJ, Dandache I, Lelay A, Rashid SK, Kevers C, Pincemail J, Fornecker LM, Mauvieux L, Herbrecht R & Schini-Kerth VB (2015) Bilberry extract (Antho 50) selectively induces redox-sensitive caspase 3-related apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells by targeting the Bcl-2/Bad pathway. *Sci Rep* 5: 8996.

Bao L, Yao X-, Yau C-, Tsi D, Chia C-, Nagai H & Kurihara H (2008) Protective Effects of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extract on Restraint Stress-Induced Liver Damage in Mice. *J Agric Food Chem* 56(17): 7803-7807.

Blouin CM & Lamaze C (2013) Interferon gamma receptor: The beginning of the journey. *Frontiers in Immunology* 4(SEP).

Burdulis D, Sarkinas A, Jasutiene I, Stackevicene E, Nikolajevs L & Janulis V (2009) Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Pol Pharm* 66(4): 399-408.

Canter PH & Ernst E (2004) Anthocyanosides of *Vaccinium myrtillus* (Bilberry) for Night Vision - A Systematic Review of Placebo-Controlled Trials. *Surv Ophthalmol* 49(1): 38-50.

Castro L & Freeman BA (2001) Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 17(2): 161-165.

Chu W, Cheung S, Lau R, Benzie I & Wachtel-Galor S (eds) (2011) Chapter 4 Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, CRC Press/Taylor & Francis.

Cocetta G, Karppinen K, Suokas M, Hohtola A, Häggman H, Spinardi A, Mignani I & Jaakola L (2012) Ascorbic acid metabolism during bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit development. *J Plant Physiol* 169(11): 1059-1065.

Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P & Folli F (2013) Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 19(32): 5695-5703.

Galli RL, Bielinski DF, Szprengiel A, Shukitt-Hale B & Joseph JA (2006) Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection. *Neurobiol Aging* 27(2): 344-350.

Graf D, Seifert S, Bub A, Frohling B, Dold S, Unger F, Rompp A & Watzl B (2013) Anthocyanin-rich juice does not affect gut-associated immunity in Fischer rats. *Mol Nutr Food Res* 57(10): 1753-1761.

Häkkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM & Törrönen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 47(6): 2274-2279.

Heyman L, Axling U, Blanco N, Sterner O, Holm C & Berger K (2014) Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2014.

Kähkönen MP, Hopia AI & Heinonen M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49(8): 4076-4082.

Kester MI, Van Der Vlies AE, Blankenstein MA, Pijnenburg YAL, Van Elk EJ, Scheltens P & Van Der Flier WM (2009) CSF biomarkers predict rate of cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurology* 73(17): 1353-1358.

Kong J-, Chia L-, Goh N-, Chia T- & Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64(5): 923-933.

Kumar B, Arora V, Kuhad A & Chopra K (2012) *Vaccinium myrtillus* ameliorates unpredictable chronic mild stress induced depression: Possible involvement of nitric oxide pathway. *Phytotherapy Research* 26(4): 488-497.

Lätti AK, Riihinen KR & Kainulainen PS (2008) Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J Agric Food Chem* 56(1): 190-196.



- Matsunaga N, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Yokota S & Hara H (2010a) Vaccinium myrtillus (Bilberry) Extracts Reduce Angiogenesis *In vitro* and *In vivo*. Evid Based Complement Alternat Med 7(1): 47-56.
- Matsunaga N, Imai S, Inokuchi Y, Shimazawa M, Yokota S, Araki Y & Hara H (2009) Bilberry and its main constituents have neuroprotective effects against retinal neuronal damage *in vitro* and *in vivo*. Molecular Nutrition and Food Research 53(7): 869-877.
- Matsunaga N, Tsuruma K, Shimazawa M, Yokota S & Hara H (2010b) Inhibitory actions of bilberry anthocyanidins on angiogenesis. Phytotherapy Research 24(SUPPL. 1): S42-S47.
- Milivojevic J, Maksimovic V, Dragisic Maksimovic J, Radivojevic D, Poledica M & Ercili S (2012) A comparison of major taste-and health-related compounds of Vaccinium berries. Turkish Journal of Biology 36(6): 738-745.
- Mykkänen OT, Huotari A, Herzig K-, Dunlop TW, Mykkänen H & Kirjavainen PV (2014) Wild blueberries (vaccinium myrtillus) alleviate inflammation and hypertension associated with developing obesity in mice fed with a high-fat diet. PLoS ONE 9(12).
- Nardi GM, De Farias Januário AG, Freire CG, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MRA, Do Nascimento SR, Gon AC, Mariano LNB, Wagner G, Niero R & Locatelli C (2016) Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. Pharmacognosy Research 8: S42-S49.
- Nile SH & Park SW (2014) Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. Nutrition 30(2): 134-144.
- Ogawa K, Oyagi A, Tanaka J, Kobayashi S & Hara H (2011) The protective effect and action mechanism of vaccinium myrtillus L. on gastric ulcer in mice. Phytotherapy Research 25(8): 1160-1165.
- Ovaskainen ML, Torronen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellstrom J, Reinivuo H & Mattila P (2008) Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. J Nutr 138(3): 562-566.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G & Mainland CM (1998) Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic

and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. *J Agric Food Chem* 46(7): 2686-2693.

Raudsepp P, Anton D, Roasto M, Meremäe K, Pedastsaar P, Mäesaar M, Raal A, Laikoja K & Püssa T (2013) The antioxidative and antimicrobial properties of the blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.), Siberian rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) and some other plants, compared to ascorbic acid and sodium nitrite. *Food Control* 31(1): 129-135.

Riihinen K, Jaakola L, Kärenlampi S & Hohtola A (2008) Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem* 110(1): 156-160.

Riihinen K, Ryyänänen A, Toivanen M, Könönen E, Törrönen R & Tikkanen-Kaukanen C (2011) Antiaggregation potential of berry fractions against pairs of *Streptococcus mutans* with *Fusobacterium nucleatum* or *Actinomyces naeslundii*. *Phytotherapy Research* 25(1): 81-87.

Rikans LE & Hornbrook KR (1997) Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1362(2-3): 116-127.

Roth S, Spalinger MR, Gottier C, Biedermann L, Zeitz J, Lang S, Weber A, Rogler G & Scharl M (2016) Bilberry-derived anthocyanins modulate cytokine expression in the intestine of patients with ulcerative colitis. *PLoS ONE* 11(5).

Roth S, Spalinger MR, Müller I, Lang S, Rogler G & Scharl M (2014) Bilberry-derived anthocyanins prevent IFN- $\gamma$ -induced pro-inflammatory signalling and cytokine secretion in human THP-1 monocytic cells. *Digestion* 90(3): 179-189.

Sarma AD & Sharma R (1999) Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* 52(7): 1313-1318.

Sipponen P & Marshall BJ (2000) Gastritis and gastric cancer: Western countries. *Gastroenterol Clin North Am* 29(3): 579-592.

Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E & Trombetta D (2016) Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research* 30(8): 1265-1286.

Smeriglio A, Monteleone D & Trombetta D (2014) Health effects of *Vaccinium myrtillus* L.: Evaluation of efficacy and technological strategies for preservation of active ingredients. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 14(7): 567-584.

Stoner GD, Sardo C, Apseloff G, Mullet D, Wargo W, Pound V, Singh A, Sanders J, Aziz R, Casto B & Sun X (2005) Pharmacokinetics of anthocyanins and ellagic acid in healthy volunteers fed freeze-dried black raspberries daily for 7 days. *J Clin Pharmacol* 45(10): 1153-1164.

Takikawa M, Inoue S, Horio F & Tsuda T (2010) Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 140(3): 527-533.

Tjelle T, Holtung L, Bøhn S, Aaby K, Thoresen M, Wiik S, Paur I, Karlsen A, Retterstøl K, Iversen P & Blomhoff R (2015) Polyphenol-rich juices reduce blood pressure measures in a randomised controlled trial in high normal and hypertensive volunteers. *Br J Nutr* 114: 1054-1063.

Trumbeckaite S, Burdulis D, Raudone L, Liobikas J, Toleikis A & Janulis V (2013) Direct effects of *vaccinium myrtillus* L. Fruit extracts on rat heart mitochondrial functions. *Phytotherapy Research* 27(4): 499-506.

Tsuda T (2008) Regulation of adipocyte function by anthocyanins; Possibility of preventing the metabolic syndrome. *J Agric Food Chem* 56(3): 642-646.

Tumbas Šaponjac V, Čanadanović-Brunet J, Četković G, Djilas S & Četojević-Simin D (2015) Dried bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract fractions as antioxidants and cancer cell growth inhibitors. *LWT - Food Science and Technology* 61(2): 615-621.

Valentová K, Ulrichová J, Cvak L & Šimánek V (2007) Cytoprotective effect of a bilberry extract against oxidative damage of rat hepatocytes. *Food Chem* 101(3): 912-917.

Vepsäläinen S, Koivisto H, Pekkarinen E, Mäkinen P, Dobson G, McDougall GJ, Stewart D, Haapasalo A, Karjalainen RO, Tanila H & Hiltunen M (2013) Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate

behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem* 24(1): 360-370.

Wang H, Cao G & Prior RL (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44(3): 701-705.

Wang L & Stoner GD (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett* 269(2): 281-290.

Watson RR, Watson RR, Preedy VR & Zibadi S (2014) Polyphenols in human health and disease. London, Academic Press.

Willemse CM, Stander MA & de Villiers A (2013) Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *J Chromatogr A* 1319: 127-140.

Yao Y & Vieira A (2007) Protective activities of Vaccinium antioxidants with potential relevance to mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Neurotoxicology* 28(1): 93-100.

Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA & Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol Nutr Food Res* 51(6): 675-683.



UNIVERSITY  
OF OULU

# Mustikan (*Vaccinium myrtillus*) antosyaanit ja niiden terveysvaikutuksia

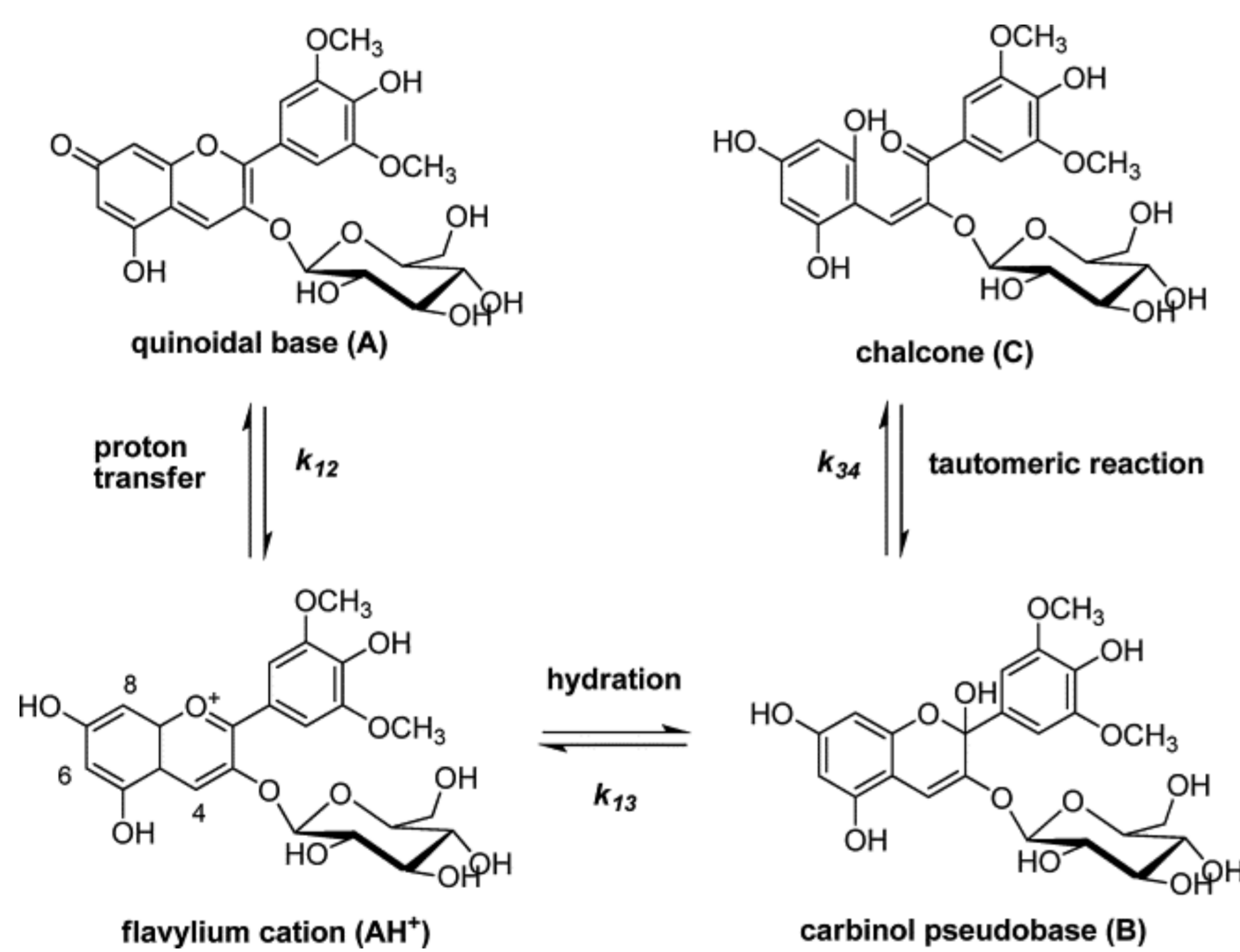
Ella Aitta

Biokemian kandidaatintutkimuksen tiedettä popularisoiva osuus

Biokemian ja molekyyllääketieteen tiedekunta, Oulun yliopisto, Suomi

## Antosyaanit

Antosyaanit ovat vesiliukoisia flavonoideihin kuuluvia pigmenttejä, jotka koostuvat sokeriosasta eli glykonista sekä antosyanidiksi kutsutusta flavonoidiosasta. Antosyaanit ovat 2-fenylibentsopyriliumin tai flavyliumsuolojen polyhydroksi- ja polymeetoksijohdannaisten glykosidejä. Mustikassa sokeriosa voi olla glukoosi, galaktoosi tai arabiinose. Kuusi yleisintä antosyanidia kasvien syötävissä osissa ovat syanidiini (Cy, 50 %), pelargonidiini (Pg, 12 %), peonidiini (Pn, 12 %), delfinidiini (Dp, 12 %), petunidiini (Pt, 7 %) sekä malvidiini (Mv, 7 %), joista mustikassa esiintyy kaikkia pelargonidiinia lukuun ottamatta. Antosyanidit koostuvat kolmesta rengasrakenteesta: kahdesta bentseenirenkaasta ja niiden väliin jäävästä happiatomin sisältävästä pyraanirenkaasta. Antosyaanit saavat kasveissa, kukissa ja marjoissa aikaan violetteja, sinisiä ja punaisia värejä, jotka ovat riippuvaisia pH:sta. Antosyanidit voivat esiintyä liuoksessa neljässä eri muodossa; quinoidal base, flavyliumkationi, hemiasetal base (carbinol pseudobase) ja chalone (Kuva 1). Tuoreissa mustikoissa antosyaanipitoisuus on n. 300 mg/100g eli 0,3 % mustikan painosta. Suurin osa antosyaaneista on mustikan kuoressa.



Kuva 1. Antosyaanien tasapainotilat eri pH-arvoissa. Mallina on käytetty malvidiini-3-O-glukosidia. Kuvan lähde: Willemse et al. (2013). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

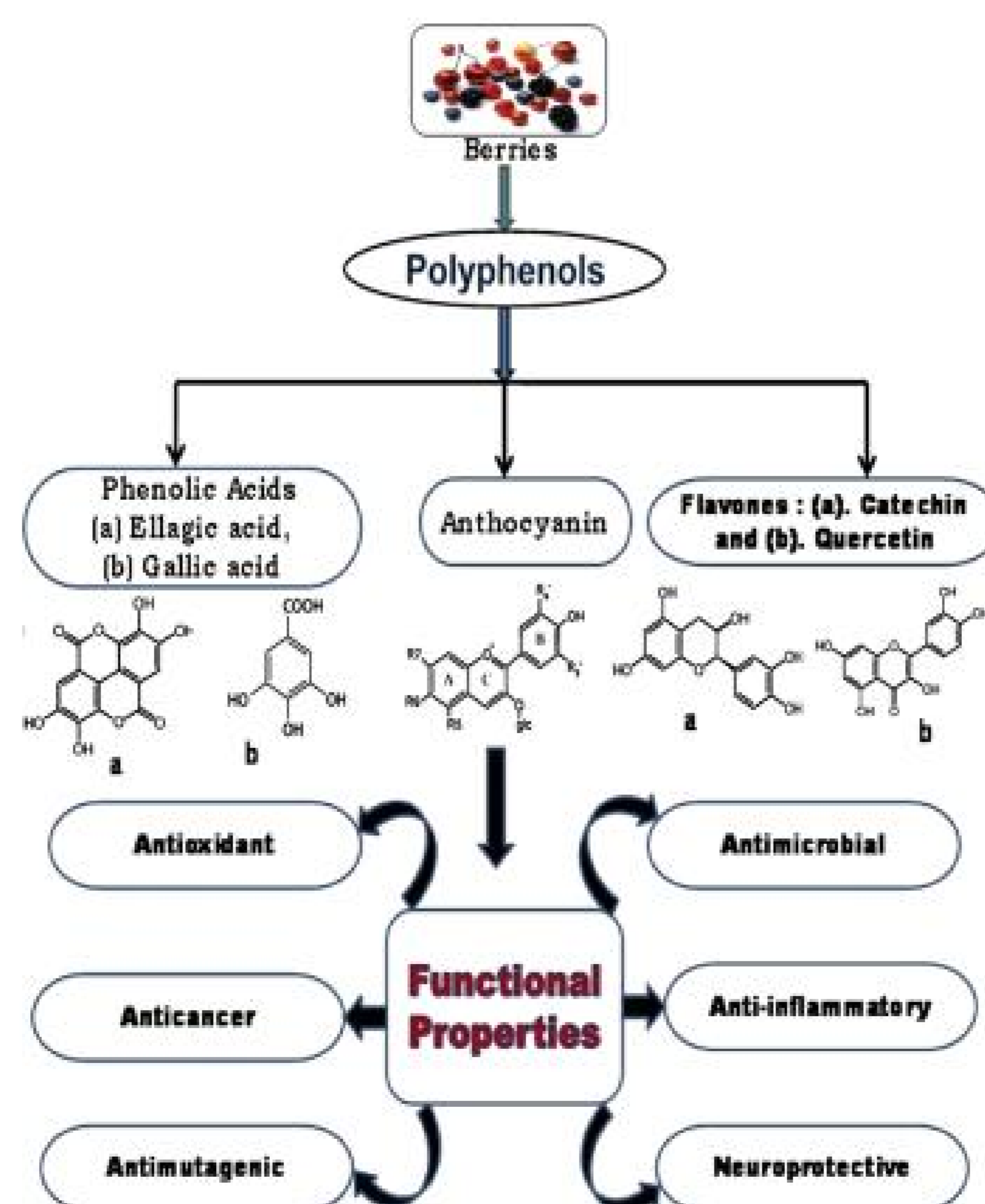
## Antosyaanien terveysvaikutuksia

Mustikan antosyaanien terveysvaikutusten uskotaan pohjautuvan pitkälti vapaiden radikaalien (ROS, reactive oxygen species) aiheuttamien vahinkojen estämiseen. Vapaita radikaaleja syntyy esimerkiksi mitokondriossa oksidatiivisen fosforylaation sivutuotteina. Vapaat radikaalit aiheuttavat soluissa laajaa vahinkoa esimerkiksi vahingoittamalla proteiineja, lipidejä ja DNA:ta ja niiden aiheuttamat vahingot ovat yhteydessä useisiin tauteihin sekä vanhenemiseen. Antosyaanien tehokkuus vapaiden radikaalien estämiseen perustuu antosyanidin rakenteeseen. Bentseenirenkaassa olevat hydroksyyliiryhmät sekä pyriinirenkaan hydroksyyliiryhmä voivat luovuttaa vetyatomien superoksidi-anionille ja muille hydroksyyliiradikaaleille. Antosyanidien on tutkittu

estävän vapaita radikaaleja tehokkaammin kuin niitä vastaavien glykosyloitujen antosyaanien ja lisäksi sokeriketjun pituuden kasvun on osoitettu heikentävän antioksidanttista tehokkuutta. Antosyaaneilla saattaa olla myös kyky sitoutua DNA:han, ja siten suojella DNA:ta oksidatiiviselta stressiltä.

Mustikan antioksidanttiset vaikutukset on tutkimuksissa yhdistetty mm. parantuneeseen insuliinintuotantoon, mahan limakalvon vaurioiden ehkäisyyn (mahahaavan ehkäisy), alentuneeseen verenpaineeseen ja gangliosolujen solukuoleman inhibointiin. Lisäksi mustikan on todettu ehkäisevän masennusta vaikuttamalla L-arginiini-typpioksidisignaalintietehen. Antosyaanit voivat aktivoida myös AMPK-reaktiotietä, joka aiheuttaa glukoositransportteri 4:n aktivoimista valkoisissa rasvasoluissa ja lihaksissa sekä glukoosin tuotannon ja rasvan määrän vähenemistä maksassa. Antosyaania saaneilla korkearasvaista ruokavaliota saaneilla hiirillä myös resistiinitasot olivat alhaisemmat ja toisessa tutkimuksessa hiirten ateroskleroottinen indeksi ja paino laskivat OptiBerry-marjavalmisteen nauttimisen seurauksena.

Mustikalla on ollut useita vaikutusmekanismeja *in vivo* syöpätutkimuksissa. Sen on huomattu hidastavan kasvainten kasvunopeutta, alentavan  $\beta$ -kateniinin ekspressiota ja glykogeenisyntaasikinaasi-3 $\beta$ :n fosforylaatiota sekä kohottavan APC:n ekspressiota. Antosyaanipitoinen mustikkauute indusoi myös apoptoosia kroonista lymfaattista leukemiaa sairastavien B-soluissa mm. defosforyloimalla Akt:n, joka johtaa Bcl-1-geenin ekspresion vähenemiseen ja sen seurauksena kaspasi-3:n liittyvän solukuoleman aktivaatioon. Kuva 2 tiivistää vielä yhteen antosyaanien tärkeimmät terveyttä edistävät ominaisuudet.



Kuva 2. Mustikan tärkeimpien polyfenolien kaavakuvat ja antosyaanien ominaisuuksia. Kuvan lähde: Nile et al. (2014). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.



Kuva 3. Mustikan marjoja. Kuvituskuva. Lähde: <https://www.flickr.com/photos/garibaldi/254885349>

Eläintutkimuksissa käytetään usein mustikkauutteita, joiden antosyaanipitoisuus on vähintään 25 %. Jos hiirelle annetaan uutetta painon mukaan 125 mg/kg vuorokaudessa, vastaisi se n. 780 grammaa tuoretta mustikkaa 75 kg painavalla ihmisellä.

## Johtopäätökset

Mustikan antosyaaneilla ja muilla funktionaalisilla yhdisteillä on saavutettu tutkimuksissa huomattavia terveyshyötyjä. Mustikkauutteilla on havaittu mm. antioksidanttisia, antimikrobisia, tulehdusta estäviä, syöpäkasvua hidastavia, masennusta ja Alzheimerin tautia ehkäiseviä sekä verensokeria ja -painetta tasapainottavia ominaisuuksia. On kuitenkin otettava huomioon, että usein tutkimuksissa käytetään korkeita antosyaanipitoisuuksia. Lisäksi eläimillä tai solulinjoilla tehtyjä kokeita ei ole usein toteutettu ihmisillä, joten tuloksiin pitää suhtautua kriittisesti.

Mustikan antosyaanien vaikutukset perustuvat suurimmalta osin niiden antioksidanttisiin ominaisuuksiin, mutta niiden on tutkittu myös vaikuttavan AMPK ja JAK/STAT-reaktioteihin ja defosforyloivan ERK1/2- ja Akt-signaalintiproteiineja. *H. pylori*-bakteeria kantavilla suolistosyöpäsoluilla antosyaanipitoinen uute inhiboi IL-8:n tuoton täysin. Vaikka mustikalla saadut tutkimustulokset *in vitro* solulinjoilla ja *in vivo* eläinkokeilla vaikuttavat positiivisilta ja lupaavilta, saattaa antosyaanien vaikutukset ihmisen elimistössä olla erilaiset johtuen aineenvaihdunnan erilaisuudesta. Antosyaaneista ei myöskään imeydy elimistöön kuin n. 1 % suun kautta nautitusta määrästä.

Mustikassa on antosyaanien lisäksi joukko muitakin terveydelle hyödyllisiä ainesosia, kuten erilaisia flavonoideja, fenolihappoja, vitamiineja, hivenaineita ja kuitua. Mustikkaa voidaankin pitää funktionaalisena elintarvikkeena, ja sitä on alettu hyödyntää myös kaupallisesti esim. silmien kuntoon tarkoitetuissa ravintolisissä.

### Viitteet

Nile SH & Park SW (2014) Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition* 30(2): 134-144.  
Willemse CM, Stander MA & de Villiers A (2013) Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *J Chromatogr A* 1319: 127-140.